



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**Incidência e análise da taxa de transmissão vertical de *Toxoplasma gondii* e
Neospora caninum em ovinos**

PAULO CESAR GONÇALVES DE AZEVEDO FILHO

RECIFE – PE

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**Incidência e análise da taxa de transmissão vertical de *Toxoplasma gondii* e
Neospora caninum em ovinos**

PAULO CESAR GONÇALVES DE AZEVEDO FILHO

“Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota”

RECIFE – PE

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

A994i Azevedo Filho, Paulo Cesar Gonçalves de
Incidência e análise da taxa de transmissão vertical de
Toxoplasma gondii e *Neospora caninum* em ovinos / Paulo Cesar
Gonçalves de Azevedo Filho. – 2016.
83 f. : il.

Orientador: Rinaldo Aparecido Mota.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Tropical, Recife, BR-PE, 2016.
Inclui referências e anexo(s).

1. Prevalência 2. Incidência 3. Ovelhas 4. Protozoários 5. Aborto
6. Resposta imune I. Mota, Rinaldo Aparecido, orient. II. Título

CDD 636.089

BANCA EXAMINADORA

Incidência e análise da taxa de transmissão vertical de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em ovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas as normas de ética científica.

Paulo Cesar Gonçalves de Azevedo Filho

Data de aprovação ____/____/____

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota (Orientador)
Departamento de Medicina Veterinária
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a. Dr. José Wilton Pinheiro Junior
Departamento de Medicina Veterinária
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. Érica Paes Barreto Xavier de Moraes
Departamento de Medicina Veterinária
Universidade Federal Rural de Pernambuco

*Aos meus familiares,
por todo amor, compreensão,
apoio e incentivo a mim dedicados,
em todos os anos da minha vida.
Com amor, carinho e orgulho, dedico.*

*Aos meus Avós, Joaquim, Maria,
Zezito e Eulina, pela dedicação e
por ter me mostrado o que é
importante na vida, o AMOR.
Com amor, dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me concebido o dom da vida, saúde e força para superar todas as dificuldades até chegar aqui!

Às grandes mulheres da minha vida, Ana Margareth Azevedo, Natalia Azevedo e Roberta Azevedo, partilho a alegria deste momento, pois sou imensamente grato por todas as palavras de apoio, incentivo e otimismo. Obrigado por sempre me incentivarem a alcançar caminhos cada vez mais distantes.

Aos meus irmãos Paulo Henrique, Paulo Vitor, que nos momentos de minha ausência dedicados aos trabalhos, sempre me fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente. Vocês mais do que ninguém, sabem a importância deste mestrado para mim.

Aos meus avôs, avós, tios e tias, primos e primas, que sempre me incentivaram e me deram carinho para continuar seguindo em frente na constante busca pelo conhecimento.

Ao pai que Deus colocou em minha vida, Paulo Cesar Gonçalves de Azevedo. Que mesmo por causa da grande distância não nos separou, pois, seus ensinamentos sempre estarão comigo. Obrigado por ter me ensinado a acreditar mais em mim!

À família Azevedo, Fulco, Connolly e tantas outras que me ensinaram a dar valor as coisas mínimas da vida e a acreditar nos nossos sonhos, mesmo perante as dificuldades encontradas nos nossos caminhos nunca deixaram de me dar apoio, força, paciência, amizade e amor. Jamais esquecerei de vocês.

Ào Professor Leonildo Galiza da Silva que me mostrou os primeiros passos da pesquisa científica.

Ao meu grande orientador, educador e pai Rinaldo Aparecido Mota, obrigado por me mostrar o caminho da ciência, sempre ter acreditado em mim, por seu apoio, além de sua dedicação e competência. Te considero um exemplo a ser seguido, um excelente pesquisador, professor, orientador e acima de tudo, um grande amigo!

Aos companheiros de trabalhos e irmãos na amizade que sempre continuarão presentes em minha vida, Junior Mário (Saloá), Jonatas Campos, Renata, Camila Pedrosa, Müller, Givanildo, Gabi, Drica, Debora Viegas, André, Índio, Pommy, que tanto me ajudaram nessa jornada, sem vocês eu não teria conseguido; meus sinceros votos de agradecimento.

A grande companheira Beatriz Santiago por todo apoio, dedicação e ajuda neste projeto e a outros que com certeza virão.

Aos meus amigos Jurandir, Baleia e todos que fazem parte do STUD AZEVEDO, pelas inúmeras horas de alegria, felicidade e trabalho.

" A verdadeira motivação vem de realização,
desenvolvimento pessoal, satisfação no trabalho
e reconhecimento."

Frederick Herzberg

Sumário

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E DEFINIÇÕES	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Neospora caninum.....	16
2.2 Toxoplasma gondii.....	25
3. OBJETIVOS	33
3.1 Geral.....	33
3.2 Específicos	33
CAPÍTULO I.....	34
CAPÍTULO II	46
4. CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXO A.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Neospora caninum</i>	18
Figura 2. Transmissão exógena e endógena de <i>N. caninum</i>	19
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i>	26
Figura 4. Consequência da infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em ovelhas	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frequência de ovinos soro reagentes ao <i>N. caninum</i> nas diferentes Unidades Federativas do Brasil.	21
Tabela 2. Frequência de ovinos soro reagentes ao <i>T. gondii</i> nas diferentes Unidades Federativas do Brasil.....	28

Capítulo I

Incidência e taxa de transmissão vertical de *Neospora caninum* em ovelhas

Tabela 1. Incidência da infecção por <i>N. caninum</i> em um rebanho naturalmente infectado	38
Tabela 2. Resultados das médias do IRPC no ELISA das ovelhas gestantes.....	38
Tabela 3. Resultados das sorologias (RIFI) dos borregos das ovelhas do G1	39

Capítulo II

Incidência e cinética de anticorpos em ovelhas e fetos infectados naturalmente por *Toxoplasma gondii*

Tabela 1. Incidência da infecção por <i>T. gondii</i> durante o monitoramento sorológico nas ovelhas.	53
Tabela 2. Resultados da sorologia (IRPC) das ovelhas que abortaram	54
Tabela 3. Resultados da sorologia (IRPC) das ovelhas que emprenharam e pariram.....	54
Tabela 4. Resultados da sorologia (RIFI) dos borregos filhos de ovelhas positivas.....	55

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E DEFINIÇÕES

%	Porcentagem
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
µL	Microlitros
µm	Micrômetros
Pb	Pares de base
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio imunoenzimático indireto
EUA	Estados Unidos da América
FR	Frequência Relativa
G	Gramas
IFAT	Reação de imunofluorescência indireta
IgM	Imunoglobulinas M
IgG	Imunoglobulinas G
IgA	Imunoglobulinas A
IgE	Imunoglobulinas E
IHQ	Imunohistoquímica
MAD	Método de Aglutinação Direta
Mg	Miligramas
Min	Minutos
<i>N. caninum</i>	<i>Neospora caninum</i>
n=	Número
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PE	Pernambuco
Rdna	DNA ribossomal
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
SNC	Sistema Nervoso Central
Spp.	Especie
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
\bar{X}	Média

RESUMO

Toxoplasma gondii e *Neospora caninum* são parasitos intracelulares obrigatórios responsáveis por distúrbios reprodutivos em ovinos. Objetivou-se neste estudo avaliar a cinética de anticorpos em ovelhas naturalmente infectadas por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*. Ovelhas em idade reprodutiva compuseram os grupos experimentais. Todos os animais passaram por diagnóstico de gestação e monitoramento sorológico para determinar a taxa de prevalência e incidência. Amostras de sangue das ovelhas e seus conceptos foram coletadas para avaliar a taxa de transmissão vertical. Para o monitoramento sorológico das ovelhas foi utilizada a técnica de ELISA e para a pesquisa de anticorpos IgG anti- *T. gondii* e *N. caninum* nos neonatos foi utilizada a RIFI. Dos fetos abortados foram coletadas amostras de tecidos para PCR. A prevalência inicial da toxoplasmose no rebanho foi de 25,0% (15/60) e a final de 46,7% (28/60) com incidência de 28,9% (13/45); para *N. caninum* a prevalência inicial foi de 26,0% (13/50) e a final de 72,0% (36/50) e taxa de incidência de 62,2% (23/37). A taxa de aborto foi de 37,5% (3/8) nas ovelhas infectadas por *T. gondii* e ausência de abortos por *N. caninum*. A taxa de transmissão vertical para *T. gondii* foi de 38,9% e de 15,4% para *N. caninum*. Os resultados deste estudo indicam alterações na resposta imune de ovelhas naturalmente infectadas por *T. gondii*, principalmente nas ovelhas que abortaram. Além disto, constatou-se a importância da transmissão horizontal na incidência da infecção pelos coccídios e a importância da infecção congênita para a manutenção dos parasitos no rebanho analisado.

Palavras-chave: Prevalência, incidência, ovelhas, protozoários, aborto, resposta imune.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii and *Neospora caninum* are obligate intracellular parasites responsible for reproductive disorders in sheep. The aim of this study was to evaluate the kinetics of antibodies in ewes naturally infected by *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. Ewes in reproductive age composed the experimental groups. All animals were submitted to pregnancy diagnosis and serological monitoring to determine prevalence and incidence rates. Blood samples of the ewes (postpartum) and their lambs (pre-colostral) were collected to evaluate the vertical transmission rate. Serological monitoring of the ewes was performed using the ELISA, and research of IgG antibodies anti- *T. gondii* and *N. caninum* in lambs was performed by IFAT. Aborted fetuses tissue samples were collected for PCR. The initial prevalence of toxoplasmosis was 25.0 % (15/60) and the final 46.7% (28/60), with an incidence of 28.9% (13/45); *N. caninum* initial prevalence was 26.0% (13/50) and the final 72.0% (36/50), and the incidence rate of 62.2 % (23/37). The abortion rate was 37.5% (3/8) for *T. gondii* and no abortions cases by *N. caninum*. The vertical transmission rate for *T. gondii* was 38.9% and 15.4% for *N. caninum*. The results of this study indicate immune response alterations in ewes naturally infected by *T. gondii*, mainly in those that aborted. Moreover, it was observed the importance of the horizontal transmission on the infection incidence by coccidia, as well as the importance of the congenital infection to the maintenance of the parasites in the flock analyzed.

Keywords: Prevalence, incidence, ewe, protozoa, abortion, immune response.

1. QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA

A ovinocultura apresenta um forte impacto no setor agropecuário, econômico e social na região nordeste do Brasil, onde concentra cerca de 90% das criações de caprinos e ovinos (FRANÇA et al., 2012). O Brasil possui um rebanho ovino de cerca de 16,78 milhões de cabeças, distribuídos por todas as regiões do país (IBGE, 2012). O Nordeste detém o maior efetivo do rebanho ovino brasileiro com cerca de 56,08% do rebanho nacional, entretanto as criações apresentam baixo índice de produtividade e condições precárias de manejo e saúde animal (COSTA et al., 2011).

De acordo com Madruga et al., (2005), a ovinocultura vem se apresentando como uma atividade promissora no agronegócio brasileiro, em virtude de o país possuir baixa oferta para o consumo interno da carne ovina e dispor dos requisitos necessários para ser um exportador desta carne: extensão territorial para pecuária, clima tropical, muito verde, mão-de-obra barata, produzindo animais a baixo custo. O Brasil apresenta potencial para competir com os maiores produtores de carne ovina do mundo como China, Índia, Austrália e Nova Zelândia. Entretanto, o país ainda importa carne ovina de países como Argentina e Uruguai por não atender a demanda interna desta carne.

As doenças infectocontagiosas são consideradas como as principais responsáveis por perdas econômicas nos rebanhos ovinos (PINHEIRO et al., 2000), dentre essas destaca-se a toxoplasmose, causada pelo coccídeo *Toxoplasma gondii*, que é descrito como um dos principais responsáveis por problemas reprodutivos em rebanhos no mundo. Os transtornos podem ocorrer quando a fêmea se infecta durante a gestação, podendo acarretar desde reabsorções embrionárias iniciais e abortos até fetos malformados e crias debilitadas e fracas, variando de intensidade de acordo com a fase gestacional da fêmea (DUBEY, 1986; BUXTON, 1998; WEISSMANN, 2003).

A toxoplasmose tem sido identificada como uma das maiores causas de problemas reprodutivos em ovinos e caprinos na Grã-Bretanha, Noruega, Austrália, Nova Zelândia, nos EUA e no Uruguai, assim como em outros países (BLEWETT; WATSON 1984, DUBEY; BEATTIE 1988, SKJERVE et al., 1998, FREYRE et al., 1997, BORDE et al., 2006). No Brasil, estudos realizados especialmente em pequenos ruminantes têm detectado prevalências de anticorpos anti-*T. gondii* nos rebanhos que variam entre 28,9-92,4% (SILVA et al., 2003; MACIEL; ARAÚJO, 2004).

Apesar de *N. caninum* ser considerado um importante agente infeccioso, responsável por abortos ou falhas reprodutivas em bovinos de todo o mundo (ORTEGA- MORA, 2006; DUBEY; SCHARES, 2011), sua relevância epidemiológica, clínica e econômica, em pequenos

ruminantes, ainda permanece pouco compreendida (ARRANZ-SOLÍS et al., 2015). Contudo, estudos recentes em pequenos ruminantes sugerem que a neosporose pode ser uma causa de aborto mais importante do que tem sido considerada (MESQUITA et al., 2013; ARRANZ-SOLÍS et al., 2015; ARRANZ-SOLÍS et al., 2016; PORTO et al., 2016).

No contexto da produção, ainda pouco se sabe sobre a transmissão vertical e as perdas reprodutivas relacionadas à participação de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em distúrbios reprodutivos na espécie ovina. O estudo do impacto destes parasitos na reprodução de pequenos ruminantes e a transmissão vertical nesta espécie, na infecção natural, poderá proporcionar ações importantes nos programas de controle destas doenças, visto a escassez de trabalhos sobre este evento na infecção natural.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Neospora caninum*

2.1.1 Histórico

Em 1984, na Noruega, foi descrita uma enfermidade que provocava quadro de miosite e encefalomielite resultando em paresia de membro posterior e outras alterações neurológicas em seis filhotes caninos da raça Boxer. Os animais apresentaram taquizoítos em tecido nervoso e muscular, porém não foram detectados anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* no soro destes cães como também não se obteve sucesso no bioensaio (BJERKAS et al., 1984).

No ano de 1987 houve dois relatos de infecção em bezerro, com características semelhantes a *T. gondii* ou a *Sarcocystis* spp. com quadro nervoso, porém, sem dados suficientes para a classificação do agente (O'TOOLE et al., 1987; PARISH et al., 1987).

Em um estudo retrospectivo feito em 1988 com cortes histológicos de tecidos de cães, no período de 1948 a 1987 foram analisados tecidos por exame histopatológico e imunohistoquímica. Dos 23 casos de cães dos EUA anteriormente diagnosticados como toxoplasmose, 13 foram confirmados. Nos outros 10 cortes histológicos foi encontrado um parasito que diferia morfológica e antigenicamente de *T. gondii* (DUBEY et al., 1988a).

Dubey et al. (1988a) realizaram o primeiro isolado *in vitro* desse novo coccídeo, a partir de tecido nervoso de uma ninhada de cães com alterações neurológicas, passando a ser classificado como *Neospora caninum*.

Um ano após o isolamento, *N. caninum* foi associado ao aborto de dois fetos bovinos, em um surto de abortamento em uma propriedade leiteira nos Estados Unidos, sendo identificado em lesões no cérebro dos fetos e no rim de um deles (THILSTED et al., 1989). A partir de seu reconhecimento, a neosporose emergiu como uma séria enfermidade de bovinos e cães (DUBEY, 2003). Diferentes estudos demonstraram que este coccídeo é uma das principais causas infecciosas de perda reprodutiva na bovinocultura de diferentes localizações geográficas (DUBEY et al., 1989a; BARR et al., 1991a; JARDINE et al., 1993; AGERHOLM et al., 1994; McINTOSH et al., 1994; JARDINE et al., 1995; BJORKMAN et al., 1996; DUBEY et al., 1996a; DUBEY et al., 1996b; GONDIM et al., 1999c; ANDERSON et al., 2000; REICHEL, 2000; BACSADI et al., 2001; CORBELLINI et al., 2002; DUBEY, 2003;).

Por meio de imunohistoquímica específica para *Neospora caninum* e para outros coccídios em 1991, Bjerkas e Dubey confirmaram que os parasitos encontrados nos cães da Noruega em 1984 eram *Neospora caninum*.

Em 1998, os cães (*Canis familiaris*) foram definidos como hospedeiros definitivos de *N. caninum*, pois foram capazes de eliminar oocistos após ingerirem tecidos de camundongos infectados experimentalmente com o protozoário. A confirmação de que os oocistos eram de *N. caninum* foi feita por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (McALLISTER et al., 1998). Posteriormente, três outros canídeos foram identificados como hospedeiros definitivos de *N. caninum*: o coiote (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004c); o dingo australiano (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e o lobo cinza (*Canis lupus*) (DUBEY et al., 2011).

No Brasil, o primeiro trabalho relacionando ao agente foi um inquérito sorológico em bovinos leiteiros e de corte nos estados do Mato Grosso do Sul e São Paulo, onde foram encontrados 12,22% de animais soropositivos (BRAUTIGAM et al., 1996). Posteriormente, Gondim et al., (1999a) relataram bovinos leiteiros sorologicamente positivos e identificaram o parasito em um feto bovino abortado, oriundo de uma propriedade com histórico de aborto recente, por meio da imunistoquímica (GONDIM et al., 1999a; GONDIM et al., 1999b).

Posteriormente, Gondim et al. (2001) obtiveram o primeiro isolado de *N. caninum* no Brasil, denominado NC-Bahia, a partir do cérebro de um cão de Salvador, Bahia com sintomatologia nervosa. Existe uma grande variedade de hospedeiros intermediários para o *N. caninum*, domésticas e selvagens, incluindo bovídeos, caprinos, ovinos, equinos, suínos, gatos domésticos, diversas espécies de aves, roedores e lagomorfos, bisões, veados, iaques, camelídeos e lhamas (DUBEY; SCHARES, 2011).

2.1.2 Taxonomia e Ciclo Biológico

N. caninum foi classificado, segundo estudos morfológicos por microscopia eletrônica e sequenciamento do DNA, como pertencente ao reino Protista, filo Apicomplexa, classe Conoidasida, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidiida, subordem Eimeriorina, família Sarcocystidae, subfamília *Toxoplasmatinae* e gênero *Neospora* (ELLIS et al., 1994; HOLMDAHL et al., 1994).

Apresenta maior importância para bovinos, e em menor escala para os caninos (DUBEY et al., 1996a; McLLISTER et al., 1998; GONDIM, 2006; REICHEL et al., 2013). Caracteriza-se como um protozoário intracelular obrigatório, que forma cisto nos tecidos de seus hospedeiros e causa uma enfermidade denominada neosporose (DUBEY et al., 1988b; DUBEY et al., 1993).

Ao se constatar a eliminação de oocistos nas fezes de cães que ingeriram cistos contidos em cérebro de camundongo infectado, McAllister et al. (1998) elucidaram o ciclo biológico do parasito.

Há relatos de infecções naturais e/ou detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em cães (DUBEY et al., 1988b), bovinos (CONRAD et al., 1993), búfalos (RODRIGUES et al., 2004), ovinos (KOBAYASHI et al., 2001), caprinos (DUBEY et al., 1992), equinos (LINDSAY et al., 1996), raposas (ALMERIA et al., 2002), veados (DUBEY et al., 1996), veados-de-cauda branca (GONDIM et al., 2004b), lhamas e alpacas (CHAVEZ-VELASQUEZ et al., 2004), suínos (AZEVEDO et al., 2010; FEITOSA et al., 2014), gatos domésticos (MILLAN et al., 2009), galinhas (COSTA et al., 2008; GONCALVES et al., 2012), pardais (GONDIM et al., 2010), *Rattus norvegicus* (FERROGLIO et al., 2007), capivaras (YAI et al., 2008; TRUPPEL et al., 2010), coelhos (HUGHES et al., 2008; IBRAHIM et al., 2009), lontras marinhas (MILLER et al., 2010), focas-comuns (FUJII et al., 2007), rinocerontes (WILLIAMS et al., 2002; SANGSTER et al., 2010), equinos (GRAY et al., 1996; DAFT et al., 1997), asininos (GHAREKHANI et al., 2013; MACHACOVA et al., 2013; BLANCO et al., 2014), dentre outros.

Somente no epitélio intestinal dos hospedeiros definitivos ocorre a reprodução sexuada do parasito, resultando na formação de oocistos não-esporulados que são excretados nas fezes (McALLISTER et al., 1998; DUBEY, 2003; GONDIM et al., 2004c; DUBEY et al., 2007). Os oocistos não-esporulados apresentam formato esférico ou subesférico e medem de 10 a 11µm de diâmetro.

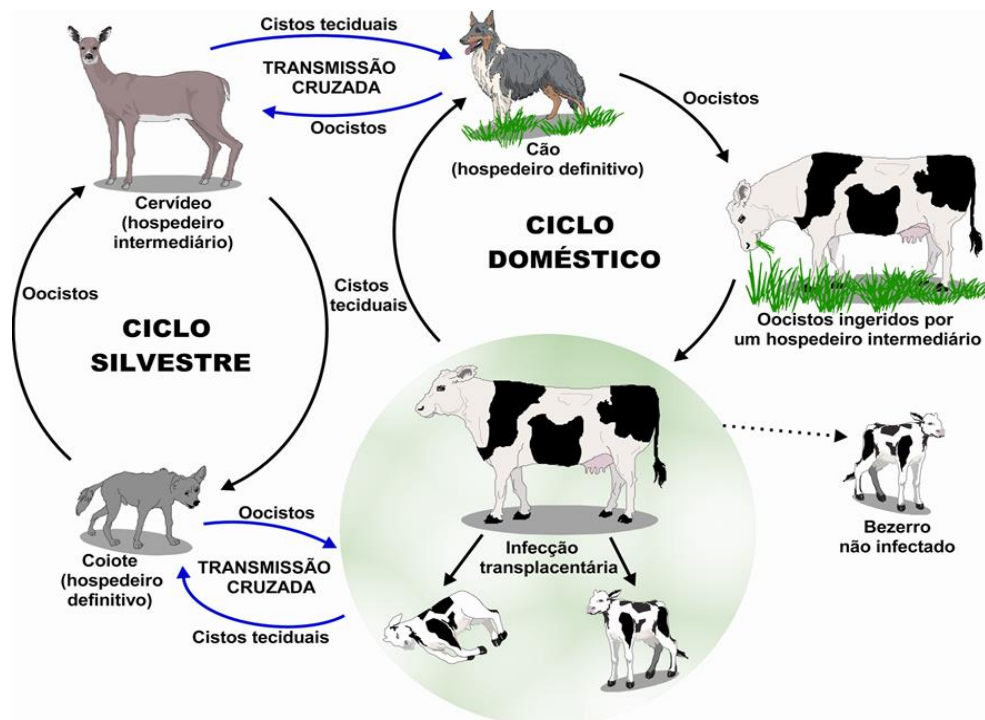
Os cães eliminam oocistos em torno do quinto dia pós-ingestão de tecidos de animais infectados. A quantidade de oocistos eliminados, o período de eliminação e o período pré-patente variam consideravelmente (GONDIM et al., 2002). Foi demonstrado que animais mais jovens excretam uma maior quantidade de oocistos em comparação a animais adultos, e que cães realizam a re-excreção de oocistos após a reinfecção por ingestão de tecido com cistos de *N. caninum* em um intervalo de 18 a 20 meses decorridos da primo infecção (GONDIM et al., 2005).

No ambiente, os oocistos esporulam entre 24 e 72 horas em condições ótimas de temperatura, oxigenação e umidade, tornando-se infectantes (LINDSAY et al., 1999a; GONDIM et al., 2002). Oocistos esporulados medem 11,7 por 11,3µm, possuem uma parede com espessura de 0,6 - 0,8µm e apresentam no seu interior dois esporocistos com formato elipsóide, cada um contendo quatro esporozoítos, organismos alongados, medindo 6,5 por 2µm (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999b).

Ao serem ingeridos pelos hospedeiros intermediários, os oocistos esporulados chegam à luz intestinal e neste ambiente ocorre a liberação dos esporozoítos por excitação. Estes organismos invadem os enterócitos assumindo a forma evolutiva de taquizoítos, iniciando-se novo ciclo de infecção (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999b).

A transmissão de *N. caninum* entre seus hospedeiros intermediários pode ocorrer pela via horizontal e vertical (DUBEY et al., 2006a). A via horizontal ou pós-natal advém da ingestão de oocistos esporulados na água ou alimentos, ou de cistos teciduais contendo bradizoítos consumidos por carnívoros (DIJKSTRA et al., 2002). Essa forma de transmissão foi demonstrada por Gondim et al. (2002), que induziram a excreção de oocistos em cães alimentados com tecidos de bezerros que haviam recebido oocistos por via oral. Os oocistos eliminados pelos cães foram usados para a infecção de um novo bezerro, cujos tecidos foram ingeridos por outro cão com a consequente excreção de oocistos do parasito.

Figura 01: Ciclo biológico de *Neospora caninum*



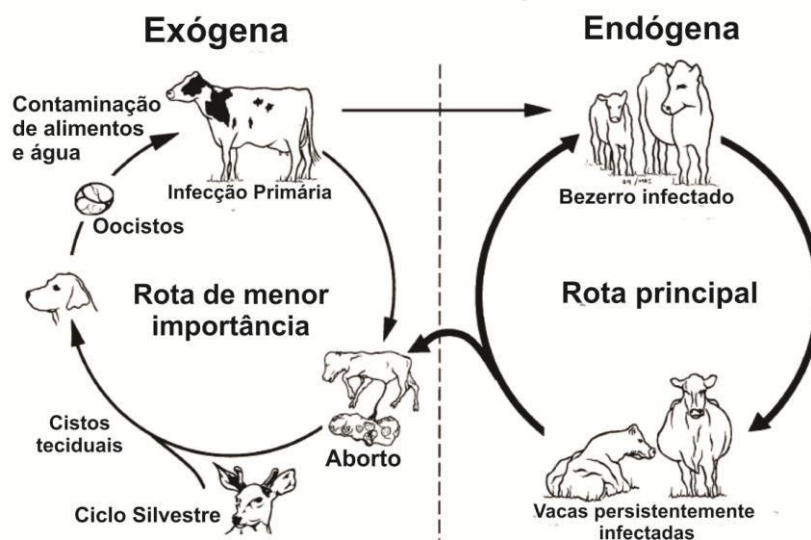
Fonte: www.biologico.sp.gov.br

A via vertical ou transplacentária é considerada uma importante rota de transmissão de *N. caninum* em bovinos (DUBEY, 1999). Foi sugerido o uso dos termos de transmissão transplacentária exógena e transmissão transplacentária endógena para diferenciar a origem da infecção (TREES et al., 2005). Na transmissão transplacentária exógena, a infecção fetal origina-se a partir da ingestão de oocistos pela fêmea quando já gestante, enquanto que na via

transplacentária endógena, cursa com a ativação de formas císticas do parasito em vacas com infecção latente, provavelmente, por uma mudança na condição imunológica da fêmea, quando gestante permite a infecção do feto e a perpetuação do parasitismo no rebanho (TREES et al., 2005). Gondim et al. (2004) também demonstraram a possibilidade de vacas infectadas com oocistos de *N. caninum*, em diferentes estágios de gestação, transmitirem o parasito por via transplacentária e a ocorrência de aborto e infecção dos fetos, conforme a figura 02.

Figura 2: Transmissão exógena e endógena de *N. caninum*

Transmissão transplacentária da neosporose bovina



Fonte: Adaptado de Dubey; Buxton; Wouda (2006).

2.1.3 Neosporose Ovina

O primeiro relato da enfermidade na espécie ovina foi feito por Dubey et al., (1990a). Estes pesquisadores reanalisaram o tecido neurológico de um cordeiro do Reino Unido com suspeita de toxoplasmose que apresentava sinais neurológicos e morreu com uma semana de idade. Ao exame histopatológico do cérebro e medula espinhal foram observadas encefalomielite não supurativa e redução da massa cinzenta com focos de cavitação, além de cistos semelhantes aos de *T. gondi*, porém o diagnóstico não foi comprovado (HARTLEY; BRIDGE, 1975). Uma nova análise realizada por microscopia eletrônica e imunohistoquímica confirmou a presença de cistos de *N. caninum* no cérebro e medula espinhal.

Em um estudo conduzido na espécie ovina, Moreno et al. (2012) demonstraram que *N. caninum* desempenha um papel significativo no aborto em pequenos ruminantes na população estudada na Espanha. Além disso, os dados publicados destacaram a importância do diagnóstico diferencial entre protozoários semelhantes, como *T. gondii*, sempre que as lesões características

forem observadas. No mesmo ano, o potencial de envolvimento de *N. caninum* na ocorrência de abortos em ovinos naturalmente infectados também foi demonstrado na PCR em fetos abortados (HOWE et al., 2012). Os estudos publicados indicam que *N. caninum* no trato reprodutivo de ovelhas pode se comportar de maneira semelhante ao que ocorre na espécie bovina.

Arranz-Solís et al. (2015) demonstraram que o estágio da gestação tem papel fundamental no curso da neosporose ovina, onde as infecções no terço inicial e médio de gestação causaram 100% de aborto, enquanto infecção no terço final da gestação resultou em cordeiros infectados nascidos prematuros, fracos ou clinicamente saudáveis. A resposta imune desempenha um papel crucial nos resultados da infecção por *N. caninum* durante a gestação. Devido à resposta imune fetal ser imatura nesta fase, permitindo ao parasito atravessar a barreira placentária antes da resposta imune materna ser estabelecida, sugeriram que o aborto no terço inicial da gestação de ovinos possa ser causado pela multiplicação descontrolada de *N. caninum* no feto. O aborto no terço médio ocorre provavelmente pela grave lesão desenvolvida na placenta. O fato de não ter havido aborto no terço final de gestação pode ser devido ao curto intervalo de tempo entre a inoculação de *N. caninum* e o período de nascimento dos cordeiros e de um sistema imune fetal mais maduro (ARRANZ-SOLÍS et al., 2016).

Porto et al. (2016) realizaram estudo semelhante em caprinos, resultando em morte fetal em todas as cabras que foram inoculadas durante o primeiro terço gestacional (sete animais). A infecção no terço médio provocou morte fetal, um cabrito natimorto e nascimento de cabritos saudáveis, mas congenitamente infectados. No terço final de gestação nasceram cabritos congenitamente infectados debilitados e com sinais neurológicos. Os autores demonstraram que houve morte fetal durante a fase aguda da neosporose, algo que não havia sido descrito em ovinos e bovinos.

Os resultados desses estudos sugerem que a infecção por *N. caninum* em cabras e ovelhas no terço final da gestação pode ter tido consequências mais severas que a infecção em bovinos no mesmo período (BENAVIDES et al., 2012; ARRANZ-SOLÍS et al., 2015; PORTO et al., 2016).

Em bovinos, caprinos e ovinos, o principal sinal clínico observado na neosporose é o aborto, que pode ocorrer em qualquer época do ano e apresentar-se de forma esporádica, endêmica ou surtos epidêmicos (DUBEY, 2003; ARRANZ-SOLÍS et al., 2015; PORTO et al., 2016). Aumento transitório na temperatura corporal de vacas e cabras foi descrito durante a primeira semana após infecção experimental, que é mais provavelmente devida à inoculação dos taquizoítos e os primeiros ciclos de replicação do parasito nos tecidos do hospedeiro

(REGIDOR-CERRILLO et al., 2014; PORTO et al., 2016). A infecção pelo protozoário em ovinos geralmente é inaparente e, em animais adultos, costuma se restringir à esfera reprodutiva, não provocando mortalidade (BLEWETT; WATSON, 1983; DUBEY, 1990). Em condições experimentais, ovinos também podem apresentar letargia, diarreia ou sintomas respiratórios (ANDERSON; BARR; CONRAD, 1994).

Estudos sorológicos sobre a frequência de anticorpos anti-*N. caninum* comprovam a disseminação da neosporose em ovinos no mundo; as taxas de infecção em ovinos no Brasil variam de 4,69% a 74,5% (Tabela 1). Esta variação, segundo Dubey (1990) pode ser influenciada pelo tipo de teste sorológico utilizado, região e idade dos animais.

Tabela 1 – Frequência de ovinos soro reagentes ao *N. caninum* nas diferentes Unidades Federativas do Brasil.

Unidade Federativa	Autor	Ano	Técnica utilizada	Nº Animais	F.R (%)
Rio Grande do Sul	PINHEIRO et al.	2015	ELISA	110	33,63
São Paulo e Rio Grande do Sul	PAIZ et al.	2015	RIFI	596/393	59,2/74,5
Curitiba	MORIKAWA et al.	2014	RIFI	17	23,5
Minas Gerais	ANDRADE et al.	2013	RIFI	488	13,1
Pernambuco	TEMBUE et al.	2011	RIFI	81	64,2
Maranhão	MORAES et al.	2011	RIFI	64	4,6
São Paulo	MACHADO et al.	2011	RIFI	1497	8,0
São Paulo	LANGONI et al.	2011	RIFI	382	12,8
Minas Gerais	ROSSI et al.	2011	RIFI/ELISA	155	47,1/54,0
Pernambuco	SOUZA NETO et al.	2010	RIFI	158	10,1
Alagoas	FARIA et al.	2010	RIFI	343	9,6
Minas Gerais	SALABERRY et al.	2010	RIFI	334	8,1

F.R. – Frequência Relativa; RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta; ELISA - Ensaio Imunoenzimático.

2.1.4 Imunologia da neosporose

Pode-se dizer que fatores imunológicos influenciam os mecanismos de perda fetal e de transmissão vertical do parasito (QUINN et al., 2002). Tanto em animais naturalmente infectados, quanto em animais experimentalmente infectados, têm sido relatados resposta imune celular com a produção de IFN- γ após a infecção com *N. caninum* (KHAN et al., 1997;

QUINN et al., 2002; INNES et al., 2002). Portanto, a resposta imune ao *N. caninum*, igual a outros parasitas intracelulares, é dominada pela resposta do tipo Th1 (SMITH, 1996; KHAN et al., 1997; QUINN et al., 2002; INNES et al. 2002; WILLIAMS et al., 2003). A gestação representa uma situação estranha para o sistema imune da gestante, porque a mãe carrega uma espécie de “enxerto alógeno” (feto) sem que ocorra uma reação de rejeição (INNES et al., 2002). Uma resposta imune celular é tida como importante fator na proteção contra a infecção por *N. caninum*. A resposta imune contra a infecção vai influenciar no sucesso da gestação, visto que a imunomodulação que ocorre durante a gestação pode afetar a habilidade da gestante para enfrentar a infecção. O que se tem observado é que o período da gestação no qual o animal foi infectado é importante para o destino da gestação (QUINN et al., 2002; INNES et al. 2002; BUXTON et al., 2002). Quando a infecção ocorre em estágios mais avançados da gestação, a capacidade de resposta imunológica do feto pode determinar o sucesso da prenhez (MALEY et al., 2006; ROSBOTTOM et al., 2011).

2.1.5 Diagnóstico da neosporose ovina

O diagnóstico baseado na avaliação clínica não é simples, uma vez que os sinais são inespecíficos. Desta forma, a confirmação deve ser feita por meio de exames laboratoriais (DUBEY et al., 1996a; PACKHAM et al., 2002). A utilização de técnicas de diagnóstico indiretas (sorológicas como MAT, RIFI, ELISA e *Western blot*) ou direto (identificação do parasito por histopatologia, imunohistoquímica, isolamento *in vitro* e *in vivo* e PCR) são necessários para auxiliar na confirmação da suspeita clínica (HO et al., 1996; WILLIAMS et al., 1997; DUBEY et al., 2006b).

As técnicas indiretas de diagnóstico apresentam sensibilidade e especificidade elevadas, permitindo o diagnóstico da infecção *in vivo* nos animais e o estudo da importância dos hospedeiros no ciclo biológico do parasito ou na epidemiologia da infecção (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003).

A RIFI foi o primeiro teste sorológico empregado para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* (DUBEY et al., 1988b; BJORKMAN et al., 1999). A técnica consiste na fixação, em lâmina, de antígeno para qual se pesquisa a presença de anticorpos no soro animal, com posterior incubação de um anticorpo conjugado com uma molécula que emite fluorescência quando exposta à luz ultravioleta. A execução requer treinamento e experiência, porque a interpretação da reação é visual e individual, logo subjetiva (CAMARGO, 1974).

O método de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), detecta várias classes de anticorpos (IgM, IgG, IgA, IgE) e permite que os soros de vários animais sejam examinados de

uma só vez. Os testes podem ser automatizados e têm resultados precisos, reprodutíveis e padronizados por leitura de cor em espectrofotômetro. Utilizam extratos, fragmentos ou proteínas recombinantes do parasito fixado em cavidades (poços) de placas de poliestireno para mensuração dos anticorpos com uma anti-imunoglobulina humana específica contra o isotipo de interesse (IgG, IgM, etc.) marcada com uma enzima (CAMARGO, 2001).

A detecção direta do parasito no exame histopatológico é utilizada para identificar lesões teciduais sugestivas de neosporose como infiltrado mononuclear não-supurativo no SNC e outros órgãos como coração, musculatura esquelética, pulmão, fígado e baço (BARR et al., 1991b). O exame histopatológico não é uma técnica definitiva para o diagnóstico da neosporose, mas é muito importante para detectar as lesões sugestivas da infecção pelo parasito (CANADA et al., 2002). Outros coccídeos causam lesões semelhantes às observadas na neosporose, sendo necessária a combinação de outras técnicas para o diagnóstico definitivo da doença como a imunohistoquímica, que demonstra a presença do parasito no fragmento tecidual por anticorpos específicos e posteriormente é marcado por um anticorpo secundário conjugado a enzimas que reagem gerando coloração quando exposto a um reagente (LINDSAY et al., 1989; PETERS et al., 2001; JENKINS et al., 2002; DUBEY, 2003).

A amplificação exponencial de fragmentos específicos do DNA de *Neospora* spp. por PCR, nos tecidos de animais suspeitos é considerada uma técnica com alta sensibilidade e especificidade, até mesmo em comparação com a IHQ (MULLER et al., 1996; BASZLER et al., 1999; VAN MAANEN et al., 2004). Essa técnica é utilizada no diagnóstico de abortamento em bovinos, todavia, deve-se destacar a necessidade de associação da PCR a outros exames, como o histológico, para a confirmação definitiva da doença, uma vez que a identificação do DNA no parasito no tecido do feto é indicativa apenas de infecção (DUBEY et al., 2006b). Os alvos mais utilizados na PCR para *N. caninum* são as sequências de rDNA (18S, 28S e ITS-1) e o gene pNc5 (HOLMDAHL et al., 1996; YAMANE et al., 1996; HOMAN et al., 1997; GONDIM et al., 2004a).

2.1.6 Prevenção e controle da neosporose ovina

As medidas de prevenção e controle da neosporose muitas vezes podem ser inviáveis economicamente ou pouco práticas. Incluem neste contexto a remoção de fetos abortados, placentas e borregos mortos do pasto, adoção de medidas para diminuir a contaminação fecal de água e alimentos por cães e outros canídeos, evitar a introdução de animais infectados no rebanho e descarte dos animais infectados (DUBEY, 2003; INNES et al., 2002).

2.2 *Toxoplasma gondii*

2.2.1 Histórico

Toxoplasma gondii é um dos parasitos mais estudados no mundo devido à sua importância médica e veterinária. Até o século XX, quinze mil artigos e 500 revisões tinham sido publicadas a respeito do assunto (TENTER et al., 2000). Desde o ano 2000 até os dias atuais (2016), mais de nove mil artigos com os termos “toxoplasma” ou “toxoplasmose” foram indexados no PubMed, Centro Nacional de Informação em Biotecnologia dos Estados Unidos (NCBI).

Toxoplasma gondii foi descrito pela primeira vez em 1908 por Nicolle e Manceaux que observaram o parasito em um roedor africano, *Ctenodactylus gondii*. A princípio, os autores o nomearam *Leishmania gondii*. Na mesma época, Splendore (1908), no Brasil, descreveu o parasito em coelhos. Em 1909, Nicolle e Manceaux renomearam o parasito para *Toxoplasma gondii*.

No final da década de 30, este parasito foi isolado pela primeira vez em animais (SABIN; OLITSKY, 1937) e em humanos (WOLF et al., 1939), tratando-se, então, não somente de um parasito que acometia animais e sim de uma zoonose; finalmente após o primeiro isolado, *T. gondii* foi considerado e reconhecido mundialmente como importante causador de abortamentos em ovinos e caprinos (HARTLEY; MARSHALL, 1957).

Na década de 60, formas do parasito foram encontradas em fezes de gatos (HUTCHISON, 1965) e, em 1970 o ciclo biológico foi concluído, quando Frenkel, Dubey e Miller (1970) identificaram os estágios sexuais do *T. gondii* no intestino delgado de gatos e os oocistos nas fezes, confirmando o gato como hospedeiro definitivo.

Todos os animais de sangue quente são considerados hospedeiros intermediários. Os primeiros animais a serem identificados foram coelhos, cães domésticos e ratos (NICOLLE; MANCEAUX, 1908; MELLO 1910; LEVADITI et al., 1928).

Na espécie ovina, *T. gondii* foi descrito pela primeira vez em 1942 (NICOLLE; MANCEAUX, 1908), e desde essa época muitos pesquisadores demonstraram a importância econômica da toxoplasmose nos ovinos como causa de abortos e natimortos (OKUDA et al., 2007). *Toxoplasma gondii* causa uma infecção que se traduz por severas perdas econômicas em ovinos, incluindo abortos, má formação fetal, natimortos e placentite (MALIK et al., 1990).

No Brasil, estudos têm demonstrado a presença e a importância de *T. gondii*, especialmente em pequenos ruminantes (AMARAL, et al., 1978; CHIARI et al., 1987; PESCADOR, et al., 2007). Os estudos de prevalência da infecção ainda são escassos em alguns

Estados do Brasil (GONDIM et al., 1999), no entanto, em outras regiões trabalhos indicam uma alta taxa de sororeagentes que variam de 17% a 50% (ROMMANELLI, 2002; FIGLIUOLO et al., 2004).

2.2.2 Taxonomia e ciclo biológico

T. gondii foi classificado como pertencente ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Conoidasida, subclasse Coccidiasina, ordem Eucoccidiorida, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae, gênero *Toxoplasma* e espécie *Toxoplasma gondii* (CURRENT et al., 1990; LEVINE, 1980; QUIROZ, 2007; DUBEY, 2000).

O parasito *T. gondii* pode ser encontrado em vários estágios como: taquizoítos, bradizoítos e esporozoíto (VELARDE et al., 2009). O taquizoíto de *T. gondii* tem uma região alongada de aproximadamente 8 µm de comprimento por 2µm de largura, é caracterizado por apresentar o conóide, as roptrias, os micronemas, o núcleo, o complexo de Golgi, o apicoplasto e o retículo endoplasmático. Por fim, observa-se uma película que envolve todo o conjunto que parte do anel polar posterior (SOUZA et al., 2010). Os taquizoítos caracterizam a infecção aguda de *T. gondii*, mesmo que já se tenha instalado a resposta imune protetora (COSTA-SILVA; CHIOCCOLA, 2010).

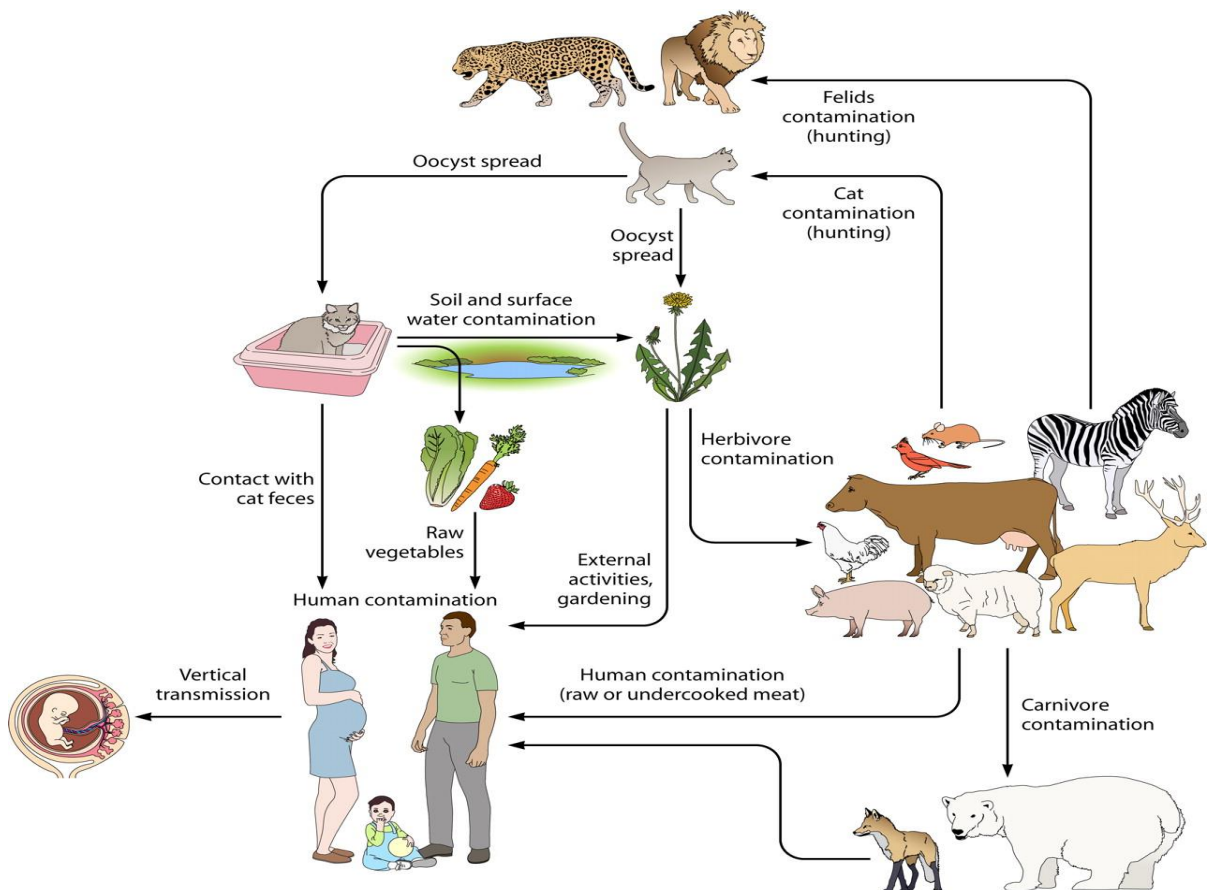
As funções do conóide, roptrias, microporos e micronemas não estão muito bem conhecidas, mas provavelmente está relacionada à penetração e criação de um ambiente intracelular adequado para sobrevivência do parasito (DUBEY, 2010). Os bradizoítos são parecidos com os taquizoítos, porém, são menores e possuem um núcleo situado na parte superior, o que o diferencia dos taquizoítos que possuem o núcleo mais central. Estes podem ser encontrados dentro dos cistos teciduais que podem variar de 5-70µm de tamanho, já que podem conter de um a centenas de bradizoítos no seu interior (VELARDE et al., 2009).

O oocisto mede aproximadamente 10-12µm. Neste encontra-se um par de esporocistos cada qual com 4 esporozoítos, que se formam unicamente nos felinos (hospedeiros definitivos) (VELARDE et al., 2009). Ao ingerir qualquer das três formas morfológicas de *T. gondii*, os gatos podem desenvolver e eliminar os oocistos. Porém, menos de 30% dos gatos liberam oocistos nas fezes após ingestão de taquizoítos ou oocistos, enquanto que quase todos liberam oocistos quando infectados por cistos teciduais contendo bradizoíto (DUBEY, 1996a). Os gatos contaminam o ambiente com cerca de 100.000 oocistos por grama de fezes (DUBEY, 2010). Os oocistos são excretados por apenas uma ou duas semanas, mas podem permanecer viáveis por até dois anos quando em condições de temperatura e umidade favoráveis (FREYRE et al., 1997).

As três formas de transmissão principais são: transplacentária, ingestão de cistos teciduais contidos em tecidos animais e ingestão de água contaminada com oocistos (DUBEY, 1994). Acredita-se que os ovinos se infectam principalmente pela ingestão de oocistos na água ou alimento (HILL; DUBEY, 2002), embora Duncanson et al. (2001) tenham observado alta taxa de transmissão congênita (61%) em um rebanho ovino por detecção do DNA do protozoário em placentas e tecidos fetais. Em raras ocasiões, podem se infectar pelo consumo de restos placentários ou de abortos ou leite cru, sendo estas vias consideradas não importantes (HILL; DUBEY, 2002).

Existe ainda, outra provável via de infecção que vem sendo estudada; trata-se da via venérea ou sexual. Apesar do assunto ter sido pouco estudado, existem estudos sobre o tema em ovinos. A infecção experimental oral ou subcutânea de reprodutores ovinos (LOPES et al., 2009) ou infecção experimental por meio da contaminação do sêmen fresco (MORAES et al., 2010; MORAES et al., 2011).

Figura 3: Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*.



Fonte: Robert-Gangneux (Dardé, 2012).

2.2.3 Toxoplasmose ovina

O primeiro relato de abortamento em ovinos provocado por *T. gondii* ocorreu em 1954, em uma propriedade da Nova Zelândia, onde se observou um surto de abortamento e natimortalidade (HARTLEY; JEBSON; MCFARLANE, 1954). Desde então, a toxoplasmose tem sido reconhecida como importante agente abortivo em ovinos em diversas regiões do mundo (DUBEY et al., 1986; FREYRE et al., 1997).

Os abortamentos podem ocorrer de forma esporádica ou epidêmica dentro de uma propriedade, dependendo do nível de exposição do rebanho e da presença de animais imunes ou não (ANDERSON; BARR; CONRAD, 1994). Os problemas reprodutivos geralmente acontecem quando a ovelha é infectada pela primeira vez durante a gestação. Ovelhas infectadas antes da gestação não apresentam falhas reprodutivas (WATSON; BEVERLEY, 1971).

A infecção em ovinos ocorre principalmente por meio da ingestão de oocistos infectantes nos alimentos e solo contaminado. Clinicamente a toxoplasmose ovina é assintomática, porém ovelhas não imunes que se infectam durante a gestação podem desenvolver distúrbios reprodutivos com graves repercussões reprodutivas e econômicas (BONAMETTI et al., 1997; CLEMENTINO et al., 2007).

A toxoplasmose é relativamente comum em pequenos ruminantes (MAINAR et al., 1996) sendo responsável por grandes perdas, principalmente pelos problemas reprodutivos em rebanhos ovinos e caprinos, onde a infecção torna-se a principal causa de abortamentos, malformações fetais, nascimento de animais prematuros e mortes neonatais (MALIK; DREESEN; CRUZ, 1990).

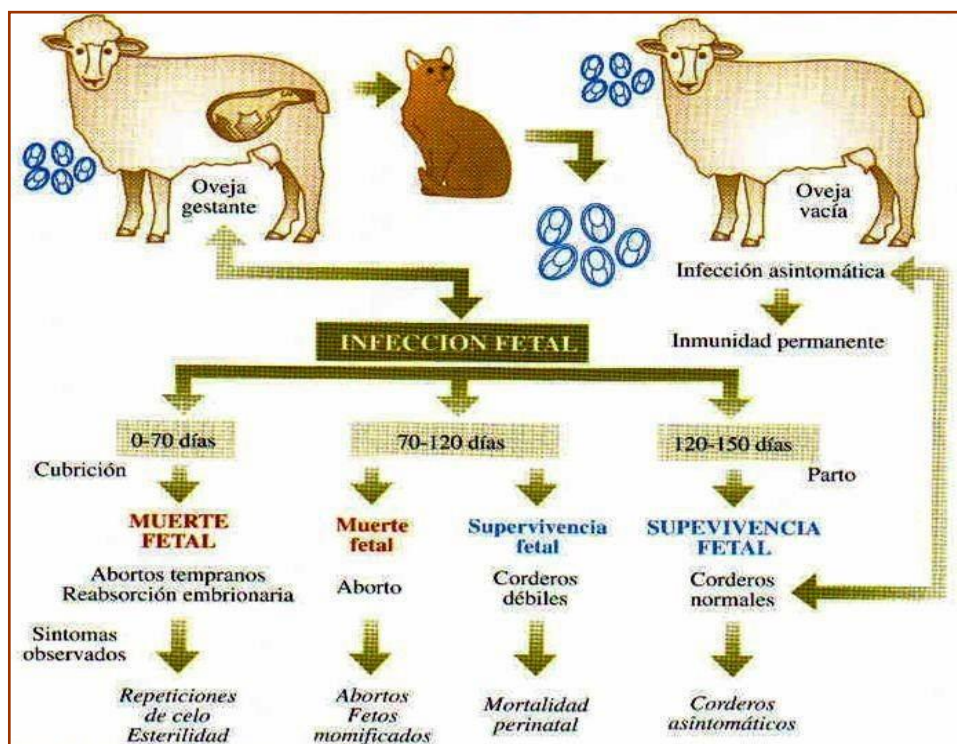
Os sinais clínicos observados em ovinos diferem de acordo com o estágio de gestação da ovelha no momento da infecção. As ovelhas não gestantes geralmente são assintomáticas (VAUGHAN, 1996), ocorrendo a formação de cistos. Nos animais em gestação, durante a fase aguda da infecção, pode haver invasão da placenta com presença de taquizoítos livres e no interior dos trofoblastos, resultando em focos de necrose e mineralização nos cotilédones da placenta. Podem existir lesões macro ou microscópica com presença de manchas brancas e nódulos de até 2mm de diâmetro que podem estar presentes na placenta. Podem, ainda, ser confluentes e nem todos os cotilédones são acometidos pelo mesmo grau de necrose (DUBEY, 1988; FRENKEL, 1990; JONES et al., 2000).

A infecção no primeiro terço da gestação causa maiores prejuízos, ocorrendo reabsorção embrionária e morte fetal, seguida de aborto. Contudo a infecção em fases mais adiantadas da gestação pode ocasionar mumificação e malformação fetal, natimortos ou

recém-nascido fracos (DUBEY, 1988; BARBERAN; MARCO, 1997; WEISSMANN, 2003).

A figura 04 ilustra as difersas fases de infecção por *T. gondii* em ovinos.

Figura 4: Consequência da infecção por *Toxoplasma gondii* em ovelhas



Fonte: Barberan e Marco (1997)

Estudos sorológicos relatam alta prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* comprovando a disseminação da toxoplasmose em ovinos no mundo com porcentagens de animais soro reagentes que variam de 3% a 92% (TENTER, 2000). As taxas de infecção em ovinos no Brasil variam de 7% a 55% (Tabela 2). Esta variação, segundo DUBEY (1990) pode ser influenciada pelo tipo de teste sorológico utilizado, região e idade dos animais.

Tabela 2 – Frequência de ovinos soro-reagentes ao *T. gondii* nas diferentes Unidades Federativas do Brasil.

Unidade Federativa	Autor	Ano	Técnica utilizada	Nº Animais	F.R (%)
Pernambuco	MAGALHÃES et al.	2016	RIFI	240	85,0
Alagoas	NUNES et al.	2015	RIFI	100	14,0
Bahia	ROCHA et al.	2015	RIFI	275	41,5
Pernambuco	SILVA et al.	2014	RIFI	57	15,7
Rio de Janeiro	LEITE et al.	2014	MAD	379	53,3
Nordeste	MENDONÇA et al.	2013	RIFI	932	28,2

Bahia	GUIMARÃES et al.	2013	RIFI	795	30,2
Rio Grande do Sul	ANDRADE et al.	2013	RIFI	930	22,1
Santa Catarina	SAKATA et al.	2012	RIFI/ELISA	360	56,9/42,5
Pernambuco	COSTA et al.	2012	RIFI/MAT	97	60,8
Maranhão	MORAES et al.	2011	RIFI	64	18,7
São Paulo	LANGONI et al.	2011	MAD/RIFI	382	18,6
Minas Gerais	ROSSI et al.	2011	RIFI/ELISA	155	46,5/36,9
São Paulo	LOPES et al.	2010	RIFI	488	52,0

F.R. – Frequência Relativa; RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta; ELISA - Ensaio Imunoenzimático; MAD – Método de Aglutinação Direta.

2.2.4 Imunologia da toxoplasmose

O *T. gondii* pela sua característica de entrecelularidade obrigatória desencadeia uma resposta imune celular para proteção dos hospedeiros. Contudo, a resposta imune humoral, assim como a inata, também é ativada em indivíduos com toxoplasmose (GAZZINELLI et al., 1993; INNES; VERMEULEN, 2006).

A presença do parasito induz a síntese de IL-12 e, subsequentemente, de IFN γ por células NK de camundongo (SUZUKI et al., 1988; GAZZINELLI et al., 1993; HAYASHI et al., 1996; YAP; SHER, 1999). Neutrófilos e células dendríticas também produzem altos níveis de IL-12 (GAZZINELLI et al., 1993, 1994; BLISS et al., 1999). A influência de citocinas na atração de macrófagos é relatada, em especial IL-6, que estimula a síntese hepática de proteínas de fase aguda (APPELBERG et al., 1994).

A indução da resposta imune celular do tipo Th1 é importante para o controle da proliferação parasitária. Estudos *in vitro* com células de ovinos demonstraram que IFN γ produzida por esta espécie animal inibe a multiplicação intracelular dos taquizoítos com possível morte do parasito (SUZUKI et al., 1988; OURA et al., 1993; YAP; SHER, 1999). A síntese de IFN γ ocorre no segundo dia da infecção de ovinos com cepa atenuada (S48) de *T. gondii* (INNES et al., 1995).

O risco da infecção durante a gestação reside na modulação imunológica na interface materno-fetal. A supressão dos mecanismos inflamatórios com mínima expressão de IL-12, IFN γ e TNF α tornam a placenta e o feto suscetíveis à invasão parasitária durante a parasitemia por *T. gondii*. Se a infecção ocorrer precocemente durante a gestação, as consequências para o feto serão fatais (BUXTON; FINLAYSON, 1986; ENTRICAN; WHEELHOUSE, 2006), mas se a infecção ocorrer em gestação anterior ou antes do cruzamento, a imunidade e memória imunológica desenvolvidas irão garantir parto normal e nascimento de neonato não infectado

(WATSON; BEVERLEY, 1971; McCOLGAN et al., 1988). Contudo, indícios de que a proteção imunológica não é absoluta também foram publicados (EDWARDS; DUBEY, 2013).

2.2.5 Diagnóstico da toxoplasmose ovina

O diagnóstico para *T. gondii* pode ser realizado por meio de testes sorológicos, biológicos, moleculares e métodos histológicos e/ou imunohistoquímicos ou uma combinação destes métodos (DUBEY, 2010).

Os métodos de diagnósticos são classificados como diretos e indiretos. Os métodos indiretos têm como objetivo confirmar a presença do *T. gondii* nos tecidos, excreções ou fluidos corporais (VELARDE et al., 2009). Enquanto que os testes indiretos geralmente são estabelecidos por meio da pesquisa de anticorpos anti- *T. gondii* no soro dos animais (RAGOZA et al., 2008; SOCCOL et al., 2009; SILVA et al., 2010; PEREIRA et al., 2012).

Para o diagnóstico da infecção por *T. gondii* pode-se utilizar vários testes para detecção de anticorpos IgG e IgM (DUBEY, 2010). Vários testes são indicados como Sabin-Feldman ou teste do corante (GARCIA-VARQUEZ et al., 1993), Aglutinação Modificada (MAT) (DUBEY, 2010), Aglutinação em Látex (LAT) (Gondim et al., , 1999), Hemaglutinação Indireta (HAI) (HASHEMI-FESHARKI, 1996; LANGONI et al., 1999; GORMAN et al., 1999; VITOR et al., 1999), Imunofluorescência Indireta (RIFI) (MAINARDI et al., 2003; FIGLIUOLO et al., 2004; UZÊDA et al., 2004), Aglutinação em Látex (HASHEMI-FESHARKI, 1996; GONDIN et al., 1999; JITTAPALAPONG et al., 2008), Aglutinação Direta (MAD) (KLUN et al., 2006) e Reação Imunoenzimática–ELISA (SKJERVE et al., 1998; CAVALCANTE, 2004; SAWADOGO et al., 2005) e dot-ELISA (BAHIA et al., 1993).

Toxoplasma gondii pode ser isolado a partir de amostras de tecidos infectados como sangue, fluído cerebrospinal, tecidos fetais e/ou placentários mediante a inoculação intraperitoneal em camundongos, porém requer de três a seis semanas e a manutenção de animais em biotérios (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; DUBEY, 2010).

O exame histopatológico não é uma técnica conclusiva para o diagnóstico da infecção por *T. gondii*, pois o parasito pode ser confundido com núcleos ou fragmentos nucleares que se coram de forma semelhante devido à ausência de características tintoriais próprias (FARREL et al., 1952; TSUNEMATSU et al., 1964; BARBOSA, 1988). Entretanto foi utilizada por diversos autores que relataram a observação frequente de taquizoítos e lesões macro e microscópicas na placenta, membranas fetais e tecidos fetais (MCSPORRAN et al., 1985; DUBEY et al., 1986; UGGLA et al., 1987; DUBEY, 1988).

A técnica da imunohistoquímica é específica e confirma o diagnóstico em algumas horas, sendo capaz de detectar pequenas quantidades de antígeno pela observação de taquizoítos ou cistos com bradizoítos nos tecidos (DUBEY; LIN, 1994; VON WASIELEWSKI et al., 1997; DUBEY, 2010). O diagnóstico ainda pode ser realizado por amplificação específica do DNA parasitário a partir de tecidos infectados utilizando a técnica da Hibridação e Reação em Cadeia da Polimerase (MACEDO, 1994; INNES; ESTEBAN-REDONDO, 1997; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; KOMPALIC-CRISTO et al., 2005). Avanços no conhecimento do genoma de *T. gondii* tornaram possível a utilização da Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase para detecção do parasito. Esta técnica se fundamenta na amplificação específica de determinados genes ou fragmentos de genes, detectando com segurança, rapidez e sensibilidade o parasito em qualquer amostra do animal infectado (WONG; REMINGTON, 1993; BASTIEN, 2002). A PCR é uma técnica muito sensível, sendo capaz de detectar infecções por um único taquizoíto (WONG; REMINGTON, 1994; BASTIEN, 2002). Segundo Dehkordi et al. (2013), a PCR é um método de diagnóstico preciso, seguro, sensível, específico e rápido que pode ser utilizado para monitorar o parasito no leite. A parasitemia tem sido detectada com maior sensibilidade por meio dos métodos de biologia molecular, em especial a PCR com a vantagem de demonstrar maior sensibilidade quando comparado ao isolamento do parasito em culturas de tecido (MEIRELES, 2001).

2.2.6 Prevenção e controle da toxoplasmose ovina

O controle e a prevenção da toxoplasmose passam por medidas que visam evitar ou minimizar a contaminação da água e alimentos pelos gatos como controle dessa população na propriedade, manutenção desses animais fora da área de criação dos ovinos e o correto armazenamento de grãos e feno (BLEWETT; TREES, 1987; BUXTON, 1998; DUBEY, 1994).

Outras medidas incluem a remoção imediata seguida de incineração de abortos e membranas fetais e exposição de animais introduzidos nas propriedades ao ambiente contaminado antes da cobertura (WATSON; BEVERLEY, 1971; BUXTON 1998; DUBEY, 1994).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar a cinética de anticorpos em ovelhas naturalmente infectadas por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*.

3.2 Específicos

- Determinar a taxa de transmissão vertical de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* na espécie ovina;
- Determinar a taxa de aborto por *N. caninum* e *T. gondii* em uma população de ovelhas naturalmente infectadas;
- Avaliar a incidência de infecção por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* na espécie ovina;
- Determinar a taxa de transmissão vertical de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*.

CAPÍTULO I
Incidência e taxa de transmissão vertical de *Neospora caninum* em ovelhas

Incidência e taxa de transmissão vertical de *Neospora caninum* em ovelhas

RESUMO: A neosporose ovina ainda é pouco estudada, mas a infecção por *N. caninum* nesta espécie pode determinar a ocorrência de aborto e nascimento de borregos fracos e debilitados. Objetivou-se neste estudo avaliar a incidência da infecção natural por *Neospora caninum* e a taxa de transmissão vertical em ovelhas. Um rebanho de 50 ovelhas foi monitorado por meio da técnica de ELISA por um período de seis meses e suas crias também foram submetidas a pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* para determinar a taxa de transmissão vertical pela técnica de Imunofluorescência Indireta. A prevalência inicial e final da infecção por *N. caninum* foi de 26,0% (13/50) e 72,0% (36/50), respectivamente, e a incidência da infecção por *N. caninum* neste estudo foi de 62,2% (23/37). A taxa de transmissão vertical neste estudo foi de 15,4% (2/13). Neste estudo foi demonstrada uma elevada taxa de incidência de infecção por *N. caninum* em ovinos, sendo este o primeiro relato do estudo da incidência de *N. caninum* em ovelhas naturalmente infectadas.

Palavras-chave: Neosporose, ovelhas, resposta imune.

ABSTRACT: Little is known about neosporosis in sheep, but it may produce abortions and birth of weak and debilitated lambs. The purpose of this study was to evaluate the incidence of natural infection by *Neospora caninum* and the vertical transmission rate in pregnant ewes. Thus, a flock of 50 sheep was submitted a serological monitoring by ELISA during six months, and the lambs were also subjected to IFAT to research of antibodies anti-*N. caninum* to determine vertical transmission. The initial and final prevalence for *N. caninum* were 26.0% (13/50) and 72.0% (36/50), respectively, and the incidence of *N. caninum* infection in this study was 62.2% (23/37). The vertical transmission rate in this study was 15.4% (2/13). In this study was observed a high incidence rate of *N. caninum* infection, in sheep, thus this is the first study on the *N. caninum* incidence in naturally infected ewes.

Keywords: Neosporosis, ewes, immune response.

1. INTRODUÇÃO

As doenças infectocontagiosas são consideradas as principais responsáveis por perdas econômicas nos rebanhos ovinos (PINHEIRO et al., 2000). Estudos experimentais recentes em pequenos ruminantes sugerem que a neosporose pode ser uma importante causa de abortos nesses animais (MESQUITA et al., 2013; ARRANZ-SOLÍS et al., 2015; ARRANZ-SOLÍS et al., 2016; PORTO et al., 2016).

Apesar de *N. caninum* ser considerado um importante agente infeccioso, responsável por abortos e/ou falhas reprodutivas em bovinos (DUBEY et al., 2007; DUBEY; SCHARES, 2011), sua importância epidemiológica, clínica e econômica, em ovinos e caprinos, ainda não está completamente compreendida com uma lacuna nessa área (ARRANZ-SOLÍS et al., 2015).

Estudos em bovinos demonstraram que a transmissão vertical ou congênita de *N. caninum* é considerada a mais importante e pode ocorrer por diversas gerações (DUBEY; SCHARES, 2011). A transmissão transplacentária de *N. caninum* é também considerada em pequenos ruminantes (MORENO et al., 2012; ARRANZ-SOLÍS et al., 2015; ARRANZ-SOLÍS et al., 2016; PORTO et al., 2016). Em ovinos infectados experimentalmente por *N. caninum*, a taxa de transmissão da mãe para sua progênie foi de 10-12% (BUXTON et al., 2001).

Moreno et al. (2012) demonstraram que *N. caninum* desempenha um papel significativo em casos de aborto na espécie ovina na Espanha. Estudo experimental conduzido por Arranz-Solís et al. (2015) em ovinos demonstraram que o estágio da gestação tem papel fundamental no curso da neosporose em ovelhas gestantes. Os autores relataram que a infecção por *N. caninum* no terço inicial e médio de gestação causou 100% de aborto, enquanto que no terço final da gestação resultou no nascimento de cordeiros prematuros infectados, fracos ou clinicamente saudáveis.

Os resultados dos estudos experimentais por *N. caninum* em ovelhas sugerem que infecções no terço final da gestação pode ter consequências mais severas que a infecção em bovinos durante o mesmo período (JOLLEY et al., 1999; BENAVIDES et al., 2012; ARRANZ-SOLÍS et al., 2015).

Objetivou-se neste estudo avaliar a incidência da infecção natural por *Neospora caninum* e a taxa de transmissão vertical em fêmeas ovinas durante a gestação em uma criação comercial localizada no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Composição dos grupos

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco sob o número de licença 117/2015. Foram selecionadas 50 ovelhas em idade reprodutiva da raça Santa Inês criadas em regime semi-intensivo em uma propriedade localizada na região Agreste do estado de Pernambuco, Brasil.

Para compor os grupos experimentais, inicialmente todas as ovelhas do rebanho foram submetidas a testes sorológicos (ELISA) para detecção das fêmeas naturalmente infectadas por *Neospora caninum*. Após a triagem, os animais foram divididos em dois grupos: G1 composto por 13 animais infectados por *N. caninum* e G2 composto por 37 animais não infectados (grupo controle). Todos os animais dos grupos G1 e G2 foram negativos para *Toxoplasma gondii*, *Brucella* sp. e *Clamydophila abortus*.

2.2. Diagnóstico da gestação

As ovelhas foram submetidas à estação de monta na proporção de vinte fêmeas para cada reprodutor. Trinta e cinco dias após o término da estação de monta, as ovelhas foram submetidas à ultrassonografia transretal para confirmar a gestação.

2.3. Monitoramento sorológico

Para o estudo da incidência da infecção por *Neospora caninum*, as 50 ovelhas do G1 e G2 foram monitoradas por um período de seis meses, sendo realizadas coletas de sangue mensais. A pesquisa de anticorpos IgG anti- *N. caninum* nas ovelhas foi realizada por meio da técnica de ELISA indireto descrita por Alvarez-Garcia et al. (2003). Os animais que ao longo do monitoramento soroconverteram foram automaticamente incluídos no G1.

2.4. Avaliação da taxa de transmissão vertical por *N. caninum*

Para o estudo da transmissão vertical de *N. caninum* foram considerados positivos os borregos que apresentaram título pré-colostral de 25 na RIFI (ALVAREZ-GARCIA et al., 2003).

2.5. Métodos analíticos

Preparo do antígeno para ELISA e RIFI

O isolado Nc-SP7 de *N. caninum* utilizado neste estudo foi mantido em cultivo de monocamadas de células Marc-145 seguindo condições descritas por Regidor-Cerrillo et al. (2010). O número de taquizoítos viáveis foi determinado por contagem em câmara de Neubauer utilizando azul de Tripán. Os taquizoítos de *N. caninum* livres foram rompidos por passagem

em agulha, purificados através de filtro e em seguida foram liofilizados e armazenados a -80 °C até as análises de ELISA.

Para a RIFI, os taquizoítos purificados foram ressuspensos em 0,2% (v/v) de formalina em PBS com concentração ajustada para 10^7 taquizoítos/ml, aliqüotados e armazenados a -20 °C até à sua utilização.

ELISA

Os níveis de anticorpos IgG específicos contra *N. caninum* foram mensurados por meio da técnica de ELISA indireto, utilizando antígeno liofilizado de *N. caninum* para sensibilizar as microplacas, seguindo protocolo de Álvarez-García et al. (2003) modificado. O antígeno foi utilizado na concentração de 10^5 taquizoítos/poço diluídos em solução de carbonato-bicarbonato (0,1 M, pH 9,6), adicionando o volume final de 100 µL em cada poço. Como conjugado foi utilizada Proteína-G-biotina (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) diluída em PBS-Tween 5% na proporção de 1:15000. Foi utilizado como substrato a solução ABTS (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). A reação foi parada após 20 minutos em temperatura ambiente adicionando-se solução de ácido oxálico 0,3M e a leitura foi realizada em um espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific Oy, FI- 01620, Vantaa, Finland) utilizando comprimento de onda de 405nm (OD405). Os valores da densidade ótica foram convertidos em índice relativo por cento (IRPC) usando-se a seguinte fórmula: $IRPC = (OD405 \text{ amostra} - OD405 \text{ controle negativo}) / (OD405 \text{ controle positivo} - OD405 \text{ controle negativo}) \times 100$. Um valor de $IRPC \geq 10$ indica um resultado positivo. Para validação das reações foi utilizada duplicata de soros testados previamente e sabidamente positivo e negativo para *N. caninum*.

Reação de imunofluorescência indireta

Para a detecção de anticorpos IgG anti-*N. caninum* no soro pré-colostral foi usada a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) de acordo com Dubey (1998). O ponto de corte usado foi de 1:25 (ALVAREZ-GARCIA et al., 2003). Como antígeno foi utilizado taquizoítos da cepa NC1 de *N. caninum* mantidos em cultivo de células Marc-145. Em todas as reações foram incluídos soros controles positivo e negativo de ovinos previamente conhecidos. Além disto foram utilizados anticorpos anti IgG-ovina conjugados ao isotiocianato de fluoresceína (Anti-Sheep IgG (whole molecule) - FITC, Sigma-Aldrich®, St. Louis, Estados Unidos).

2.6 Análise Estatística

Realizou-se análise estatística descritiva através das frequências relativas e absolutas das variáveis (Thrusfield, 2004). O software EPIINFO™ 7 foi utilizado para a execução dos cálculos estatísticos e o nível de significância adotado foi de 5,0%.

3. RESULTADO

A prevalência inicial para *Neospora caninum* no momento 0 de avaliação foi de 26,0% (13/50). A prevalência final após o monitoramento sorológico realizado por seis meses com coletas mensais foi de 72,0% (36/50). A incidência da infecção por *Neospora caninum* neste estudo foi de 62,2% (23/37) (Tabela 1).

Tabela 1 – Incidência da infecção por *N. caninum* em um rebanho ovino naturalmente infectado.

Variáveis	Período						
	0	30	60	90	120	150	180
Incidência	0,0%	18,9%	6,7%	7,1%	3,8%	8,0%	39,1%
n	0	7	2	2	1	2	9
N	37	37	30	28	26	25	23

n – Casos novos; N – Total de ovelhas suscetíveis.

Não houve ocorrência de aborto nos animais do G1 e G2. Na tabela 2 observa-se a média de IRPC das ovelhas do G1 durante a gestação, contudo houve tendência de elevação entre o 30^o e 120^o dias de gestação e declínio na época do parto.

Tabela 2: Resultado das médias do IRPC no ELISA das ovelhas gestantes

Grupo	Variáveis	Período					
		0	30	60	90	120	150
G1	Média	20,501	32,446	29,458	26,409	25,346	20,051
	DP	17,075	28,527	23,535	20,100	21,850	7,413

Nove ovelhas do G1 que gestaram neste período, pariram um total de treze borregos e destes, dois, (um macho e uma fêmea), da mesma ovelha foram positivos para anticorpos IgG anti-*N. caninum* na RIFI. A taxa de transmissão vertical neste estudo foi de 15,4% (2/13) (Tabela 3). No G2, nasceram 15 borregos todos negativos na RIFI.

Tabela 3: Resultados da sorologia (RIFI) dos borregos das ovelhas do G1

Grupo	Ovelhas	Borrego	Título de IgG anti- <i>N. caninum</i> *
G1	E1	EK1	Negativo
G1	E2	EK2	Negativo
G1	E3	EK3	Negativo
G1	E4	EK4a	Negativo
G1		EK4b	Negativo
G1	E5	EK5	Negativo
G1	E6	EK6a	Negativo
G1		EK6b	Negativo
G1	E7	EK7a	Negativo
G1		EK7b	Negativo
G1	E8	EK8	Negativo
G1	E9	EK9a	25
G1		EK9b	25

a e b – Borregos filhos da mesma fêmea; * Soro pré-colostral

4. DISCUSSÃO

Embora *N. caninum* seja reconhecido como uma das principais causas de aborto em bovinos no mundo (DUBEY et al., 2007; DUBEY; SHARES, 2011), sua relevância clínica, econômica e epidemiológica em pequenos ruminantes ainda não está totalmente esclarecida. Estudo experimental recente realizado por Arranz-Solís et al. (2015) demonstrou que o estágio da gestação tem papel fundamental no curso da neosporose em ovelhas gestantes. Os autores relataram que a infecção por *N. caninum* no terço inicial e médio de gestação causou 100% de aborto, enquanto que no terço final da gestação resultou no nascimento de cordeiros prematuros infectados, fracos ou clinicamente saudáveis.

Este é o primeiro estudo sobre a incidência de infecção por *N. caninum* em ovelhas naturalmente infectadas. O nosso estudo foi realizado em uma propriedade que adotava o regime semi-intensivo de criação e algumas falhas no manejo foram verificadas como a ausência de um local apropriado para estocagem de ração e a inexistência de um programa de controle de roedores, além da presença de cães no rebanho. Estes fatores podem ter influenciado nos resultados da elevada incidência observada neste rebanho. Mcallister et al. (1998) recomenda que é importante evitar o contato de cães com os alimentos e o controle periódico de roedores, principalmente nos estábulos para reduzir o risco de infecção por *N. caninum*. Coberlline et al. (2006) também relataram uma maior taxa de infecção por *Neospora caninum*

em animais criados em sistema intensivo e semi-intensivo pela maior concentração de animais e exposição dos animais aos alimentos contaminados.

Inquéritos sorológicos têm demonstrado prevalências elevadas próximas de 30,8% em ovinos e caprinos sem histórico de aborto em alguns rebanhos no Brasil (DUBEY; SHARES, 2011; ROSSI et al., 2011; PAIZ et al., 2015; PINHEIRO et al., 2015). Prevalências semelhantes às observadas neste estudo foram relatadas em outras regiões do Brasil, inclusive no estado de Pernambuco (ROSSI et al., 2011; TEMBUE et al., 2011; PAIZ et al., 2015; PINHEIRO et al., 2015). Entretanto alguns estudos relataram prevalências menores do que a descrita no nosso estudo, variando entre 4,69-23,5% (LANGONI et al., 2011; MACHADO et al., 2011; MORAES et al., 2011; ANDRADE et al., 2012; MORIKAWA et al., 2014), demonstrando uma variação dos resultados de acordo com a região.

A cinética de anticorpos anti-*N. caninum* em ovelhas gestantes naturalmente infectadas também não foi estudada anteriormente. Os resultados encontrados nos períodos de 30 a 120 dias de gestação demonstraram uma elevação no índice do IRPC no ELISA. Na época do parto, a concentração de anticorpos tendeu a baixar provavelmente por uma queda na resposta imunológica nesta fase da gestação e com isso diminuição dos títulos de anticorpos.

Por outro lado, a taxa de transmissão vertical em nosso estudo foi de 15,4%. A neosporose pode provocar aborto e mortalidade neonatal e *N. caninum* foi detectado no cérebro de três de 18 fetos abortados na Nova Zelândia (HOWE et al., 2008), 2% dos fetos abortados na Itália (MASALA et al., 2007). Oeste et al. (2006) também encontraram anticorpos em 4 fetos dos 5 abortados na Nova Zelândia. Estes estudos indicam transmissão transplacentária de *N. caninum* em ovinos com base nos achados sorológicos e moleculares. Apesar de, no presente estudo não ter sido observados casos de aborto foi verificada a transmissão vertical com o nascimento de cordeiros positivos na sorologia pré colostrais.

De acordo com um estudo realizado na Nova Zelândia por Hassain et al. (2015), no primeiro ano após a infecção experimental de 25 ovelhas com *N. caninum* não ocorreu a transmissão vertical do parasito. No segundo ano deste mesmo estudo, um borrego recém-nascido que morreu após cinco dias de nascido foi positivo para *N. caninum* no *Western blot*. Além deste, outros quatro animais que nasceram a termo também foram positivos na sorologia. Estudos anteriores relataram que a taxa de transmissão vertical em ovelhas infectadas experimentalmente com *N. caninum* antes do acasalamento foi de 10-12% (BUXTON et al., 2001).

No estudo de Jolley et al. (1999) foram observadas taxas de mortalidade de 75% em cordeiros nascidos de ovelhas inoculadas no ano anterior e taxa de 70% naquelas que foram re-

inoculadas no ano seguinte. Neste estudo ficou demonstrada a transmissão vertical de *N. caninum* para fetos de ovelhas com infecção latente. Nosso estudo demonstrou que ovelha infectada durante a gestação com dose e cepa desconhecida de *N. caninum* pode transmitir infecção por esta via a sua prole. Esta ovelha apresentou inicialmente alto título de anticorpos anti-*N. caninum* no início da gestação com queda gradual durante a gestação e pariu dois cordeiros positivos, comprovando a transmissão transplacentária e ausência de aborto. Barr et al. (1993) observaram que a infecção congênita de fetos de ovelhas cronicamente infectadas por *N. caninum* resulta em aborto sequencial semelhante ao relatado em bovinos.

Estudos desta natureza, envolvendo animais naturalmente infectados são difíceis de realizar, principalmente em relação a algumas perdas amostrais como o descarte de animais, mas por outro lado se revestem de grande importância, pois são estudos observacionais e que refletem o que ocorre quando alguns parâmetros como dose de infecção, estágio de gestação e virulência do parasito não são controlados. Desta forma outros estudos desta natureza devem ser conduzidos para agregar dados epidemiológicos que contribuam para o estudo da neosporose ovina.

REFERÊNCIA

- ALVAREZ-GARCÍA, G.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; COSTAS, E.; REBORDOSA, X.; ORTEGA-MORA, L. M. (2003) Influence of age and purpose for testing on the cut off selection of serological methods in bovine neosporosis. *Vet Res*, 34(3): 341–352.
- ANDRADE, M. M.; CARNEIRO, M.; MEDEIROS, A. D.; NETO, V. A.; VITOR, R. W. (2013). Seroprevalence and risk factors associated with ovine toxoplasmosis in Northeast Brazil. *Paradite*. 20: 20.
- ARRANZ-SOLÍS, D.; BENAVIDES, J.; REGIDOR-CERRILLO, J.; FUERTES, M.; FERRE, I.; DEL FERRERAS, M.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; HEMPHILL, A.; PEREZ, V.; ORTEGA-MORA, L. M. (2015) Influence of the gestational stage on the clinical course, lesional development and parasite distribution in experimental ovine neosporosis. *Vet Res*, 46:19.
- ARRANZ-SOLÍS, D.; BENEVIDES, J.; REGIDOR-CERRILLO, J.; HORCAJO, P.; CASTAÑO, P.; FERRERAS, M. D. C.; JIMÉNEZ-PELAYO, L.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; FERR, I.; HEMPHILL, A.; PÉREZ, V.; ORTEGA-MORA, L. M. (2016) Systemic and local immune responses in sheep after *Neospora caninum* experimental infection at early, mid and late gestation. *Vet Res*, 47: 2.

- BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; BREITMEYER, R.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M. L.; REYNOLDS, J.; CHAUVET, A. E.; DUBEY, J. P.; ARDANS, A. A. (1993) Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992). *J Am Vet Med Assoc*, 202(1): 113-117.
- BENAVIDES, J.; KATZER, F.; MALEY, S. W.; BARTLEY, P. M.; CANTON, G.; PALAREA-ALBALADEJO, J.; PURSLOW, C. A.; PANG, Y.; ROCCHI, M. S.; CHIANINI, F.; BUXTON, D.; INNES, E. A. (2012) High rate of transplacental infection and transmission of *Neospora caninum* following experimental challenge of cattle at day 210 of gestation. *Vet Res*, 43:83.
- BUXTON, D.; WRIGHT, S.; MALEY, S. W.; RAE, A. G.; LUNDEN, A.; INNES, E. A.; (2001) Immunity to experimental neosporosis in pregnant sheep. *Parasite Immunol*. 23(2): 85–91.
- COBERLLINE, L. G.; SMITH, D. R.; PESCADOR, C. A.; SCHMITZ, M.; CORREA, A.; STEFFEN, D. J.; DRIEMERIER, D. (2006) Herd – level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms southern Brazil. *Prev Vet Med*, 74(2-3):130-141.
- DUBEY, J.P. (1998) Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, 28(7): 1019-1024.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. (2007) Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev*, 20(2): 323-367.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G. (2011) Neosporosis in animals-the last five years. *Vet Parasitol*, 180(1-2): 90–108.
- HASSAIN, S. S.; HOWE, L.; POMROY, W. E.; WEST, D. M.; HARDCASTLE, M.; WILLIAMSON, N. B. (2015) Vertical transmission in experimentally infected sheep despite previous inoculation with *Neospora caninum* NcNZ1 isolate. *Vet Parasitol*, 208(3-4): 150–158.
- HOWE, L.; WEST, D. M.; COLLETT, M. G.; TATTERSFIELD, G.; PATTISON, R. S.; POMROY, W. E.; KENYON, P. R.; MORRIS, S. T.; WILLIAMSON, N. B. (2008) The role of *Neospora caninum* in three cases of unexplained ewe abortions in the southern North Island of New Zealand. *Small Rumin Res*, 75(2-3): 115–122.
- JOLLEY, W. R.; MCALLISTER, M. M.; MCGUIRE, A. M.; WILLS, R. A. (1999) Repetitive abortion in *Neospora*-infected ewes. *Vet Parasitol*, 82(3): 251–257.

- LANGONI, H.; GRECA JUNIOR, H.; GUIMARÃES, F. F.; ULLMANN, L. S.; GAIO, F. C.; UEHARA, R. S.; ROSA, E. P.; AMORIM, R. M.; SILVA, R. C. (2011) Serological profile of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection in commercial sheep from São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol*, 177(1-2): 50–54.
- MACHADO, G. P.; KIKUTI, M.; LANGONI, H.; PAES, A. C. (2011) Seroprevalence and risk factors associated with neosporosis in sheep and dogs from farms. *Vet Parasitol*, 182(2-4): 356–358.
- MASALA, G.; PORCU, R.; DAGA, C.; DENTI, S.; CANU, G.; PATTA, C.; TOLA, S.; (2007) Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia Italy, by PCR. *J Vet Diagn Invest*, 19(1): 96–98.
- MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; MCGUIRE, A. M. (1998) Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*, *Int J Parasitol*, 28(9): 1473-1478.
- MESQUITA, L. P.; NOGUEIRA, C. I.; COSTA, R. C.; ORLANDO, D. R.; BRUHN, F. R. P.; LOPES, P. F. R.; NAKAGAKI, K. Y. R.; PECONICK, A. P.; SEIXAS, J. N.; BEZERRA JUNIOR, P. S.; RAYMUNDO, D. L.; VARASCHIN, M. S. (2013) Antibody kinetics in goats and conceptuses naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet Parasitol*, 196(3-4): 327–333.
- MORAES, L. M. B.; RAIMUNDO, J. M.; GUIMARÃES, A.; SANTOS, H. A.; JUNIOR, G. L. M.; MASSARD, C. L.; MACHADO, R. Z.; BALDANI, C. D. (2011) Occurrence of anti-*Neospora caninum* and anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in goats and sheep in western Maranhão, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, 20(4): 312-317.
- MORENO, B.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; VILLA, A.; NAVARRO, A.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ORTEGA-MORA, L. M. (2012) Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. *Vet Parasitol*, 187(1-2): 312-318.
- MORIKAWA, V. M.; ZIMPEL, C. K.; PAPLOSKI, I. A. D.; LARA, M. C. C. S. H.; VILALOBOS, E. M. C.; ROMALDINI, A. H. C. N.; OKUDA, L. H.; BIONDO, A. W.; BARROS FILHO, I. R. (2014) Occurrences of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in Barbary sheep at Curitiba zoo, southern Brazil. *Braz J Vet Parasitol*, 23(2): 255-259.
- PAIZ, L. M.; SILVA, R. C. D. A.; MENOZZI, B. D.; LANGONI, H. (2015) Antibodies to *Neospora caninum* in sheep from slaughterhouses in the state of São Paulo, Brazil. *Braz J Vet Parasitol*, 24(1): 95-100.

- PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F.; HADDAD, J. P. A. (2000) Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 52(5): 534-543.
- PINHEIRO, A. F.; BORSUK, S.; BERNE, M. E.; PINTO, L. S.; ANDREOTTI, R.; ROOS, T.; ROLOFF, B. C.; LEITE, F. P. (2015). Use of ELISA based on NcSRS2 of *Neospora caninum* expressed in *Pichia pastoris* for diagnosing neosporosis in sheep and dogs. *Ver Bras Parasitol Vet*. 24(2) 148-154.
- PORTO, W. J. N.; CERRILLO, J. R.; KIM, P. C. P.; BENAVIDES, J.; MOTA, R. A.; ORTEGA-MORA, L. M. (2016) Experimental caprine neosporosis: the influence of gestational stage on the outcome of infection. *Vet Res*. 47:29.
- REGIDOR-CERRILLO, J., GÓMEZ-BAUTISTA, M.; DEL POZO, I.; JIMÉNEZ-RUIZ, E.; ADURIZ, G.; ORTEGA-MORA, L. M. (2010) Influence of *Neospora caninum* intra-specific variability in the outcome of infection in a pregnant BALB/c mouse model. *Vet Res*, 41(4): 52.
- ROSSI, G. F.; CABRAL, D. D.; RIBEIRO, D. P.; PAJUABA, A. C. A. M.; CORRÊA, R. R.; MOREIRA, R. Q.; MINEO, T. W. P.; MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O. (2011) Evaluation of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Uberlândia, Minas Gerais State, Brazil, by different serological methods. *Vet Parasitol*, 175(3-4): 252–259.
- SALABERRY, S. R. S.; OKUDA, L. H.; NASSAR, A. F. C.; CASTRO, J. R.; RIBEIRO, A. M. C. L. (2010) Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in sheep flocks of Uberlândia county, MG. *Rev Bras Parasitol Vet*, 19(3): 148-151.
- TEMBUE, A. A. S. M.; RAMOS, R. A. N.; SOUZA, T. R.; ALBUQUERQUE, A. R.; COSTA, A. J.; MEUNIER, I. M. J.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C. (2011). Serological survey of *Neospora caninum* in small ruminants from Pernambuco State, Brazil. *Ver Bras Parasitol Vet*. 20(3): 246-248.
- THRUSFIELD, M. V. *Epidemiologia Veterinária*. 2ª ed. São Paulo: Roca, 2004.

CAPÍTULO II
Incidência e cinética de anticorpos em ovelhas e fetos infectados naturalmente por
Toxoplasma gondii

Incidência e cinética de anticorpos em ovelhas e fetos infectados naturalmente por *Toxoplasma gondii*

RESUMO: Ovinos são comumente infectados pelo protozoário *Toxoplasma gondii* e este parasito pode causar reabsorção e morte embrionária precoce, morte fetal e mumificação, aborto, natimortos e morte neonatal. Entretanto, informações sobre a resposta imune humoral na infecção natural são escassas. Neste estudo, a cinética dos anticorpos foi estudada em ovelhas naturalmente infectadas por *Toxoplasma gondii* e de seus conceptos. Também foi determinada a incidência da infecção por um período de seis meses de monitoramento nas ovelhas dos grupos 1 (infectadas) e 2 (não infectadas). No G1, problemas reprodutivos relacionados com a toxoplasmose (aborto) ocorreu em 37,5% das ovelhas infectadas por *T. gondii*. A incidência da infecção por *T. gondii* foi 28,9% e a taxa de transmissão congênita foi 38,9%. Os títulos de IgG maternos mostraram-se mais elevados antes do aborto, nos dois últimos meses da gestação e diminuíram no momento que antecedeu o parto no G1. Estes resultados indicam que *T. gondii* foi responsável pela ocorrência de alterações importantes na resposta imune de ovelhas naturalmente infectadas. O elevado índice de conceptos infectados sugere que a infecção congênita é uma importante via de transmissão e manutenção de *T. gondii* em ovelhas naturalmente infectadas.

Palavras-chave: Ovelhas, Toxoplasmose, Transmissão congênita.

ABSTRACT: Sheep are commonly infected by the protozoan *Toxoplasma gondii* and this parasite may cause early resorption and embryonic death, fetal death and mummification, abortion, stillbirth, and neonatal deaths. However, informations regarding the humoral immune response in the natural infection are scarce. In this study, the kinetics of antibodies was studied in ewes naturally infected by *Toxoplasma gondii*, as well as their conceptuses. The infection incidence was determined by serological monitoring of the ewes infected (G1) and non infected (G2) during six months. In G1, the reproductive problems concerning to toxoplasmosis (abortion) have occurred in 37.5% of the ewes infected by *T. gondii*. The infection incidence by *T. gondii* was 28.9% and the congenital transmission rate was 38.9%. There was an increased of titres of maternal IgG prior to the abortion, in the last two months of the gestation, and decreased at the time before the parturition in G1. These results indicate that *T. gondii* was responsible for the occurrence of important alterations in the humoral immune response of naturally infected ewes. The high proportion of infected conceptuses suggests that congenital

infection is one important route of transmission and maintenance of *T. gondii* for naturally infected ewes.

Keywords: Ewes, Toxoplasmosis, Congenital transmission.

1. INTRODUÇÃO

A infecção por *Toxoplasma gondii* é altamente prevalente em humanos e animais em todo o mundo (DUBEY; BEATTIE, 1988). A toxoplasmose é causa de grandes perdas econômicas para a indústria de ovinos em todo o mundo (DUBEY; BEATTIE, 1988; BUXTON et al., 2007).

Anticorpos contra *T. gondii* foram encontrados em ovinos ao redor do mundo. A soroprevalência mostrou-se aumentada com a idade, alcançando 95% em ovelhas com 6 anos em alguns rebanhos, sugerindo que a maioria dos animais adquiriram infecção após o nascimento. Em geral, a maior parte dos ovinos adquiriram infecção antes dos 4 anos de idade, mas um terço das ovelhas ainda foram soronegativas em rebanhos altamente endêmicos (DUBEY; KIRKBRIDE, 1989a). A prevalência também foi elevada em ovelhas onde surtos de abortos epizooticos foram relatados (DUBEY; KIRKBRIDE, 1989a).

De acordo com dados revisados por Dubey (2009), poucos estudos analisaram os fatores de risco associados com soropositividade para *T. gondii* em ovinos. Em um estudo realizado na Sérvia, ovelhas de rebanhos de estatais apresentaram maior soropositividade do que ovelhas de rebanhos privados (KLUN et al., 2006). Na Itália, Vesco et al. (2007) relataram que a presença de gatos na fazenda, utilizando água de superfície para beber e o tamanho da propriedade foram associados com a soropositividade. No Brasil, Magalhães et al. (2016) identificaram que em ambiente insular, a alta concentração de gatos está associada ao maior risco de infecção de ovinos por *Toxoplasma gondii*.

Pereira-Bueno et al. (2004) realizaram uma investigação em fetos abortados na Espanha e *T. gondii* foi detectado em 37 (34,9%) de 106 fetos em uma ou mais técnicas (sorologia, histologia e PCR); 4 nos três testes, 7 na PCR e sorologia, 2 na histologia e sorologia e 24 apenas em um teste (6 na histologia, 1 na PCR e 17 na sorologia).

Até recentemente, a visão predominante era que a maioria dos ovinos adquiriam infecção por *T. gondii* após o nascimento (DUBEY, 2009). Estudos realizados por Buxton et al. (2006) e Rodger et al. (2006) afirmaram que os achados da transmissão congênita de *T. gondii* em ovelhas persistentemente infectadas é pouco frequente. Vários artigos publicados por Duncanson et al. (2001); Morley et al. (2005); Williams et al. (2005) e Morley et al. (2008) onde propuseram que a transmissão transplacentária de *T. gondii* em ovinos seria mais comum do que se acreditava anteriormente. No entanto, todas as provas apresentadas basearam-se na detecção de DNA de *T. gondii* por PCR.

Com o objetivo de estabelecer alterações na resposta imune humoral e a relação com a ocorrência de infecção transplacentária endógena e desordens reprodutivas, o objetivo deste

estudo foi avaliar a cinética de IgG anti-*T. gondii* em ovinos e conceptos naturalmente infectados por *T. gondii* e a incidência da infecção por *T. gondii* por um período de seis meses em um rebanho de ovino.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Ovinos e coleta de amostras de sangue

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), número 117/2015.

Para composição dos grupos experimentais foram selecionadas 15 ovelhas multíparas naturalmente infectadas por *T. gondii* (G1), identificadas pela presença de anticorpos específicos na reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ELISA. Todos os ovinos do G1 foram soronegativos para *Neospora caninum*, *Brucella* sp. e *Clamydophila abortus*. Como controle (GII) foram utilizadas 45 ovelhas negativas para *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Brucella* sp. e *Clamydophila abortus*. Todos os animais utilizados neste estudo eram procedentes de um mesmo rebanho da raça Santa Inês e localizado na região Agreste do estado de Pernambuco, Brasil.

2.2. Diagnóstico de gestação

As ovelhas do G1 e G2 foram submetidas à monta natural e a gestação foi confirmada trinta e cinco dias após a monta, através da ultrassonografia transretal que também foi utilizada para o monitoramento mensal da viabilidade fetal.

2.3. Monitoramento sorológico dos grupos experimentais (prevalência e incidência)

Para o estudo da prevalência e incidência foram utilizados 60 animais que compuseram os grupos experimentais.

Para o estudo da incidência da infecção por *T. gondii*, amostras de sangue de todas as ovelhas do grupo G1 e G2 foram coletadas quinzenalmente por um período de seis meses e submetidas à pesquisa de anticorpos IgG-anti *T. gondii* empregando a técnica ELISA. Amostras de sangue foram coletadas de cada ovelha nos dias 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 165, 180 e 195, no dia do parto ou aborto. Amostras de sangue das crias que nasceram saudáveis foram coletadas no dia do nascimento, antes da ingestão do colostro. As amostras de sangue foram obtidas por punção da veia jugular em tubos Vacutainer® sem anticoagulante e centrifugadas a $1090 \times g$ durante 10 min. O soro obtido foi congelado e mantido a -20°C até o

processamento dos testes sorológicos. Os animais do G2 que soroconverteram neste período de avaliação foram automaticamente incluídos no G1.

2.4. Monitoramento sorológico das ovelhas gestantes

Com o objetivo de estudar a cinética de anticorpos durante a gestação, as ovelhas gestantes dos grupos G1 e G2 foram monitoradas a cada quinze dias durante a gestação.

2.5. Avaliação da transmissão vertical por *T. gondii*

Para o estudo da transmissão vertical, consideraram-se positivos os borregos que apresentaram título 8 na RIFI (KIRKBRIDE, 1993). Foram incluídos nesta análise seis borregos do G1 e 12 borregos de ovelhas positivas para *T. gondii*, mas que não foram incluídas no G1, pois foram descartadas pelo proprietário.

2.6. Métodos analíticos

2.6.1. ELISA (monitoramento sorológico das ovelhas)

2.6.1.1 Preparo do antígeno para ELISA e RIFI

O isolado RH do *T. gondii* utilizado no estudo foi mantido em células Marc-145 em cultura celular nas condições especificadas por Regidor-Cerrillo et al. (2010). O número de taquizoítos viáveis foi determinado por contagem em câmara de Neubauer utilizando azul de Tripán. Os taquizoítos de *N. caninum* livres foram rompidos por passagem em agulha, purificados através de filtro e em seguida foram liofilizados e armazenados a -80°C até as análises de ELISA. Para RIFI, os taquizoítos purificados foram resuspendidos em de solução formalina a 0.2% (v/v) em PBS e ajustado a uma concentração de 10^7 parasitos/ml. Todos os taquizoítos fixados em formalina foram aliquotados e estocados a -20°C até o uso.

2.6.2. ELISA

Para a análise sorológica, amostras de soro foram testadas para a pesquisa de anticorpos IgG específicos contra *T. gondii* utilizando um extrato modificado de antígeno de *T. gondii* liofilizado para ELISA, preparado de acordo com Álvarez-García et al. (2003). O antígeno foi utilizado na concentração de 10^5 taquizoítos/poço diluídos em solução de carbonato-bicarbonato (0,1 M, pH 9,6), adicionando o volume final de 100 µL em cada poço. A proteína recombinante Biotina-G foi utilizada como conjugado (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) diluído em PBS-T em uma proporção 1:15000 como anticorpo secundário e solução ABTS como substrato (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). A reação foi lida em

espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finlândia), utilizando comprimento de onda de 405nm (OD405). Os valores da densidade ótica foram convertidos em índice relativo por cento (IRPC) usando-se a seguinte fórmula: $IRPC = (OD405 \text{ amostra} - OD405 \text{ controle negativo}) / (OD405 \text{ controle positivo} - OD405 \text{ controle negativo}) \times 100$. Um valor de $IRPC \geq 10$ indica um resultado positivo. Para validação das reações foram utilizados soros em duplicata testados previamente e sabidamente positivo e negativo para *T. gondii*.

2.6.3. Reação de Imunofluorescência Indireta (Pesquisa pré-colostral de anticorpos IgG anti-*T. gondii*)

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) foi realizada para a detecção de anticorpos (IgG) anti *T. gondii* como descrito por Camargo (1964). 10 microlitros de soro diluído foram colocados em lâminas para *T. gondii* contendo taquizoítos da cepa RH como antígeno. As amostras foram colocadas sobre o antígeno nas lâminas e incubadas a 37°C durante 30 minutos em câmara úmida. As lâminas foram lavadas e incubadas com soro igG anti-ovino conjugado com isotiocianato de fluoresceína (Sigma Chemical, USA), contendo 0.001% do azul de Evans (Sigma Chemical, USA). As lâminas foram lavadas novamente, cobertas com glicerina tamponada e lamínula e examinadas em microscópio fluorescente (Nikon Eclipse; objetiva: 40x). Em todas as lâminas foram incluídos controles positivos e negativos. As amostras foram consideradas positivas quando os taquizoítos apresentaram fluorescência periférica total e título ≥ 8 .

2.7. PCR para diagnóstico de aborto por *T. gondii*

Neste estudo, tecidos de dois fetos abortados das ovelhas do G1 foram submetidos à técnica de PCR para pesquisa de DNA de *T. gondii* em órgãos alvo. Fragmentos de cérebro, coração, pulmão, fígado, língua e masseter de dois fetos foram submetidos a extração de DNA utilizando *kit* comercial (Wizard Genomic DNA Purification System, Promega®, Madison, WI, USA) de acordo com o protocolo do fabricante. Para a detecção do DNA de *T. gondii* foi realizada a PCR-Nested em um único tubo utilizando dois pares de *primers* previamente descritos e protocolos de PCR para amplificar fragmentos de 227bp da região ITS1 do parasito (HURTADO et al., 2001). Cada reação foi realizada com um volume final de 25 μ L com 5 μ L de amostra de DNA. Uma suspensão de taquizoítos de *T. gondii* (cepa ME49, 10⁴ taquizoítos/mL) e água ultrapura foi utilizada como controles positivo e negativo, respectivamente. Os produtos da amplificação da PCR foram submetidos à eletroforese em gel

em gel de agarose 1.5% marcado com BlueGreen (LGC® Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil) e visualizado sob luz UV.

2.8. Análise Estatística

Para a avaliação da diferença entre os valores de IRPC obtidos em cada grupo, inicialmente, verificou-se a normalidade das variáveis através do teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, empregou-se o teste de Tukey HSD para avaliação de diferença entre os momentos de cada grupo (SAMPAIO, 1998). Para a análise de associação entre os grupos e a transmissão vertical da infecção por *T. gondii* utilizou-se o teste de Exato de Fisher (THRUSFIELD, 2004). O programa IBM SPSS Statistics 23.0 foi utilizado para a execução dos cálculos estatísticos e o nível de significância adotado foi de 5,0%.

3. RESULTADOS

A prevalência de toxoplasmose nas 60 ovelhas no momento 0 de avaliação foi de 25,0% (15/60). A prevalência final após o monitoramento sorológico realizado por seis meses foi de 46,7% (28/60) e a incidência da infecção por *Toxoplasma gondii* foi 28,9% (13/45) (Tabela 1).

Tabela 1 – Incidência da infecção por *T. gondii* durante o monitoramento sorológico nas ovelhas

Variáveis	Período (dias)													
	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	195
Incidência	0,0%	8,9%	0,0%	0,0%	2,4%	0,0%	5,0%	2,6%	2,7%	2,8%	5,7%	3,0%	0,0%	0,0%
n	0	4	0	0	1	0	2	1	1	1	2	1	0	0
N	45	45	41	41	41	40	40	38	37	36	35	33	32	32

n – Casos novos; N – Total de ovelhas suscetíveis.

A taxa de aborto no G1 foi de 37,5% (3/8), enquanto que no G2 foi 0,0% (0/8). O resultado do acompanhamento sorológico das ovelhas do G1 que abortaram (03 ovelhas) em diferentes tempos da gestação demonstra que houve um incremento nos valores do IRPC no período que antecedeu o aborto, contudo, não foi demonstrada diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre os tempos analisados (Tabela 2).

Tabela 2 – Resultados da sorologia (IRPC) das ovelhas que abortaram

Animal	Período (dias)						
	0	15	30	45	60	75	90
Ov1a ⁺	59,590	56,885	65,751	58,622	66,480	66,693	76,113
Ov2a ^{*+}	5,724	8,871	9,923	10,974	10,500	11,500	15,259
Ov3b [*]	12,429	24,833	18,184	19,084	31,696		

a – aborto aos 90 dias de gestação; b – aborto aos 60 dias de gestação; * animal era do G2 mas soroconverteu e foi incluído no G1; ⁺ feto positivo na PCR.

Em relação à resposta imune das ovelhas que gestaram e não abortaram, não houve diferença significativa entre os momentos dos grupos ($P > 0,05$), entretanto, observou-se uma tendência de aumento dos valores médios do IRPC no ELISA nos dois últimos meses da gestação e uma diminuição no momento que antecedeu ao parto no G1 (Tabela 3).

Tabela 3 – Resultados da sorologia (IRPC) das ovelhas que emprenharam e pariram

Grupo	Variáveis	Período										
		0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
G1	Média	42,50	43,28	43,28	37,83	41,42	37,80	47,38	51,57	50,77	53,88	39,72
	DP	22,72	27,87	30,15	25,96	28,89	23,67	34,56	24,96	26,70	29,57	21,65
G2	Média	3,05	3,23	3,73	4,44	3,69	5,79	5,39	6,52	5,95	5,51	4,74
	DP	1,51	0,79	2,11	2,01	1,60	2,92	1,30	1,20	1,53	1,61	1,37

DP – Desvio Padrão

A taxa de transmissão vertical no G1 somada às ovelhas não incluídas no grupo de acompanhamento sorológico (ovelhas descartadas) foi de 38,9% (7/18) (Tabela 4), considerando o resultado da sorologia pré-colostral. No G2, nasceram 12 borregos negativos na RIFI. Observou-se associação entre a positividade das mães com a taxa de transmissão de *T. gondii* (Valor $P = 0,024$). Na PCR, os tecidos dos dois fetos de ovelhas do G1 foram positivos no tecido do sistema nervoso central e musculatura da língua.

Tabela 4 – Resultados da sorologia (RIFI) dos borregos filhos de ovelhas positivas

Grupo	Ovelhas	Borregos	Títulos de IgG anti-<i>T. gondii</i>*
G1	E1	EK1	32
G1	E2	EK2	32
G1	E3	EK3 ₁	Negativo
		EK3 ₂	Negativo
G1	E4a	EK4	16
G1	E5a	EK5	Negativo
SG	001	001	32
SG	002	002	32
SG	003	003	64
SG	004	004	128
SG	005	005	Negativo
SG	006	006	Negativo
SG	007	007	Negativo
SG	008	008	Negativo
SG	009	009	Negativo
SG	010	010	Negativo
SG	011	011	Negativo
SG	012	012	Negativo

a –animal era do G2, mas soroconverteu e foi incluído no G1; * Soro pré-colostral

SG- ovelhas positivas para *T. gondii* e não incluídas no G1 (descatadas).

4.DISSCUSSÃO

Anticorpos de *T. gondii* foram detectados em ovinos em todo o mundo. No Brasil, a prevalência varia de 7 a 51,8% (DUBEY, 2009). De acordo com os resultados de Lundén et al. (1994); Gorman et al. (1999); Figliuolo et al. (2004); Rozette et al. (2005); Dumètre et al. (2006) e Ragozo et al. (2008), a prevalência de anticorpos em ovelhas foi duas vezes maior que em cordeiros, mas os resultados dependem da idade dos carneiros amostrados.

São escassos os dados disponíveis sobre a incidência da toxoplasmose em rebanhos de ovelhas naturalmente infectadas por *T. gondii*. No nosso estudo, a incidência de infecção por *Toxoplasma gondii* foi de 28,9% das ovelhas analisadas no período de seis meses de monitoramento com coletas quinzenais. Este resultado indica que o rebanho está em contato com formas infectantes do parasito no ambiente possivelmente água ou alimento contaminados com oocistos esporulados de *T. gondii*. Um dos principais fatores de risco para a toxoplasmose relatado na literatura é a presença do hospedeiro definitivo de *T. gondii*. Nesta propriedade estudada constatamos a presença de inúmeros gatos de várias idades convivendo no mesmo ambiente onde as ovelhas permaneciam a pasto ou eventualmente estabuladas. Um estudo realizado por Vesco et al. (2007) relataram que em uma pesquisa feita com 1961 ovinos de 62

fazendas no sul da Itália, a presença de gatos na fazenda que utilizavam água de superfície para beber foi um fator de risco associado à soropositividade para *T. gondii*.

A taxa de aborto nas ovelhas do G1 foi de 37,5% e a taxa de transmissão vertical foi relativamente elevada (38,9%) no nosso estudo, considerando os resultados da sorologia pré-colostral. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Trees et al. (1988) que examinaram fetos ovinos na Inglaterra em rebanhos naturalmente infectados por *T. gondii*.

A transmissão congênita subclínica de *T. gondii* foi documentada em ovinos. Neste estudo os autores relataram que 80 ovelhas da raça Hampshire no estado de Dakota do Sul, EUA produziram 144 cordeiros, dos quais 30 foram natimortos. A toxoplasmose foi confirmada em 11 dos 30 cordeiros abortados baseada na sorologia fetal e exame Imunohistoquímico (DUBEY; KIRKBRIDE, 1989b).

O sistema imune fetal dos ovinos começa a responder ao *T. gondii* logo após 60 dias de gestação quando ambas as reações celular e humoral podem ser detectadas (ZENCLUSSEN, 2005). A detecção de anticorpos de *T. gondii* nos fluídos fetais ou soro é útil no diagnóstico do aborto em ovinos (DUBEY, 2009). Arthur and Blewett (1988) examinaram fluídos de 171 fetos ovinos abortados de 55 rebanhos na Escócia onde foram encontrados títulos de 1:256 na RIFI considerado como diagnóstico de exposição ao *T. gondii*. Trees et al. (1988) examinaram 478 fetos ovinos abortados na Inglaterra e encontraram anticorpos para *T. gondii* em 40.4% no MAT e 40% no “dye test”, 37.4% na RIFI e 29% no teste de aglutinação em látex (TAL), utilizando a diluição de 1:16 em todos os testes. De acordo com dados revisados por Dubey (2009), até o momento a visão predominante era que a maioria das ovelhas adquirem a infecção por *T. gondii* após o nascimento. Embora não existam dados exatos, acredita-se que 2% dos ovinos se infectam congenitamente por *T. gondii* e menos que 4% das ovelhas persistentemente infectadas transmitem o parasito para a próxima geração (DUBEY; BEATTIE, 1988; BUXTON et al., 2006, 2007). Outros estudos (BUXTON et al., 2006; RODGER et al., 2006) afirmaram que os achados da transmissão congênita de *T. gondii* em ovelhas persistentemente infectadas por este parasito é pouco frequente.

Em nosso estudo não foi possível realizar análises histológicas dos fetos abortados para associar as lesões fetais com os abortos por *T. gondii*. Porém, a resposta sorológica pré-colostral dos neonatos obtida na técnica de RIFI suportam o resultado de elevada taxa de transmissão vertical em ovelhas naturalmente infectadas por *T. gondii*. O resultado da PCR também indicou a presença do DNA de *T. gondii* em dois fetos abortados de duas ovelhas positivas para *T. gondii*. No nosso estudo, a PCR foi útil no diagnóstico, pois esteve associada aos resultados positivos da sorologia materna, ou seja, foi positiva apenas para fetos de ovelhas do grupo 1.

Sobre a dinâmica de anticorpos no ELISA em ovelhas gestantes que abortaram observa-se na tabela 2 um ligeiro aumento no IRPC antes do aborto. Nas ovelhas que gestaram cordeiros saudáveis, constatou-se uma elevação nos níveis de anticorpos nos dois últimos meses da gestação e uma diminuição no momento que antecedeu o parto no G1 (Tabela 3). Considerando que a ovelha 1a estava cronicamente infectada antes da gestação, acreditamos que houve uma recrudescência da infecção durante a gestação que culminou com o aborto, considerando que o IRPC se elevou entre 75 e 90 dias de gestação quando ocorreu o aborto. As ovelhas 2b e 3a soroconverteram durante a gestação e apresentaram dois comportamentos distintos. A ovelha 2b soroconverteu no intervalo entre zero e quinze dias de gestação e abortou aos 60 dias, enquanto que a ovelha 3a soro converteu entre 75 e 90 dias e abortou aos 90 dias de gestação. Por outro lado, uma ovelha (E4a, Tabela 4) soroconverteu no intervalo entre zero e quinze dias e pariu um cordeiro viável e sorologicamente positivo para *T. gondii*.

Vários autores estudaram a cinética de anticorpos utilizando diferentes técnicas sorológicas na infecção experimental por *T. gondii* (MCCOLGAN et al., 1988; PAYNE et al., 1988; COUGHLAN et al., 1995; ESTEBAN-REDONDO; INNES, 1998; ESTEBAN-REDONDO et al., 1999; TENTER et al., 1992). Relataram variações individuais em relação ao desfecho da gestação. A modulação da resposta imune para acomodar a presença do feto leva a supressão dos mecanismos que ativam a resposta inflamatória (BUXTON et al., 2007), sendo desconhecida se a perda gestacional ou morte fetal nos terços iniciais da gestação reflete a proteção do hospedeiro contra a presença do parasito com prejuízos para a gestação (INNES et al., 2007).

Neste estudo foi possível verificar a transmissão vertical endógena e exógena de *T. gondii* em ovelhas naturalmente infectadas e a ocorrência de abortos e de nascimentos de borregos sorologicamente positivos para *T. gondii*. O aumento da prevalência e da incidência ao longo do estudo sugere uma contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii*, favorecendo a infecção de novos animais que contribui para a manutenção da doença no rebanho.

REFERÊNCIAS

ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; COSTAS, E.; REBORDOSA, X.; ORTEGA-MORA, L. M. (2003) Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. *Vet Res*, 34(3): 341–352.

ARTHUR, M. J.; BLEWETT, D. A. (1988) IFAT detection of IgG specific to *Toxoplasma* in thoracic fluids from aborted lambs: evaluation on routine diagnostic submissions. *Vet Rec*, 122(2): 29–31.

- BUXTON, D.; RODGER, S. M.; MALEY, S. W.; WRIGHT, S. E. (2006) Toxoplasmosis: the possibility of vertical transmission. *Small Rumin. Res.* 62: 43–46.
- BUXTON, D.; MALEY, S. W.; WRIGHT, S. E.; RODGER, S.; BARTLEY, P.; INNES, E. A. (2007) *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: new aspects of an old story. *Vet Parasitol*, 149(1-2): 25–28.
- CAMARGO, M.E. (1964). Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 6: 117-118.
- COUGHLAN, S. N.; SAMAN, E.; JACOBS, D.; MERCIER, C.; CESBRON-DELAUW, M. F.; TREES, A. J. (1995) Cellular and humoral immune responses to recombinant antigens in sheep infected with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol*, 17(9): 465–468.
- DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. (1988) *Toxoplasmosis of Animals and Man*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1–220.
- DUBEY, J. P.; KIRKBRIDE, C. A. (1989a) Enzootic toxoplasmosis in sheep in North-Central United-States. *J Parasitol*, 75(5): 673–676.
- DUBEY, J. P.; KIRKBRIDE, C. A. (1989b) Economic and public health considerations of congenital toxoplasmosis in lambs. *J Am Vet Med Assoc*, 195(12): 1715–1716.
- DUBEY, J. P. (2009) Toxoplasmosis in sheep – the last 20 years. *Vet Parasitol*, 163(1-2): 1-14.
- DUMÈTRE, A.; AJZENBERG, D.; ROZETTE, L.; MERCIER, A.; DARDÉ, M. L. (2006) *Toxoplasma gondii* infection in sheep from Haute-Vienne, France: seroprevalence and isolate genotyping by microsatellite analysis. *Vet Parasitol*, 142(3-4): 376–379.
- DUNCANSON, P.; TERRY, R. S.; SMITH, J. E.; HIDE, G. (2001) High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. *Int J Parasitol*, 31(14): 1699–1703.
- ESTEBAN-REDONDO, I.; INNES, E. A. (1998) Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep orally challenged with different doses of oocysts. *Int J Parasitol*, 28(9): 1459–1466.
- ESTEBAN-REDONDO, I.; MALEY, S. W.; THOMSON, K.; NICOLL, S.; WRIGHT, S.; BUXTON, D.; INNES, E. A. (1999) Detection of *T. gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. *Vet Parasitol*, 86(3): 155–171.
- FIGLIUOLO, L. P. C.; KASAI, N.; RAGOZO, A. M. A.; DEPAULA, V. S. O.; DIAS, R. A.; SOUZA, S. L. P.; GENNARI, S. M. (2004) Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-

- Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol*, 123(3-4): 161–166.
- GORMAN, T.; PABLO ARANCIBIA, J.; LORCA, M.; HIRD, D.; ALCAINO, H. (1999) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in sheep and alpacas (*Llama pacos*) in Chile. *Prev Vet Med*, 40(3-4): 143–149.
- HURTADO, A.; ADURIZ, G.; MORENO, B.; BARANDIKA, J.; GARCÍA-PÉREZ, A. L. (2001) Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. *Vet Parasitol*, 102(1-2): 17-27.
- KIRKBRIDE, C. A. (1993) Diagnoses in 1,784 ovine abortions and stillbirths. *J Vet Diagn Invest*, 5(3): 398-402.
- KLUN, I.; DJURKOVIC-DJAKOVIC, O.; KATIC-RADIVOJEVIC, S.; NIKOLIC, A. (2006) Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: seroprevalence and risk factors. *Vet Parasitol*, 135(2): 121–131.
- LUNDÉN, A.; NÄSHOLM, A.; UGGLA, A. (1994) Long-term study of *Toxoplasma gondii* infection in a Swedish sheep flock. *Acta Vet Scand*, 35(3): 273– 281.
- MAGALHÃES, F. J.; RIBEIRO-ANDRADE, M.; ALCÂNTARA, A. M.; PINHEIRO, J. W. JUNIOR.; SENA, M. J.; PORTO, W. J.; VIEIRA, R. F.; MOTA, R. A. (2016) Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in sheep and cattle from Fernando de Noronha Island, Brazil. *Rev Bras Parasitol*, 25, 0.
- MCCOLGAN, C.; BUXTON, D.; BLEWETT, D. A.; (1988) Titration of *Toxoplasma gondii* oocysts in non-pregnant sheep and the effects of subsequent challenge during pregnancy. *Vet Rec*, 123(18): 467–470.
- MORLEY, E. K.; WILLIAMS, R. H.; HUGHES, J. M.; TERRY, R. S.; DUNCANSON, P. (2005) Significant familial differences in the frequency of abortion and *Toxoplasma gondii* infection within a flock of Charollais sheep. *Parasitology*, 131(2): 181–185.
- MORLEY, E. K.; WILLIAMS, R. H.; HUGHES, J. M.; THOMASSON, D.; TERRY, R. S.; DUNCANSON, P.; SMITH, J. E.; HIDE, G. (2008) Evidence that primary infection of Charollais sheep with *Toxoplasma gondii* may not prevent foetal infection and abortion in subsequent lambings. *Parasitology*, 135(2): 169–173.

- PAYNE, R. A.; JOYNSON, D. H. M.; WILSMORE, A. J. (1988) Enzyme linked immunosorbent assays for the measurement of specific antibodies in experimentally induced ovine toxoplasmosis. *Epidemiol Infect*, 100(2): 205–212.
- PEREIRA-BUENO, J.; QUINTANILLA-GOZALO, A.; PÉREZ-PÉREZ, V.; ALVAREZ-GARCÍA, G.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ORTEGA-MORA, L. M. (2004) Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. *Vet Parasitol*, 121(3-4): 33–43.
- RAGOZO, A. M. A.; YAI, L. E. O.; OLIVEIRA, L. N.; DIAS, R. A.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. (2008) Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from sheep from São Paulo State, Brazil. *J Parasitol*, 94(6): 1259–1263.
- REGIDOR-CERRILLO, J.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.; DEL POZO, I.; JIMÉNEZ-RUIZ, E.; ADURIZ, G.; ORTEGA-MORA, L. M. (2010) Influence of *Neospora caninum* intra-specific variability in the outcome of infection in a pregnant BALB/c mouse model. *Vet Res*, 41(4): 41–52.
- RODGER, S. M.; MALEY, S. W.; WRIGHT, S. E.; MACKELLAR, A.; WESLEY, F.; SALES, J.; BUXTON, D. (2006) Role of endogenous transplacental transmission in toxoplasmosis in sheep. *Vet Rec*, 159(23): 768–772.
- ROZETTE, L.; DUMÉTRE, A.; COUQUET, C. Y.; DARDÉ, M. L. (2005) Seroprevalence de la toxoplasmose chez des ovins et des bovins en Haute-Vienne. *Epidemiol et Santé Anim*, 48: 97–99.
- TENTER, A. M.; VIETMEYER, C.; JOHNSON, A. M. (1992) Development of ELISAs based on recombinant antigens for the detection of *Toxoplasma gondii* specific antibodies in sheep and cats. *Vet Parasitol*, 43(3-4): 189–201.
- THRUSFIELD, M. V., (2004) *Epidemiologia Veterinária*. 2ª ed. São Paulo: Roca.
- TREES, A. J.; AL-ATIYA, S. A.; BALFOUR, A. H. (1988) Diagnosis of ovine toxoplasmosis. *Vet Rec*, 123(21): 554.
- VESCO, G.; BUFFOLANO, W.; LA CHIUSA, S.; MANCUSO, G.; CARACAPPA, S.; CHIANCA, A.; VILLARI, S.; CURRO, V.; LIGA, F.; PETERSEN, E. (2007) *Toxoplasma gondii* infections in sheep in Sicily, southern Italy. *Vet Parasitol*, 146(1-2): 3–8.
- WILLIAMS, R. H.; MORLEY, E. K.; HUGHES, J. M.; DUNCANSON, P.; TERRY, R. S.; SMITH, J. E.; HIDE, G. (2005) High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii*

in longitudinal and cross-sectional studies on sheep farms provides evidence of vertical transmission in ovine hosts. *Parasitology*, 130(3): 301–307.

ZENCLUSSEN A. C. (2005) CD4(+) CD25 + T regulatory cells in murine pregnancy. *J Reprod Immunol*, 65(2): 101–110.

4. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o *T. gondii* foi responsável pela ocorrência de alterações importantes na resposta imune humoral das ovelhas naturalmente infectadas. A elevada proporção de conceptos infectados sugere que a infecção congênita é uma importante via da transmissão do parasito em ovelhas gestantes. Sobre a infecção por *Neospora caninum* também foram observadas das elevadas taxas de prevalência, bem como a transmissão vertical em ovinos naturalmente infectados. Desta forma, outros estudos desta natureza devem ser conduzidos para agregar dados epidemiológicos que contribuam para o estudo da toxoplasmose e neosporose ovina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGERHOLM, J. S.; BARR, B. C. (1994) Bovine abortions associated with *Neospora* in Denmark. *Acta Vet Scand*, 35(4): 461-464.

ALMEIRA, S.; FERRER, D.; PABON, M.; CASTELLA, J.; MANAS, S. N. (2002) *Rede foxes (vulpes vulpes)* are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. *Vet Parasitol*, 107(4): 287-294.

ANDERSON, M. L.; BARR, B. C.; CONRAD, P. A. (1994) Protozoal causes of reproductive failure in domestic ruminants. *Vet clin North Am Food Anim Pract*, 10(3): 439-461.

ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P. A. (2000) Neosporosis in cattle. *Anim Reprod Sci*, 60-61: 417-431.

ANDRADE, M. M.; CARNEIRO, M.; MEDEIROS, A. D.; NETO, V. A.; VITOR, R. W. (2013). Seroprevalence and risk factors associated with ovine toxoplasmosis in Northeast Brazil. *Paradite*. 20: 20.

APPELBERG, R.; CASTRO, A. G.; PEDROSA, J.; MINOPRIO, P. (1994) Role of interleukin-6 in the induction of protective T cells during mycobacterial infections in mice. *Immunology* 82(3):361– 364.

ALVAREZ-GARCÍA, G.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; COSTAS, E.; REBORDOSA, X.; ORTEGA-MORA, L. M. (2003) Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. *Vet Res*, 34(3):341–352.

AMARAL, V.; SANTOS, S. M.; REBOUÇAS, M. M. (1978). Sobre a prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma* em soros de caprinos e ovinos procedentes, respectivamente, dos Estados da Bahia e Rio Grande do Sul, Brasil. *O Biológico*, São Paulo, 44: 331-340.

ARRANZ-SOLÍS, D.; BENAVIDES, J.; REGIDOR-CERRILLO, J.; FUERTES, M.; FERRE, I.; DEL FERRERAS, M.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; HEMPHILL, A.; PEREZ, V.; ORTEGA-MORA, L. M. (2015) Influence of the gestational stage on the clinical course, lesional development and parasite distribution in experimental ovine neosporosis. *Vet Res*, 46:19.

ARRANZ-SOLÍS, D.; BENAVIDES, J.; REGIDOR-CERRILLO, J.; HORCAJO, P.; CASTAÑO, P.; DEL CARMEN FERRERAS, M.; JIMÉNEZ-PELAYO, L.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; FERRE, I.; HEMPHILL, A.; PÉREZ, V.; ORTEGA-MORA, L. M. (2016)

Systemic and local immune responses in sheep after *Neospora caninum* experimental infection at early, mid and late gestation. *Vet Res*, 47(6): 2.

AZEVEDO, S. S.; PENA, H. F.; ALVES, C. J.; GUIMARAES FILHO, A. A.; OLIVEIRA, R. M.; MAKSIMOV, P.; SCHARES, G.; GENNARI, S. M. (2010) Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in swine from Northeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, 19(2): 80-84.

BACSADI, A.; BAJMOCY, E.; MATIZ, K.; KISS, I. (2001) Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Hungary. *Acta Vet Hung*, 49(2): 185-189.

BAHIA, M. T.; VITOR, R. W. A.; CALDAS, R. P.; ANTUNES, C. M. F.; CHIARI, C. (1993). Diagnosis of caprine toxoplasmosis by a dot enzyme-linked immunosorbent assay. *Arq Bras Med Vet Zootc*. 45: 173-182.

BARBOSA, A. J. A. (1988). As técnicas de imunoperoxidase no estudo da etiologia das doenças infecciosas e parasitárias. *Rev Soc Bras Medic Trop*. 21(1): 1-6.

BARBERAN, M.; MARCO, J. C. (1997) Patogenia, cuadro clinico y lesional-Toxoplasmosis. *Revista Ovis: Tratado de Patologia y Produccion Ovina*, Madrid, 52: 35-49.

BARR, B. C.; ANDERSON, M. L.; DUBEY, J. P.; CONRAD, P. A. (1991a) Neospora-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Vet Pathol*, 28(2): 110-116.

BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; DUBEY, J. P.; ANDERSON, M. L. (1991b) Neospora-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. *J Vet Diagn Invest*, 3(1): 39-46.

BARTLEY, P. M.; KIRVAR, E.; WRIGHT, S.; SWALES, C.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D.; MALEY, S. W.; SCHOCK, A.; RAE, A. G.; HAMILTON, C.; INNES, E. A. (2004) Maternal and fetal immune response of cattle inoculated with *Neospora caninum* at mid-gestation. *J Comp Pathol*, 130(2/3): 81-91.

BASZLER, T. V.; GAY, L. J.; LONG, M. T.; MATHISON, B. A. (1999) Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. *J Clin Microbiol*, 37(12): 4059-4064.

BENAVIDES, J.; KATZER, F.; MALEY, S. W.; BARTLEY, P. M.; CANTON, G.; PALAREA-ALBALADEJO, J.; PURSLOW, C. A.; PANG, Y.; ROCCHI, M. S.; CHIANINI, F.; BUXTON, D.; INNES, E. A. (2012) High rate of transplacental infection and transmission

- of *Neospora caninum* following experimental challenge of cattle at day 210 of gestation. Vet Res, 43(1):83.
- BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J (1984). Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Z Parasitenkd, 70(2): 271-274.
- BJORKMAN, C.; JOHANSSON, O.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O. J.; UGGLA, A. (1996) *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. J Am Vet Med Assoc, 208(9): 1441-1444.
- BJORKMAN, C.; UGGLA, A. (1999) Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. Int J Parasitol, 29 (10): 1497-1507.
- BLANCO, R. D.; PATARROY, J. H.; VARGAS, M. I.; CARDONA, J. A.; ARAÚJO, L. S.; GOMEZ, V. E. (2014) Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora* spp. em jumentos (*Equus asinus*) no estado de Sucre - Colômbia. Arq Bras Med Vet Zootec, 66(2): 450-454.
- BLEWETT, D. A. (1983) The epidemiology of ovine toxoplasmosis. I. The interpretation of data for the prevalence of antibody in sheep and other host species. British Vet J, 139 (6): 537-545.
- BLEWETT, D. A.; WATSON, W. A. (1984) The epidemiology of ovine toxoplasmosis III. Observations of clinical toxoplasmosis in relation to possible mechanisms of transmission. The Br Vet J, 140(1): 54-63.
- BLISS, S. K.; ZHANG, Y.; DENKERS, E. Y. (1999) Murine neutrophil stimulation by *Toxoplasma gondii* antigen drives high level production of IFN- γ -independent IL-12. J Immunol, 163(4): 2081-2088.
- BONAMETTI, A. M.; PASSOS, J. N.; DA SILVA, E. M. K.; BORTOLIERO, A. L. (1997) Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. Rev Soc Bras Med Trop, 30(1): 21-25.
- BORDE, G.; LOWHAR, G.; ADESIYUN, A. A. (2006). *Toxoplasma gondii* and *Chlamydia abortus* in caprine abortions in Tobago: a Sero-Epidemiological Study. J Vet Med. 53: 188-193.
- BRAUTIGAM, F. E. (1996) Resultados de levantamento sorológico para a espécie *Neospora* em bovinos de corte e leite. In: congresso panamericano de ciências veterinárias, Campo Grande. Anais... Campo Grande: PANVET, p.284.

- BUXTON, D.; FINLAYSON, J. (1986) Experimental infection of pregnant sheep with *Toxoplasma gondii*: pathological and immunological observations on the placenta and foetus. *J Comp Pathol*, 96(3): 319-333.
- BUXTON, D. (1998) Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. *Vet Res*, 29(3-4): 289–310.
- BUXTON, D.; McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. (2002) The comparative pathogenesis of Neosporosis. *Trends Parasitol*, 18(12): 546 – 552.
- CAMARGO, M. E. (1974) Introdução às técnicas de imunofluorescência. *Rev Bras Patol Clin*, 10 (4): 143-171.
- CANADA, N.; MEIRELES, C. S.; ROCHA, A.; SOUSA, S.; THOMPSON, G.; DUBEY, J. P.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; CORREIA DA COSTA, J. M. (2002) First Portuguese isolate of *Neospora caninum* from an aborted fetus from a dairy herd with endemic neosporosis. *Vet Parasitol*, 110 (1-2): 11-15.
- CAVALCANTE, G. T. (2004) Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em humanos e animais domésticos da zona Monte Negro, Rondônia. In: congresso brasileiro de parasitologia veterinária, 13., 2004, Ouro Preto, Minas Gerais. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* p. 217.
- CHAVEZ-VELASQUEZ, A.; ALVAREZ-GARCIA, G.; COLLANTESFERNANDEZ, E.; CASAS-ASTOS, E.; ROSADIO-ALCANTARA, R.; SERRANOMARTINEZ, E.; ORTEGA-MORA, L. M. (2004) First report of *Neospora caninum* infection in adult alpacas (*Vicugna pacos*) and llamas (*Lama glama*). *J Parasitol*, 90 (4): 864-866.
- CHIARI, C. A.; LIMA, W. S.; ANTUNES, C. M. F.; LIMA, J. D. (1987) Soroepidemiologia da Toxoplasmose caprina em Minas Gerais, Brasil. *Arq Bras Med Veter Zootec* 39:587–609
- CLEMENTINO, M. M.; SOUZA, M. F.; ANDRADE NETO V. F. (2007) Seroprevalence and *Toxoplasma gondii*-IgG avidity in sheep from Lajes, Brazil. *Vet Parasitol*, 146(3-4): 199–203.
- CONRAD, P. A.; BARR, B. C.; SVERLOW, K. W.; ANDERSON, M.; DAFT, B.; KINDE, H.; DUBEY, J. P.; MUNSON, L.; ARDANS, A. (1993) In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine foetuses. *Parasitol*, 106(3): 239-249.
- CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C. F.; GONDIM, L. F.; WALD, V. (2002) Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Vet Parasitol*, 103(3): 195-202.

- COSTA, K. S.; SANTOS, S. L.; UZEDA, R. S.; PINHEIRO, A. M.; ALMEIDA, M. A.; ARAUJO, F. R.; MCALLISTER, M. M.; GONDIM, L. F. (2008) Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol*, 38 (2): 157-159.
- COSTA, V. M. M.; SIMÕES, S. V.D.; RIET-CORREA, F. (2011) Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. *Pesq Vet Bras*, 31 (1): 65–71.
- COSTA-SILVA, T. A.; CHIOCCOLA, V. L. P. (2010). *Toxoplasma gondii* acute infection: estimation of humoral response and blood parasitism im mice AS/n inbred. *Scientia Medica*. 20(1): 88-92.
- CURRENT, W. L.; UPTON, S. J.; LONG, P. L. (1990) Taxonomy and life cicle. In: PL LOnG. *Coccidiosis of man and domestic animals*, CRC Press. 7-8.
- DAFT, B. M.; BARR, B. C.; COLLINS, N.; SVERLOW, K. (1997) *Neospora* encephalomyelitis and polyradiculoneuritis in an aged mare with Cushing's disease. *Equine Vet J*, 29 (3): 240-243.
- DEHKORDI, F. S. et al. (2013). Detection of *Toxoplasma gondii* in Raw Caprine, Ovine, Buffalo, Bovine, and Camel Milk Using Cell Cultivation, Cat Bioassay, Capture ELISA, and PCR Methods in Iran. *Foodborne Pathogens and Disease*. 10(2): 120 – 125,
- DIJKSTRA, T. et al. (2002). Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. *Vet Parasitol*, 105(2): 99-104, 2002.
- DUBEY, J. P. (1986) A review of toxoplasmosis in cattle. *Vet Parasitol*, 22(3-4): 177-202.
- DUBEY, J. P. et al. (1988a). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 192(9): 1269-1285.
- DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. (1988b) *Toxoplasmosis of Animals and Man*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1–220.
- DUBEY, J. P. (1998a) Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, 28 (7): 1019-1024.
- DUBEY, J. P. (1998b) *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. *J Parasitol*, 84 (4): 862-865.
- DUBEY, J. P.; KIRKBRIDE, C. A.; (1989a). Enzootic toxoplasmosis in sheep in North-Central United-States. *J Parasitol*, 75(5), 673–676.

- DUBEY, J. P. (1990) Status of toxoplasmosis in sheep and goats en the United Station. J Am Vet Med Assoc, 196(2): 259-262.
- DUBEY, J. P. (1990) Toxoplasmosis. J Am Vet Med Assoc, 205 (11): 1593-1598.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. (1989) Transplacental *Neospora caninum* infection in cats. J Parasitol, 75 (5): 765-771.
- DUBEY, J. P.; ACLAND, H. M.; HAMIR, A. N. (1992) *Neospora caninum* (Apicomplexa) in a stillborn goat. J Parasitol 78:532–534.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. (1993) Neosporosis. Parasitol Today, 9 (12): 452-458.
- DUBEY, J. P. (1994) Toxoplasmosis. J Am Vet Med Assoc. 205(11): 1593-1598.
- DUBEY, J. P.; LIN, T. L. (1994). Acute toxoplasmosis in a gray fox (*Urycion cenreargenteus*). Vet Parasitol. 51(3-4): 321-325.
- DUBEY, J. P; LINDSAY, D. S. A. (1996) review of *Neospora caninum* and neosporosis. Vet Parasitol, 67 (1): 1-59.
- DUBEY, J. P. (1999) Recent advances in *Neospora* and neosporosis. Vet Parasitol, 84 (34): 349-367.
- DUBEY, J. P. (1998) Hydrocephalus associated with *Neospora caninum*-infection in an aborted bovine fetus. J Comp Pathol, 118(2): 169-173.
- DUBEY, J. P. (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. The Korean Journal of Parasitology, Seoul, 41(1): 1-16.
- DUBEY, J. P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. (2006a) Pathogenesis of bovine neosporosis. J Comp Pathol, 134 (4): 267-289.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G. (2006b) Diagnosis of bovine neosporosis. Vet Parasitol, 140 (1-2): 1-34.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. (2007) Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev, 20 (2): 323-367.
- DUBEY, J. P. (2010). Toxoplasmosis of Animals and Humans. CRC Press, 2: 313.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G. (2011) Neosporosis in animals the last five year. Vet Parasitol, 180: 90-108.

- DUNCANSON, P.; TERRY, R. S.; SMITH, J. E.; HIDE, G. (2001) High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. *Int J Parasitol*, 31(14): 1699–1703.
- EDWARDS, J. F.; DUBEY, J. P. (2013) *Toxoplasma gondii* abortion storm in sheep on a Texas farm and isolation of mouse virulent atypical genotype *T. gondii* from an aborted lamb from a chronically infected ewe. *Vet Parasitol*, 192(1-3):129-36.
- ELLIS, J.; LUTON, K.; BAVERSTOCK, P. R.; BRINDLEY, P. J.; NIMMO, K. A.; JOHNSON, A. M. (1994) The phylogeny of *Neospora caninum*. *Mol Biochem Parasitol*, 64 (2): 303-311.
- ENTRICAN, G.; WHEELHOUSE, N. M. (2006) Immunity in the female sheep reproductive tract. *Vet Res*, 37(3): 295–309.
- FARREL, R. L. et al. (1952). Toxoplasmosis. *Toxoplasma* isolated from swine. *Am J Vet Researc*. 13: 181-185.
- FARIA, E. B.; CAVALCANTI, E. F.; MEDEIROS, E. S.; PINHEIRO, J. W.; AZEVEDO, S. S.; ATHAYDE, A. C.; MOTA, R. A. (2010). Risk factors associated with *Neospora caninum* seropositivity in sheep from the state of Alagoas, in the northeast region of Brasil. *J Parasitol*. 96(1): 197-199.
- FEITOSA, T. F.; VILELA, V. L.; DE MELO, L. R.; DE ALMEIDA NETO, J. L.; SOUTO, D. V.; DE MORAIS, D. F.; ATHAYDE, A. C.; AZEVEDO, S. S.; PENNA, H. F. (2014) *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast, Brazil. *Vet Parasitol*, 202 (3-4): 305-309.
- FERROGLIO, E.; PASINO, M.; ROMANO, A.; GRANDE, D.; PREGEL, P.; TRISCIUOGLIO, A. (2007) Evidence of *Neospora caninum* DNA in wild rodents. *Vet Parasitol*, 148 (3-4): 346-349.
- FIGLIUOLO, L. P. C.; KASAI, N.; RAGOZO, A. M. A.; DEPAULA, V. S. O.; DIAS, R. A.; SOUZA, S. L. P.; GENNARI, S. M. (2004) Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol*, 123(3-4): 161–166.
- FRANÇA C. A. (2012) Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. From small ruminant mastitis in Brazil. *Pesq Vet Bras*, 32 (8): 747-753.

- FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. (1970). *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*. 167: 893-896.
- FRENKEL, J. K. (1990) Transmisión of toxoplasmosis and the role of immunity in limiting transmisión and iones. *J Am Vet Med Assoc*, 195 (2): 233-240.
- FREYRE, A.; BONINO, J.; FALCÓN, J.; CASTELLS, O.; CORREA, A. (1997) The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. *Vet Parasit* 73:13–15.
- FUJII, K.; KAKUMOTO, C.; KOBAYASHI, M.; SAITO, S.; KARIYA, T.; WATANABE, Y.; XUAN, X.; IGARASHI, I.; SUZUKI, M. (2007) Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in seals around Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci*, 69 (4): 393-398.
- GAZZINELLI, R. T.; HIENY, S.; WYNN, T. A.; WOLF, S.; SHER, A. (1993) Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(13):6115–6119.
- GARCIA-VAZQUEZ, Z.; ROSARIO-CRUZ, R.; DIAZ-GARCIA, G.; HERNANDEZ-BAUMGARTEN, O. (1993). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, swine and goats in four Mexican states. *Prev Vet Med*. 17: 127-132.
- GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HAYASHI, S.; DENKERS, E. Y.; HIENY, S.; CASPAR, P.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. (1994) Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*, 153(6): 2533–2543.
- GHAREKHANI, J.; TAVOOSIDANA, G.; NADERISEFAT, G. (2013) Seroprevalence of *Neospora* infection in horses and donkeys in Hamedan province, Western Iran. *Veterinary World*, 6(9): 620-622.
- GONCALVES, I. N.; UZEDA, R. S.; LACERDA, G. A.; MOREIRA, R. R.; ARAUJO, F. R.; OLIVEIRA, R. H.; CORBELLINI, L. G.; GONDIM, L. F. (2012) Molecular frequency and isolation of cyst-forming coccidia from free ranging chickens in Bahia State, Brazil. *Vet Parasitol*, 190 (1-2): 74-79.
- GONDIM, L. F.; SAEKI, H.; ONAGA, H.; HARITANI, M.; YAMANE, I. (1999a) Maintenance of *Neospora caninum* tachyzoites using Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *N Z Vet J*, 47 (1): 36.

- GONDIM, L. F.; SARTOR, I. F.; HASEGAWA, M.; YAMANE, I. (1999b) Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Vet Parasitol*, 86 (1): 71-75.
- GONDIM, L. F. P.; PINHEIRO, A. M.; SANTOS, P. O. M.; JESUS, E. E. V.; RIBEIRO, M. B.; FERNANDEZ, H. S.; ALMEIDA, M.A. O.; FREIRE, S. M.; MEYER, R.; MCALLISTER, M. M. (2001) Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. *Vet Parasitol*, 101(1):1-7.
- GONDIM, L. F.; SARTOR, I. F.; MONTEIRO, L. A., JR.; HARITANI, M. (1999) *Neospora caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil. *N Z Vet J*, 47 (1): 35.
- GONDIM, L. F.; GAO, L.; MCALLISTER, M. M. (2002) Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. *J Parasitol*, 88 (6): 1159-1163.
- GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M. M.; ANDERSON-SPRECHER, R. C.; BJÖRKMAN, C.; LOCK, T. F.; FIRKINS, L. D.; GAO, L.; FISCHER, W. R. (2004a) Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. *J Parasitol*, 90(6): 1394-1400.
- GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. (2004b) Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol*, 34(2): 159-161.
- GONDIM, L. F.; MCALLISTER, M. M.; GAO, L. (2005) Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. *Vet Parasitol*, 134 (1-2): 33-39.
- GONDIM, L. F. (2006) *Neospora caninum* in wildlife. *Trends Parasitol*, 22(6): 247-252.
- GONDIM, L. S.; ABE-SANDES, K.; UZEDA, R. S.; SILVA, M. S.; SANTOS, S. L.; MOTA, R. A.; VILELA, S. M.; GONDIM, L. F. (2010) *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. *Vet Parasitol*, 168(1-2): 121-124.
- GORMAN, T.; PABLO ARANCIBIA, J.; LORCA, M.; HIRD, D.; ALCAINO, H. (1999) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in sheep and alpacas (*Llama pacos*) in Chile. *Prev Vet Med*, 40(3-4), 143-149.
- GUIMARÃES, L. A.; BEZERRA, R. A.; ROCHA, D. S.; ALBUQUERQUE, G. R. (2013). Prevalence and risk factors associates with anti- *Toxoplasma gondii* antibodies in sheep from Bahia state, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 22(2): 220-224.

- HAYASHI, S.; CHAN, C. C.; GAZZINELLI, R.; ROBERGE, F. G. (1996) Contribution of nitric oxide to the host parasite equilibrium in toxoplasmosis. *J Immunol*, 156(4): 1476–1481.
- HILL, D.; DUBEY, J. P. (2002). *Toxoplasma gondii*. Transmissions, diagnosis and prevention. *Clin Microb Infect Diaseas*. 8: 634-640.
- GRAY, M. L.; HARMON, B. G.; SALES, L.; DUBEY, J. P. (1996) Visceral neosporosis in a 10-year-old horse. *J Vet Diagn Invest*, 8(1): 130-133.
- HARTLEY, W. J.; MARSHALL, S. C. (1957). Toxoplasmosis as cause of ovine perinatal mortality. *N Zeal Vet J*, 5: 119-124.
- HARTLEY, W. J.; BRIDGE, P. S. A. (1975) case of suspected congenital *Toxoplasma* encephalomyelitis in a lamb associated with a spinal cord anomaly. *Br Vet J*, 131(4): 380-384.
- HO, M. S.; BARR, B. C.; MARSH, A. E.; ANDERSON, M. L.; ROWE, J. D.; TARANTAL, A. F.; HENDRICKX, A. G.; SVERLOW, K.; DUBEY, J. P.; CONRAD, P. A. (1996) Identification of bovine Neospora parasites by PCR amplification and specific small-subunit rRNA sequence probe hybridization. *J Clin Microbiol*, 34(5): 1203-1208.
- HOLMDAHL, O. J.; MATTSSON, J. G.; UGGLA, A.; JOHANSSON, K. E. (1994) The phylogeny of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* based on ribosomal RNA sequences. *FEMS Microbiol Lett*, 119(1-2): 187-192.
- HOLMDAHL, O. J.; MATTSSON, J. G. (1996) Rapid and sensitive identification of *Neospora caninum* by in vitro amplification of the internal transcribed spacer 1. *Parasitology*, 112(2): 177-182.
- HOMAN, W. L.; LIMPER, L.; VERLAAN, M.; BORST, A.; VERCAMMEN, M.; VAN KNAPEN, F. (1997) Comparison of the internal transcribed spacer, ITS 1, from *Toxoplasma gondii* isolates and *Neospora caninum*. *Parasitol Res*, 83(3): 285-289.
- HOWE, L.; COLLETT, M. G.; PATTISON, R. S.; MARSHALL, J.; WEST, D. M.; POMROY, W. E. (2012) Potential involvement of *Neospora caninum* in naturally occurring ovine abortions in New Zealand. *Vet Parasitol*, 185(2-4): 64-71.
- HUGHES, J. M.; THOMASSON, D.; CRAIG, P. S.; GEORGIN, S.; PICKLES, A.; HIDE, G. (2008). *Neospora caninum*: detection in wild rabbits and investigation of co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis. *Exp Parasitol*, 120(3): 255-260.

- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE (2012). Estatísticas sobre pecuária, rebanho e produção. Disponível em: < www.sidra.ibge.gov.br> Acesso 10/05/2016.
- IBRAHIM, H. M.; HUANG, P.; SALEM, T. A.; TALAAT, R. M.; NASR, M. I.; XUAN, X.; NISHIKAWA, Y. (2009) Short report: prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in northern Egypt. *Am J Trop Med Hyg*, 80(2): 263-267.
- INNES, E. A.; PANTON, W. R. M.; SANDERSON, A.; THOMSON, K. M.; WASTLING, J. M.; MALEY, S.; BUXTON, D. (1995) Induction of CD4+ and CD8+ T cell responses in efferent lymph responding to *Toxoplasma gondii* infection: analysis of phenotype and function. *Parasite Immunol.* 17(3): 151–160.
- INNES, E. A.; ANDRIANARIVO, A. G.; BJÖRKMAN, C.; WILLIAMS, D. J. L.; CONRAD, P. A. (2002) Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol*, 18(11): 497-504.
- INNES, E. A.; VERMEULEN, A. N. (2006) Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites *Eimeria*, *Toxoplasma* and *Neospora*. *Parasitol*, 133:145-168.
- JARDINE, J. E.; LAST, R. D. (1993) *Neospora caninum* in aborted twin calves. *J S Afr Vet Assoc*, 64(2): 101-102.
- JARDINE, J. E.; WELLS, B. H. (1995) Bovine neosporosis in Zimbabwe. *Vet Rec*, 137(9): 223.
- JENKINS, M.; BASZLER, T.; BJORKMAN, C.; SCHARES, G.; WILLIAMS, D. (2002) Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum* associated bovine abortion. *Int J Parasitol*, 32(5): 631-636.
- JITTAPALAPONG, S.; SANGWARANONAD, A.; INPANKAEW, T.; PHAUK, C.; PINYOPANUWAT, N.; CHIMONI, W.; KENGRADOMKIJ, C.; ARUNWIPAT, P.; MARUYAMA, S. (2008). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in dairy cows in Northeastern Thailand. *Sotheast Asian J.Trop.Med.Public Health*.39:1-5.
- JONES, T.C. et al. (2000). *Patologia veterinária*. 6. ed. São Paulo: Manole. 1415 p.
- KING, J. S. et al. (2010). Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol**, 40(8): 945-950.

- KOBAYASHI, Y.; YAMADA, M.; OMATA, Y.; KOYAMA, T.; SAITO, A.; MATSUDA, T.; OKUYAMA, K.; FUJIMOTO, S.; FURUOKA, H.; MATSUI, T. (2001) Naturally-occurring *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses. *J Parasitol*, 87(2): 434-436.
- KOMPALIC-CRISTO, A.; BRITTO, C.; FERNANDES, O. (2005). Diagnóstico molecular da Toxoplasmose: revisão. *J Bras Patol Med Lab*. 41(4): 229-235.
- KLUN, I.; DJURKOVIC-DJAKOVIC, O.; KATIC-RADIVOJEVIC, S.; NIKOLIC, A. (2006) Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: seroprevalence and risk factors. *Vet Parasitol*, 135(2): 121–131.
- LANGONI, H. et al. (1999). Inquérito soroepidemiológico para a toxoplasmose em ovinos no Estado de São Paulo, Brasil. *O Biológico, São Paulo*, 61(1): 35-39.
- LANGONI, H.; GRECA JUNIOR, H.; GUIMARÃES, F. F.; ULLMANN, L. S.; GAIO, F. C.; UEHARA, R. S.; ROSA, E. P.; AMORIM, R. M.; SILVA, R. C. (2011) Serological profile of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection in commercial sheep from São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol*, 177(1-2): 50–54.
- LEVADITI, C.; SCHOEN, R.; SANCHIS-BAYARRI, V. L. (1928). Encéphalo-myélite toxoplasmique chronique du lapin et de la souris. *Int. J. Parasitol*. 99: 37-40.
- LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F. E. G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B. M.; LEEDALE, G. F.; LOEBLICH, A. R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VALRA, J.; WALLACE, F. G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool*. 27: 37-58.
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. (1989) Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am J Vet Res*, 50(11): 1981-1983.
- LINDSAY, D. S.; STEINBERG, H.; DUBIELZIG, R. R.; SEMRAD, S. D.; KONKLE, D. M.; MILLER, P. E.; BLAGBURN, B. L. (1996) Central nervous system neosporosis in a foal. *J Vet Diagn Invest*, 8(4): 507-510.
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. (1999a) Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet Parasitol*, 82(4): 327-333.
- LINDSAY, D. S.; UPTON, S. J.; DUBEY, J. P. (1999b) structural study of the *Neospora caninum* oocyst. *Int J Parasitol*, 29(10): 1521-1523.
- LOPES, W. D. Z. et al. (2009). Semen variables of sheep (*Ovis aries*) experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Anim Reprod Sci*. 111(3): 312-319.

- KHAN, I.A.; SCHWARTZMAN, J. D.; FONSEKA, S.; KASPER, L. H. (1997) *Neospora caninum*: Role for immune cytokines in host immunity. *Exp Parasitol*, 85(1):24 – 34.
- MACEDO, O. M. Toxoplasmose. (1994). In: CASTRO, L. P.; CUNHA, A. S.; REZENDE, J. M. Protozooses humanas. São Paulo: BYK p. 153-170.
- MACHACOVA, T.; BARTOVA, E.; DI LORIA, A.; SEDLAK, K.; GUCCIONE, J.; FULGIONE, D.; VENEZIANO, V. (2013) Seroprevalence and risk factors of *Neospora* spp. in donkeys from Southern Italy. *Vet Parasitol*, 198(1-2): 201-204.
- MACHADO, G. P.; KIKUTI, M.; LANGONI, H.; PAES A. C. (2011) Seroprevalence and risk factors associated with neosporosis in sheep and dogs from farms. *Vet Parasitol*, 182(2-4): 356–358.
- MACIEL K. P.; ARAÚJO F. A. P. (2004). Inquérito sorológico para detecção de anticorpos de *Toxoplasma gondii* em caprinos (*Capra hircus*) criados nos municípios de Gravataí e Viamão, região da Grande Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Revta Ciênc. Agrovet.*, Lages, 3(2):121-125.
- MAGALHÃES, F. J.; RIBEIRO-ANDRADE, M.; ALCÂNTARA, A. M.; PINHEIRO, J. W. JUNIOR.; SENA, M. J.; PORTO, W. J.; VIEIRA, R. F.; MOTA, R. A. (2016) Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in sheep and cattle from Fernando de Noronha Island, Brazil. *Rev Bras Parasitol*, 25, 0.
- MAINARDI, R. S.; MODOLO, J. R.; STACISSINI, A. V. M.; PADOVANI, C. R.; LANGONI, H. (2003). Soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em rebanhos caprinos no Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop*. 36: 759-761.
- MALEY, S. W.; BUXTON, D.; MACALDOWIE, C. N.; ANDERSON, I. E.; WRIGHT, S. E.; BARTLEY, P. M.; ESTEBAN-REDONDO, I.; HAMILTON, C. M.; STORSET, A. K.; INNES, E. A. (2006) Characterization of the immune response in the placenta of cattle experimentally infected with *Neospora caninum* in early gestation. *J Comp Pathol*, 135(3): 130-141.
- MAINAR, R. C.; DE, L. A.; CRUZ, C.; ASENSIO, A.; DOMÍNGUEZ, L.; VÁZQUEZBOLAND, J. A. (1996) Prevalence of agglutinating antibodies to *Toxoplasma gondii* in small ruminants of the Madrid Region, Spain, and identification of factors influencing seropositivity by multivariate analysis. *Vet Res Commun* 20:153–159.
- MALIK, M. A.; DEESEN, D. W.; CRUZ, A. (1990). Toxoplasmosis in sheep in northeastern United States. *Journal Americam Veterinary Medical Association*. 196(2): 263-265.

- MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; MCGUIRE, A. M. (1998) Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol*, 28 (9): 1473-1478.
- McCOLGAN, C.; BUXTON, D.; BLEWETT, D. A. (1988) Titration of *Toxoplasma gondii* oocysts in non pregnant sheep and the effect of subsequent challenge during pregnancy. *Vet Res*, 123(18): 467-470.
- MCINTOSH, D. W.; HAINES, D. M. (1994) *Neospora* infection in an aborted fetus in British Columbia. *Can Vet J*, 35(2): 114-115.
- MCSPORRAN, K. D. et al. (1985). Toxoplasmosis in goats. *New Zealand Veterinary Journal*, New Zealand. 33(3): 39-40.
- MEIRELES, L. R. (2001). Estudo das fontes de infecção da Toxoplasmose humana em diferentes localidades do estado de São Paulo. 141 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MELLO, V. (1910). Uncas de toxoplasmose du chien observé à Turin. *Bulletin of the Exotic Pathology Society*, 28: 359-363.
- MENDONÇA, C. E.; BARROS, S. L.; GUIMARÃES, V. A.; FERRAUDO, A. S.; MUNHOZ, A. D. (2013). Prevalence and risk factors associated to ovine toxoplasmosis in northeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 22(2): 230-234.
- MESQUITA, L. P.; NOGUEIRA, C. I.; COSTA, R. C.; ORLANDO, D. R.; BRUHN, F. R. P.; LOPES, P. F. R.; NAKAGAKI, K. Y. R.; PECONICK, A. P.; SEIXAS, J. N.; BEZERRA JUNIOR, P. S.; RAYMUNDO, D. L.; VARASCHIN, M. S. (2013) Antibody kinetics in goats and conceptuses naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet Parasitol*, 196(3-4): 327-333.
- MILLAN, J.; CABEZON, O.; PABON, M.; DUBEY, J. P.; ALMERIA, S. (2009) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in feral cats (*Felis silvestris catus*) in Majorca, Balearic Islands, Spain. *Vet Parasitol*, 165(3-4): 323-326.
- MILLER, M. A.; CONRAD, P. A.; HARRIS, M.; HATFIELD, B.; LANGLOIS, G.; JESSUP, D. A.; MAGARGAL, S. L.; PACKHAM, A. E.; TOY-CHOUTKA, S.; MELLI, A. C.; MURRAY, M. A.; GULLAND, F. M.; GRIGG, M. E. A. (2010) Protozoal associated epizootic impacting marine wildlife: mass-mortality of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) due to *Sarcocystis neurona* infection. *Vet Parasitol*, 172(3-4): 183-194.
- MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. (2004). Toxoplasmosis. *The Lancet*. 363: 1965-1976.

- MORAES, E. P. B.; FARIA, E. B.; BATISTA, A. M.; FREITAS, A. C.; SILVA, J. C. R.; ALBUQUERQUE, P. P.F.; MOTA, R. A. (2010) Detecção de *Toxoplasma gondii* no sêmen de ovinos naturalmente infectados. *Pesq Vet Bras*, 30(11): 915-917
- MORAES, L. M. B.; RAIMUNDO, J. M.; GUIMARÃES, A.; SANTOS, H. A.; JUNIOR, G. L. M.; MASSARD, C. L.; MACHADO, R. Z.; BALDANI, C. D. (2011) Occurrence of anti-*Neospora caninum* and anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in goats and sheep in western Maranhão, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, 20(4): 312-317.
- MORENO, B.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; VILLA, A.; NAVARRO, A.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ORTEGA-MORA, L. M. (2012) Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. *Vet Parasitol*, 187(1-2):312-318.
- MORIKAWA, V. M.; ZIMPEL, C. K.; PAPLOSKI, I. A. D.; LARA, M. C. C. S. H.; VILALOBOS, E. M. C.; ROMALDINI, A. H. C. N.; OKUDA, L. H.; BIONDO, A. W.; BARROS FILHO, I. R. (2014) Occurrences of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in Barbary sheep at Curitiba zoo, southern Brazil. *Braz J Vet Parasitol*, 23 (2): 255-259.
- MULLER, N.; ZIMMERMANN, V.; HENTRICH, B.; GOTTSTEIN, B. (1996) Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. *J Clin Microbiol*, 34(11): 2850-2852.
- NICOLLE, M. M. C.; MANCEAUX, L. (1908) Sur une infection à corps de Leishman (ou organisms voisins) du gondi. *C R Acad Sci*, 147: 763-766.
- NUNES, A. C.; DA SILVA, E. M.; DE OLIVEIRA, J. A.; YAMASAKI, E. M.; KIM P. C.; DE ALMEIDA, J. C.; NUNES, K. B.; MOTA, R. A. (2015). Application of diferente techniques to detect *Toxoplasma gondii* in slaughtered sheep for human consumption. 24(4): 416-421.
- OKUDA L. H.; SILVA, G. J.; VILLALOBOS E. M. C.; DEL FAVA, C.; CUNHA E. M. S.; LARA M. C. C. S. H.; DE STEFANO E.; PITUCO E. M. (2007). Toxoplasmose em um rebanho ovino (*Ovis aries*) no Estado de Minas Gerais, Brasil. ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 13. Campo Grande, 2007.
- ORTEGA-MORA, L. M.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; GÓMEZ-BAUTISTA, M. (2006). Diagnosis of bovine neosporosis: recent advances and perspectives. *Act Parasitol*. 51(1): 1-14.
- O'TOOLE, D.; JEFFREY, M. (1987) Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. *Vet Rec*, 121(24): 563-566.

- OURA, C. A.; INNES, E. A.; WASTLING, J. M.; ENTRICAN, G.; PANTON, W. R. (1993) The inhibitory effect of ovine recombinant interferon gamma on intracellular replication of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol*, 15(9): 535-538.
- PACKHAM, A. E.; CONRAD, P. A.; WILSON, W. D.; JEANES, L. V.; SVERLOW, K. W.; GARDNER, I. A.; DAFT, B. M.; MARSH, A. E.; BLAGBURN, B. L.; FERRARO, G. L.; BARR, B. C. (2002) Qualitative evaluation of selective tests for detection of *Neospora hughesi* antibodies in serum and cerebrospinal fluid of experimentally infected horses. *J Parasitol*, 88 (6): 1239-1246.
- PAIZ, L. M.; SILVA, R. C. DA.; MENOZZI, B. D.; LANGONI, H. (2015) Antibodies to *Neospora caninum* in sheep from slaughterhouses in the state of São Paulo, Brazil *Braz J Vet Parasitol*, 24(1): 95-100.
- PARISH, S. M.; MAAG-MILLER, L.; BESSR, T. E.; WEIDNER, J. P.; MCELWAIN, T.; KNOWLES, D. P.; LEATHERS, C. W. (1987) Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves. *J Am Vet Med Assoc*, 191(12): 1599-1600.
- PESCADOR, C. A.; OLIVEIRA, E. C.; PEDROSO, M. O.; BANDARRA, P. M.; OKUDA, L. H.; CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D. (2007). Perdas reprodutivas associadas com infecção por *Toxoplasma gondii* em caprinos no sul do Brasil. *Pesq Vet Brasil*. 27(4): 167-171.
- PETERS, M.; LUTKEFELS, E.; HECKEROTH, A. R.; SCHARES, G. (2001) Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *Int J Parasitol*, 31(10): 1144-1148.
- PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F.; HADDAD, J. P. A. (2000) Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 52(5): 534-543.
- PINHEIRO, A. F.; BORSUK, S.; BERNE, M. E.; PINTO, L. S.; ANDREOTTI, R.; ROOS, T.; ROLOFF, B. C.; LEITE, F. P. (2015). Use of ELISA based on NcSRS2 of *Neospora caninum* expressed in *Pichia pastoris* for diagnosing neosporosis in sheep and dogs. *Ver Bras Parasitol Vet*. 24(2) 148-154.
- PORTO, W. J. N.; CERRILLO, J. R.; KIM P. C. P.; BENAVIDES, J.; MOTA, R. A.; ORTEGA-MORA, L. M. (2016) Experimental caprine neosporosis: the influence of gestational stage on the outcome of infection. *Vet Res*, 47:29.
- QUINN, H. E.; ELLIS, T.; SMITH, N. C.; (2002) *Neospora caninum*: a cause of immune mediated failure of pregnancy. *Trends in Parasitol*, 18(9): 391-394.

- QUIROZ, H. (2007). Parasitologia y enfermedades parasitarias de animales domésticos. México, Editorial Limusa, 876p.
- RAGOZO, A. M. A.; YAI, L. E. O.; OLIVEIRA, L. N.; DIAS, R. A.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M.; (2008) Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from sheep from São Paulo State. Brazil. J Parasitol, 94(6): 1259–1263.
- REICHEL, M. P. (2000) *Neospora caninum* infections in Australia and New Zealand. Aust Vet J, 78(4): 258-261.
- REICHEL, M. P.; ALEJANDRA AYANEGUI-ALCERRECA, M.; GONDIM, L. F.; ELLIS, J. T. (2013) What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question. Int J Parasitol, 43(2): 133-142.
- REGIDOR-CERRILLO, J.; ARRANZ-SOLÍS, D.; BENAVIDES, J.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.; CASTRO-HERMIDA, J. A.; MEZO, M.; PÉREZ, V.; ORTEGA-MORA, L. M.; GONZÁLEZ-WARLETA, M. (2014) *Neospora caninum* infection during early pregnancy in cattle: how the isolate influences infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses. Vet Res, 45: 10.
- RODRIGUES, A. A.; GENNARI, S. M.; AGUIAR, D. M.; SREEKUMAR, C.; HILL, D. E.; MISKA, K. B.; VIANNA, M. C.; DUBEY, J. P. (2004) Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. Vet Parasitol, 124(3-4): 139-150.
- ROSBOTTOM, A.; GIBNEY, H.; KAISER, P.; HARTLEY, C.; SMITH, R. F.; ROBINSON, R.; KIPAR, A.; WILLIAMS, D. J. (2011) Up regulation of the maternal immune response in the placenta of cattle naturally infected with *Neospora caninum*. Plos One, 6(1): 1-16.
- ROSSI, G. F.; CABRAL, D. D.; RIBEIRO, D. P.; PAJUABA, A. C. A. M.; CORRÊA, R. R.; MOREIRA, R. Q.; MINEO, T. W. P.; MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O. (2011) Evaluation of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Uberlândia, Minas Gerais State, Brazil, by different serological methods. Vet Parasitol, 175(3-4): 252–259.
- SABIN, A. B.; OLITSKY, P. K. (1937). *Toxoplasma* and obligate intracellular parasitism. Scienc. 85: 336-338.
- SAKATA, F. B. L. S.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; MOURA, A. B.; SOUZA, A. P.; FARIAS, J. A. (2012). *Toxoplasma gondii* antibodies sheep in lages, Santa Catarina, Brazil, and comparison using IFA and ELISA. Rev Bras Parasitol Vet. 21(3) 196-200.

- SALABERRY, S. R. S.; OKUDA, L. H.; NASSAR, A. F. C.; CASTRO, J. R.; RIBEIRO, A. M. C. L. (2010) Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in sheep flocks of Uberlândia county, MG. Rev Bras Parasitol Vet, 19(3): 148-151.
- SANGSTER, C.; BRYANT, B.; CAMPBELL-WARD, M.; KING, J. S.; SLAPETA, J. (2010) Neosporosis in an aborted southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) fetus. J Zoo Wildl Med, 41(4): 725-728.
- SAWADOGO, P.; HAFID, J.; BELLETE, B.; SUNG, R. T.; CHAKDI, M.; FLORI, P.; RABERIN, H.; HAMOUNI, L. B.; CHAIT, A.; DALAL, A. (2005) Seroprevalence of *T. gondii* in sheep from Marrakech, Morocco. Vet Parasitol, 130(1-2): 89–92.
- SHIVAPRASAD, H. L.; ELY, R.; DUBEY, J. P. A. (1989) Neospora-like protozoon found in an aborted bovine placenta. Vet Parasitol, 34(1-2): 145-148.
- SILVA, A. V.; CUNHA, E. L. P.; MEIRELES, L. R.; GOTTSCHALK, S.; MOTA, R. A.; LANGONI, H. (2003) Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soroepidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. Cienci Rural 33:115–119.
- SKJERVE, E.; WALDELAND, H.; NESBAKKEN, T.; KAPPERUD, G. (1998) Risk factors for the presence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in Norwegian slaughter lambs. Prev Vet Med, 35(1): 219–227.
- SMITH, N.C. (1996) An immunological hypothesis to explain the enhanced susceptibility to malaria during pregnancy. Parasitol Today, 12(1): 4 – 6.
- SPLENDRE, D. A. (1908) Un nuovo protozoa parassita de conigli incontrato nelle lesion anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Revista Sociedade Scientifica São Paulo, 3: 109-112.
- SOCCOL, V. T.; CASTRO, E. A.; GAZDA, T. L.; GARCIA, G.; RICHARTZ, R. R. T. B.; DITTRICH, R. L. (2009). Occurrence of anti- *Toxoplasma gondii* antibodies in ovine from urban and periurban áreas from Curitiba, Parana state. Ver Bras Parasitol 18(1) 69-70.
- SOUZA NETO, O.L. ET AL., (2010). Prevalência de anticorpos anti- *Neospora caninum* e fatores de risco associados à infecção em ovinos no município de Gravatá, Pernambuco, Brasil. In: Jornada de ensino, pesquisa e extensão, 10, 2010, Pernambuco. Anais.... Pernambuco, 2010.
- SUZUKI, Y.; ORELLANA, M. A.; SCHREIBER, R. D.; REMINGTON, J. S. (1988). Interferon- γ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. Science, 240(4851): 516–518.

- TEMBUE, A. A. S. M.; RAMOS, R. A. N.; SOUZA, T. R.; ALBUQUERQUE, A. R.; COSTA, A. J.; MEUNIER, I. M. J.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C. (2011). Serological survey of *Neospora caninum* in small ruminants from Pernambuco State, Brazil. *Ver Bras Parasitol Vet.* 20(3): 246-248.
- TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. (2000) *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*, 30(12-13): 1217-1258.
- THILSTED, J. P.; DUBEY, J. P. (1989) Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *J Vet Diagn Invest*, 1(3): 205-209.
- TSUNEMATSU, Y. et al. (1964). Three cases of lymphadenopathy toxoplasmic with reference to the application of fluorescent antibody technique for detection of *Toxoplasma* in tissue. *Journal of Experimental Medicine*, 34(4): 217-230.
- TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. (2005) Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol*, 21(12): 558-561.
- TRUPPEL, J. H.; MONTIANI-FERREIRA, F.; LANGE, R. R.; VILANI, R. G.; REIFUR, L.; BOERGER, W.; DA COSTA-RIBEIRO, M. C.; THOMAZ-SOCCOL, V. (2010) Detection of *Neospora caninum* DNA in capybaras and phylogenetic analysis. *Parasitol Int*, 59(3): 376-379.
- UGGLA, A. et al. (1987). Immunohistochemical diagnosis to toxoplasmosis in fetuses and fetal membranes of sheep. *American Journal of Veterinary Research*. 48(3): 348-351.
- VAN MAANEN, C.; WOUDA, W.; SCHARES, G.; VON BLUMRODER, D.; CONRATHS, F. J.; NORTON, R.; WILLIAMS, D. J.; ESTEBAN-REDONDO, I.; INNES, E. A.; MATTSSON, J. G.; BJORKMAN, C.; FERNANDEZ-GARCIA, A.; ORTEGA-MORA, L. M.; MULLER, N.; SAGER, H.; HEMPHILL, A. (2004) An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. *Vet Parasitol*, 126(4): 351-364.
- VAUGHAN, L. (1996). Abortion in sheep. The compendium on continuing Education for the Praticing Veterinarian, 49(3): 170-174.
- VELARDE, F. I.; MONTENEGRO, Y. V.; CANTO, Y. A. (2009). *Parasitologia Veterinaria-Protozoários*. Editorial CASTDEL, Volume 1, México, 174p.
- VIDOTTO, O. (1992) Toxoplasmose: epidemiologia e importância da doença na saúde animal. *Semina. Clínica Agrária, Londrina*, 13(1): 69-75.

- VITOR, R. W.A.; FERREIRA, A. M.; FUX, B. (1999). Antibody response in goats experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol.* 81: 259-263.
- VON WASIELEWSKI, R. et al. (1997). Tyramine amplification technique in routine immunohistochemistry. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, Baltimore, 45(11): 1455-1459.
- WATSON, W. A.; BEVERLEY, J. K. A. (1971) Epizootics of toxoplasmosis causing ovine abortion. *Vet Record*, 88(5): 120–124.
- WEISSMANN, J. (2003) Presumptive *Toxoplasma gondii* abortion in a sheep. *Can Vet J*, 44(4): 322-324.
- WILLIAMS, D. J.; MCGARRY, J.; GUY, F.; BARBER, J.; TREES, A. J. (1997) Novel ELISA for detection of Neospora-specific antibodies in cattle. *Vet Rec*, 140(13): 328-331.
- WILLIAMS, J. H.; ESPIE, I.; VAN WILPE, E.; MATTHEE, A. (2002) Neosporosis in a white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) calf. *J S Afr Vet Assoc*, 73(1): 38-43.
- WILLIAMS, D. J. L.; GUY, C. S.; SMITH, R. F.; GUY, F.; MCGARRY, J. W.; MCKAY, J. S.; TREES, A. J. (2003) First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. *Int J Parasitol*, 33(10): 1059 – 1065.
- WOLF, A.; COWEN, D.; PAIGE, B. (1939). Human toxoplasmosis: occurrence in infants as na encephalomyelitis: verification by transmission to animals. *Scienc.* 89: 226-227.
- WONG, S. Y.; REMINGTON, J. S. (1993). Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS.* 7(3): 299-316.
- YAI, L. E.; RAGOZO, A. M.; CANON-FRANCO, W. A.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. (2008) Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from Sao Paulo State, Brazil. *J Parasitol*, 94(3): 766.
- YAMANE, I.; KOKUHO, T.; SHIMURA, K.; ETO, M.; HARITANI, M.; OUCHI, Y.; SVERLOW, K. W.; CONRAD, P. A. (1996) In vitro isolation of a bovine Neospora in Japan. *Vet Rec*, 138(26): 652.
- YAP, G.S.; SHER, A. (1999) Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)- γ - and tumor necrosis factor (TNF)- α -dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med*, 189(7):1083–1092.

ANEXO A



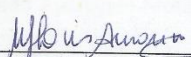
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

Comissão de ética no uso de animais - CEUA

Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	117/2015
Número do processo	23082.017704//2015
Data de emissão da licença	26 de Outubro de 2015
Título do Projeto	Avaliação da taxa de transmissão vertical do <i>Neospora caninum</i> e <i>Toxoplasma gondii</i> em ovinos
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Rinaldo Aparecido Mota
Colaboradores	Paulo Cesar Gonçalves de Azevedo Filho; Renata Pimentel Bandeira de Melo; Muller Ribeiro Andrade .
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Ovino; total 800 animais (400 machos e 400 fêmeas).


Prof. Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
(Coordenadora da CEUA-UFRPE)



Prof.ª Dr.ª Marleyne Amorim
Coordenadora CEUA