

RODOLFO LUIZ GODOY DO AMARAL

**PESQUISA DE *Neospora caninum* EM VACAS E FETOS EM
MATADOUROS NOS ESTADOS DE PERNAMBUCO E ALAGOAS,
BRASIL**

**RECIFE
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

RODOLFO LUIZ GODOY DO AMARAL

**PESQUISA DE *Neospora caninum* EM VACAS E FETOS EM
MATADOUROS NOS ESTADOS DE PERNAMBUCO E ALAGOAS,
BRASIL**

**RECIFE
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**PESQUISA DE *Neospora caninum* EM VACAS E FETOS EM
MATADOUROS NOS ESTADOS DE PERNAMBUCO E ALAGOAS,
BRASIL**

**Dissertação elaborada por
RODOLFO LUIZ GODOY DO AMARAL**

Aprovada em/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Leonildo Bento Galiza da Silva
Orientador - Departamento de Medicina Veterinária/ UFRPE

Prof. Dr. Wagner José Nascimento Porto
Universidade Federal de Alagoas/UFAL

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior
Unidade Acadêmica de Garanhuns/UAG

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota
Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE

DEDICATÓRIA

Tenho duas grandes joias na minha vida,
meus pais: Amaral e Edileuza os maiores exemplos de
dedicação, amor, paciência e carinho que um ser humano pode receber.

AGRADECIMENTOS

São tantas pessoas para agradecer que fica difícil escrever, pois talvez possa ser injusto com alguém, então decidi escrever o máximo possível.

Em primeiro lugar Deus fica, pois sem a crença e a fé que tenho nada estaria aqui. Pois só Deus me deu força nos momentos difíceis que um dia já tive.

Aos meus pais a quem devo tudo da minha vida; o amor que tenho por estes dois é uma coisa de outro mundo. Aos meus filhos Julia e Rafael que amo tanto e por quem sempre irei lutar.

Gostaria de agradecer todo carinho por mim recebido pela pessoa de Ericka Alves, no qual me faz feliz todos os dias e que nunca me deixa desistir das minhas lutas.

A minha irmã Carmem Godoy, você é a melhor irmã do mundo; agradeço a DEUS por ser seu irmão. Não posso esquecer a minha grande prima irmã Evanily Godoy.

Ao meu irmão Fábio Godoy, muito obrigado.

Ao meu orientador, Professor Leonildo Bento Galiza da Silva que foi um exemplo de amigo, confiança e sabedoria, mesmo sem ser aluno dele na graduação me aceitou e orientou da melhor forma possível, meu muito obrigado caro Professor Léo do fundo do meu coração.

Ao Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota, que foi de fundamental importância na conclusão deste trabalho e para quem dedico todo o meu respeito e admiração.

As pesquisadoras do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhaes/ FIOCRUZ - Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida e Dra. Nilma Cintra Leal, tudo começou com estas duas pessoas, quando fui bolsista do PIBIC/ CNPq.

Agradeço de forma bastante sincera aos professores Andréa Alice, José Wilton Junior e as doutoras Nair Lira e Érica Moraes, pessoas que me ajudaram nesta caminhada. E ao Prof. Wagner Porto e toda sua equipe (UFAL).

Aos meus amigos de mestrado e aos meus amigos do Laboratório de Bacterioses: Pomy, André Santos, Marcela Samico, Erica Samico, Bruno Alves e ao meu grande amigo Sílvio Gomes (companheiro e conselheiro), meu muito obrigado especialmente aos veterinários Orestes, Pedro Paulo e Adriano. Não poderia me esquecer da minha amiga Ivelza Sotero (LACIR/BONITO).

Agora no final agradeço a todos que me ajudaram a vencer.

Agradeço imensamente a parceria da Prefeitura Municipal de São Joaquim do Monte e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

A todos MUITO OBRIGADO. Sem a participação de cada um de vocês essa vitória não seria hoje uma realidade!

“A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos,
mas sim em levantarmo-nos sempre
depois de cada queda”.

(Confúcio)

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
µL	Microlitro
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio imuno enzimático
°C	Graus Celsius
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SNC	Sistema Nervoso Central
H D	Hospedeiro Definitivo
H I	Hospedeiro Intermediário
IgG	Imunoglobulina
N C-1	Sequência nucleotídica
VERO	linhagem celular derivada do rim do macaco africano

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo biológico do *Neospora caninum*

pág. 14

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	11
2.1 – Objetivo geral	11
2.2 – Objetivo específico	11
3. REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1 – Histórico da neosporose	12
3.2 – Etiologia	13
3.3 – Ciclo biológico	14
3.4 – Aspectos epidemiológicos	15
3.5 – Patogenia e sinais clínicos	17
3.6 – Diagnóstico	19
3.6.1 – Diagnóstico parasitológico	19
3.6.2 – Diagnóstico sorológico	20
3.7 – Controle e prevenção	21
4. REFERÊNCIA	22
5. ARTIGO CIENTÍFICO	29
5.1 – <i>Neospora caninum</i> EM BOVINOS NOS ESTADOS DE PERNAMBUCO E ALAGOAS, BRASIL	

**PESQUISA DE *Neospora caninum* EM VACAS E FETOS EM
MATADOUROS NOS ESTADOS DE PERNAMBUCO E ALAGOAS,
BRASIL**

RESUMO: A Neosporose bovina é uma doença infecciosa causada pelo *Neosporacanicum*, parasito intracelular obrigatório, sendo considerada uma das principais causas de aborto na espécie bovina em diversos países. Objetivou-se estudar a ocorrência de *N.caninum* em vacas e fetos nos Estados de Pernambuco e Alagoas, Brasil. Foram coletadas 306 amostras de soro sanguíneo de vacas abatidas e 30 fetos nos Estados de Pernambuco e Alagoas. Para o diagnóstico sorológico utilizou-se a técnica de reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) com ponto de corte 1:200 para os soros das vacas e para os soros fetais utilizou ponto de corte 1:25 a pesquisa do DNA parasitário utilizou-se tecidos fetais submetidos à técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Na sorologia, observou-se 39/306 (12,6%) das vacas positivas e 5/30 (16,7%) dos fetos positivos. Na detecção do parasito 8/30 (26,6%) dos fetos foram positivos na PCR. Os resultados obtidos neste estudo quanto a presença do parasito nos fetos são inéditos para a região estudada e permitem concluir que este agente deve ser incluído no estudo das causas de aborto na espécie bovina nesta região do Brasil.

PALAVRAS-CHAVES: neosporose, diagnóstico, bovinos

***Neospora caninum* IN SEARCH FETAL AND COWS IN THE
SLAUGHTERHOUSE STATES OF PERNAMBUCO AND
ALAGOAS, BRAZIL**

SUMMARY: The bovine neosporosis is an infectious disease caused by *Neosporacanicum*, obligate intracellular parasite, and is considered a major cause of bovine abortion in various countries. The objective was to study the occurrence of *N. caninum* in cows and fetuses in the states of Pernambuco and Alagoas, Brazil. We collected 306 blood serum samples from slaughtered cows and 30 fetuses in the states of Pernambuco and Alagoas. For serological diagnosis, we used the technique of immunofluorescence reaction (RIFI) with a cutoff 1:200 for sera of cows and fetal sera used cutoff 1:25 parasitic DNA research, we used tissue fetal submitted to the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR). Serological assays, we observed 39/306 (12.6%) of the positive cows and 5/30 (16.7%) of positive fetuses. To detect the parasite 8/30 (26.6%) of fetuses were PCR positive. The results of this study as the presence of parasites in fetuses are unprecedented for this region and allow us to conclude that this agent should be included in the study of causes of bovine abortion in this region of Brazil.

KEYWORDS: neosporosis, diagnosis, cattle

1 – INTRODUÇÃO

A neosporose é uma doença parasitária causada por um protozoário denominado *Neospora caninum* (DUBEY et al., 1988); é considerada uma das principais causas de abortamentos em bovinos em várias regiões do mundo (THILSTED; DUBEY, 1989, ANDERSON et al., 1991, DUBEY; LINDSAY, 1996, DUBEY, 1999). Os abortos geralmente ocorrem a partir do terceiro mês de gestação e também podem ocorrer natimortos e bezerros com sinais clínicos neurológicos devido às lesões inflamatórias do sistema nervoso central (SNC) ou ainda nascerem clinicamente saudáveis, mas cronicamente infectados devido à transmissão transplacentária (DUBEY ; LINDSAY, 1996).

É reconhecida como uma enfermidade de grande impacto econômico por ser considerada uma das principais causas de distúrbios reprodutivos em bovinos (SARTOR et al., 2005). Entre as perdas econômicas associadas à doença está o aborto e a baixa taxa de desfrute que representam uma perda econômica de 27,3% da receita total no momento da venda de bezerros, com redução na rentabilidade de R\$ 66.372,39 para um sistema produtivo com 1.000 novilhas (BARROS et al., 2010)

Relatos desta doença no Brasil surgiram no ano de 1996 em bovinos com histórico de aborto (BRAUTIGAM et al., 1996). A detecção deste parasito em fetos bovinos abortados ocorreu no ano de 1998 em uma propriedade onde alguns animais haviam apresentado sorologia positiva para *N. caninum* na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (GONDIM et al., 1999).

Embora a infecção por *N. caninum* já tenha sido relatada em diversos Estados brasileiros, poucos são os estudos sobre os aspectos epidemiológicos da neosporose em algumas regiões. Desta forma e considerando os escassos trabalhos realizados em alguns Estados da região Nordeste do país sobre a ocorrência da infecção por este parasito em bovinos, objetivou-se com este estudo contribuir com dados regionais sobre a ocorrência da infecção em vacas e fetos em matadouros nos estados de Pernambuco e Alagoas.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Geral:

- Estudar a ocorrência da infecção por *Neospora caninum* em vacas e fetos nos Estados de Pernambuco e Alagoas

2.2 – Específicos:

- Realizar pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas e fetos nos estados de Pernambuco e Alagoas
- Pesquisar a presença de *Neospora caninum* em amostras de fetos procedentes dos estados de Pernambuco e Alagoas.

3 – REVISÃO DE LITERATURA

3.1 – Histórico da neosporose

Na Noruega, em 1984, foi observado um protozoário semelhante ao *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) em tecidos de cães de raça boxer, porém, os animais não apresentavam anticorpos contra *T. gondii* nos exames sorológicos. Os pesquisadores levantaram a hipótese de que um parasito imunologicamente distinto de *T. gondii* teria causado a morte dos cães (BJERKAS et al., 1991). Posteriormente, revisaram os casos clínicos e os cortes histológicos de 23 cães com diagnóstico ou suspeita de toxoplasmose, examinados em um Hospital Veterinário em Boston, nos Estados Unidos, através de microscopia eletrônica de transmissão e técnicas imunohistoquímicas. Em treze destes cães foi identificado *T. gondii* e em dez deles foi identificado um novo parasito incluído no gênero *Neospora* e espécie *Neospora caninum*. Foi reconhecido como protozoário distinto de *T. gondii*, pois apresentava algumas diferenças estruturais e não reagia com o soro anti-*T. gondii* no teste de imunoperoxidase e também se isolou o protozoário em cultivo celular, camundongos e em cães inoculados com tecidos dos cães sabidamente infectados. As principais lesões observadas em 20 cães estudados foram: meningoencefalomielite, miosite, poliradiculoneurite e encefalomielite e sinais de paralisia de membros posteriores (DUBEY et al., 1988).

Os primeiros relatos de infecção por *N. caninum* em bovinos com sinais de aborto no Brasil foram feitos no ano de 1996 (BRAUTIGAM et al., 1996).

Em Pernambuco o primeiro relato da infecção por *N. caninum* em vacas leiteiras foi feito por Silva et al. (2002) no município de Gravatá, que observaram uma frequência de 31,7% (163/469). Estas amostras séricas foram testadas pela Reação Imunofluorescência Indireta (RIFI), utilizando ponto de corte a diluição de 1:200.

No Estado de Alagoas, SOUZA (2011) estimaram uma frequência de 7,6% (77/1004) em 17 propriedades leiteiras da microrregião de Batalha/AL, através do teste de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), com um ponto de corte de 1:200.

3.2 – Etiologia

Neospora caninum pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Coccida, família *Sarcocystidae* (ELLIS et al., 1994). Apresenta ciclo de vida semelhante ao do *T. gondii*, porém com capacidade antigênica distinta e ausência de reatividade cruzada em análise sorológica (BJORKMAN; UGGLA, 1999).

No hospedeiro definitivo (HD) ocorre a fase sexuada e no hospedeiro intermediário (HI) ocorre a fase assexuada. Os cães (HD) se infectam ao consumir tecidos infectados com o parasito na forma cística oriundos dos hospedeiros intermediários como os bovinos, caprinos e ovinos, entre outros. Em seguida ocorre a fase sexuada no HD, com a multiplicação do parasito no intestino e liberação dos oocistos nas fezes (COLLERY, 1996).

No ambiente, estes oocistos se desenvolvem em esporozoítos em um processo chamado esporulação (DUBEY et al., 2002). Os oocistos esporulam entre 24 a 72 horas sob condições ótimas (LINDSAY et al., 1999).

Além dos cães, os coiotes (*Canis latrans*) são considerados hospedeiros definitivos e eliminam oocistos de *N. caninum* nas fezes (GONDIM et al., 2004). Esses autores alimentaram quatro coiotes jovens com tecidos de bezerros infectados experimentalmente com taquizoítos e oocistos de *N. caninum* e observaram que entre o oitavo e décimo dia da infecção oral, um coioote eliminou cerca de 500 oocistos do parasito que foram confirmados na PCR.

O HI se infecta ingerindo alimentos contaminados com fezes contendo oocistos esporulados. No estômago do HI, os oocistos se rompem pela ação mecânica, liberando os esporozoítos que invadem os tecidos que sofrem multiplicação assexuada originando taquizoítos móveis, que se desenvolvem dentro de vacúolos parasitófagos em várias células como neurônios, macrófagos, fibroblastos e miócitos (COLLERY., 1996).

Nos HI, os bradizoítos (forma lenta de multiplicação) são encontrados no tecido nervoso e podem ficar em latência por meses ou anos, restabelecendo o ciclo quando consumido por um HD (DUBEY; LINDSAY, 1996). Encontram-se dentro dos cistos teciduais, como forma de proteção contra reações imunológicas e fisiológicas do hospedeiro (FUCHS et al., 1998). Os cistos apresentam forma arredondada e sua parede é lisa, apresentando ramificações e sua espessura depende do tempo de infecção. Os taquizoítos (forma rápida de multiplicação rápida) são ovóides, possuem três organelas secretoras

diferentes que participam da invasão, formação e manutenção do vacúolo parasitófago, o que permite a sobrevivência e proliferação do parasito (HEMPHILL et al., 1996).

Quanto à resistência dos oocistos no ambiente, ainda não se sabe muito (DUBEY, 2003), porém em trabalho recente realizado por Alves Neto (2009) demonstrou que os oocistos são sensíveis ao calor a 100 °C por um minuto e hipoclorito de sódio a 10% por uma hora.

3.3 – Ciclo Biológico

De acordo com Dubey, 2003 o *N. caninum* possui vários hospedeiros intermediários que podem ser tanto animais domésticos como o bovino, ovelha, cabra, equinos, búfalos e lhamas dentre outros, quanto silvestres, como veado, felinos selvagens, antílopes e pacas. Os hospedeiros intermediários se infectam via transplacentária (transmissão vertical) ou através da ingestão de alimentos ou água contaminados com oocistos ou placentas infectadas (transmissão horizontal). Já os hospedeiros definitivos se infectam pela ingestão de placenta, carne e vísceras de fetos abortados de vacas infectadas (figura 1).

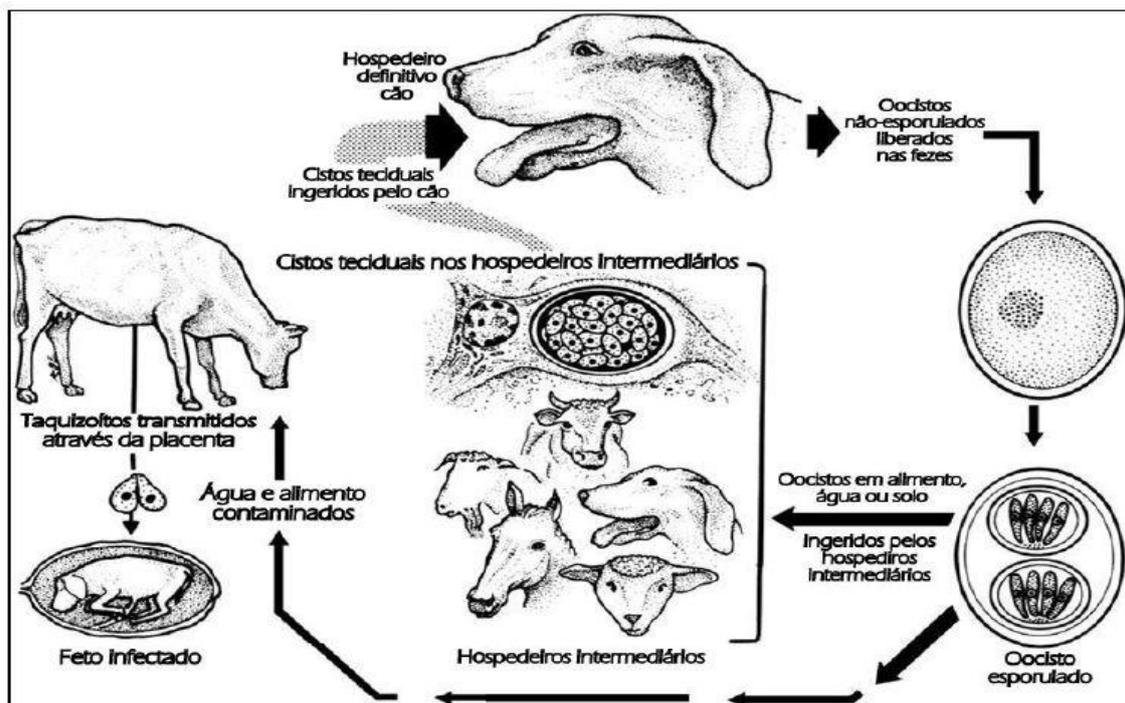


Figura 1: Ciclo biológico do *Neospora caninum* Fonte : DUBEY., 1999

Anticorpos contra *N. caninum* encontrados nos fetos podem confirmar a infecção por este protozoário, no entanto, a resposta imunológica depende de alguns fatores como o estágio de desenvolvimento fetal, nível de exposição e tempo entre a infecção e a coleta de sangue, podendo ocorrer falso-negativos (DUBEY e LINDSAY, 1996). Por outro lado, a presença de anticorpos assegura a ocorrência da infecção congênita sem a interferência da imunidade passiva.

Uma vez adquirida a infecção, os animais permanecem infectados por toda a vida, pois não há tratamento; os animais podem transmitir a infecção aos seus descendentes em diversas gestações, consecutivas ou não, com porcentagem que varia de 50% a 95% (PARÉ et al., 1996; WOUDA et al., 1998).

A transmissão do parasito via sêmen contaminado também foi pesquisada. O DNA do parasito foi detectado em amostras de sêmen de touros soropositivos para *N. caninum* (ORTEGA-MORA et al., 2003). Em outro estudo, sêmen bovino contaminado experimentalmente com taquizoítos de *N. caninum* induziu infecção em vacas que foram inseminadas (SERRANO-MARTINEZ et al., 2007). Diante da comprovação de que o parasito pode estar presente no sêmen de bovinos naturalmente infectados, deve-se investigar o potencial do sêmen na transmissão de *N. caninum*.

Atualmente, *N. caninum* foi confirmado em colostro de vacas infectadas o que também deve ser investigado como uma nova via de transmissão do parasito (MOSKWA et al., 2007). Bezerros que receberam leite com taquizoítos soroconverteram, mas não apresentaram sinais clínicos ou lesões teciduais; na PCR de cérebro e coração não foi detectado DNA de *N. caninum* (DAVISON et al., 2001). Entretanto, o colostro de vacas soropositivas foi avaliado e o DNA do parasito foi confirmado por PCR, o que representa uma via potencial de transmissão deste coccídeo entre bovinos (MOSKWA et al., 2007).

3.4 -Aspectos epidemiológicos

N. caninum pode infectar várias espécies de mamíferos como hospedeiros naturais (bovinos, bubalinos, ovinos, caprinos, cães, raposas e coiotes, cervídeos e camelos) e experimentais (suínos, leporinos, felinos, raposas, dingos e coiotes, e camundongos, ratos e

gerbils, guaxinins e primatas) (DUBEY, 1999; DUBEY e LINDSAY, 2000; GONDIM et al., 2001; GUIMARÃES JUNIOR e ROMANELLI, 2006).

Em ruminantes, os mecanismos de infecção por *N. caninum* são caracterizados pela transmissão vertical e horizontal; nesta última os bovinos podem se infectar pela ingestão de oocistos eliminados nas fezes de cães e coiotes (GONDIM et al., 2004). A transmissão vertical é a principal forma de manutenção do agente nos rebanhos bovinos com abortamentos enzootico (ANDERSON et al., 2000), pois a maioria das infecções congênicas resulta em bezerros clinicamente normais, porém persistentemente infectados (SARTOR et al., 2005).

Também chamada de transplacentária a transmissão vertical é a principal via de disseminação da *N. caninum*, onde novilhas infectadas, que se apresentam saudáveis quando adultas, podem transmitir o agente para o feto que é particularmente vulnerável, contribuindo para a manutenção do parasito no rebanho bovino. Há relatos que esta via seja responsável em pelo menos 36,8% em novilhas positivas para neosporose (ANDERSON et al., 1997; INNES et al., 2005)

A presença de anticorpos específicos para *N. caninum* em amostras de soro de vacas que abortaram não demonstra uma infecção ativa e nem se pode afirmar que o agente foi responsável pelo aborto; apenas que o animal foi exposto ao agente (DUBEY, 1999).

Pesquisas sorológicas têm sugerido que títulos ≥ 200 (RIFI) são específicos para infecção por *N. caninum* (GUIMARÃES JÚNIOR e ROMANELLI, 2006, DUBEY et al., 1996). Ragozo et al. (2003) sugerem que o animal está na fase aguda da doença quando a detecção de títulos na RIFI é igual ou maior que 800. Além disso, títulos iguais ou acima de 800 também foram encontrados em fetos abortados, supondo tratar-se de primeira exposição do concepto ao parasito (GUEDES et al., 2008).

A prevalência da infecção por *N. caninum* no Brasil pode variar de acordo com a região e estudos demonstraram que a frequência de animais positivos encontra-se entre 8,80 a 50,74 (Tabela 01).

Tabela 1 – Registro da infecção por *Neospora caninum* em bovinos nos diversos Estados do Brasil

Estados	Autor	Ano	Técnica empregada	FR (%)
Bahia	GONDIM et al	1999	RIFI	14,09
São Paulo	COSTA et al	2001	RIFI	16,83
Minas Gerais	COSTA et al	2001	RIFI	49,17
Pernambuco	SILVA et al.	2002	RIFI	31,70
Rio Grande do Sul	CORBELLINI et al.	2002	RIFI	11,20
Rio de Janeiro	RAGOZO et al.	2003	RIFI	14,70
Minas Gerais	RAGOZO et al.	2003	RIFI	29,00
São Paulo	HASEGAWA et al.	2004	RIFI	15,57
Amazonas	AGUIAR et al.	2006	RIFI	8,80
Rio de Janeiro	MUNHOZ et al.	2006	RIFI	25,70– 20,38
Goiás	MELO et al.	2006	RIFI	30,40
Rio Grande do Sul	VOGEL et al.	2006	ELISA	11,40
Rio Grande do Sul	CORBELLINI et al.	2006	RIFI	17,80
Mato Grosso do Sul	MELO et al.	2008	RIFI	9,17
Paraná	LOCATELLI-DITTRICH et al.	2008	ELISA	33,00
Espírito Santo	FANTI et al.	2009	RIFI	17,50
Mato Grosso	BENETTI et al.	2009	RIFI	53,50
Goiás	MOREIRA et al.	2010	RIFI	43,4
Maranhão	TEXEIRA et al.	2010	RIFI	50,74
Rio Grande do Sul	PINHEIRO et al.	2011	ELISA	50,37
Tocantins	NEKITA et al.	2011	RIFI	25,00

Fonte: Adaptado de Souza (2011)

3. 5 – Patogenia e Sinais Clínicos

Cães e outros carnívoros podem ser infectados naturalmente pela ingestão de cistos presentes principalmente no sistema nervoso central (Dubey, 1999.) pela ingestão de placentas infectadas de bovinos e músculos infectados ou ainda ser infectado verticalmente durante a vida intrauterina (DUBEY e LINDSAY, 1996).

Após causar a morte celular devido à multiplicação dos taquizoítos, o protozoário atinge as células alvo pela via sanguínea e linfática. O parasito precisa reconhecer a célula hospedeira para estabelecer a infecção; proteínas são usadas como receptores do parasito que

parece invadir a célula hospedeira por meio do fechamento das membranas até ser englobado pela membrana do vacúolo parasitóforo (HEMPHILL et al., 1996). O protozoário provoca mudanças metabólicas no hospedeiro, favorecendo a invasão e depois da penetração, o vacúolo se desloca para o interior da célula hospedeira. No fim do desenvolvimento intracelular, o vacúolo parasitóforo se desintegra antes da lise da célula hospedeira e os taquizoítos vão infectar células adjacentes, se transformam em bradizoítos que são capazes de formar cistos teciduais e persistir por vários anos sem provocar sinais clínicos (FUCHS et al., 1998).

As vacas infectadas, geralmente são portadoras e apresentam como sinal apenas os abortos, que se concentram no segundo terço da gestação, sendo a média em torno do quinto mês e meio. A infecção ainda pode resultar mumificações, mortes no útero seguida de reabsorções e natimortos, além do nascimento de bezerros com sintomatologia nervosa ou clinicamente sadios, mas cronicamente infectados (DUBEY, 2003). A causa do aborto é de difícil determinação, mas a inflamação e necrose difusa são achados característicos no coração do feto e na placenta, sendo que a morte fetal provavelmente ocorra devido à miocardite (BUXTON et al., 1998).

. Em ruminantes, a placenta não permite a transferência de imunoglobulina materna para a circulação fetal. Desta forma, qualquer anticorpo no soro pré-colostral é derivado do feto que indica uma resposta imune ativa contra o parasito (CARDOSO et al., 2008).

Nas vacas infectadas pode ocorrer a reativação da infecção em decorrência da imunossupressão fisiológica da gestação de origem endócrina, resultando na transmissão transplacentária do protozoário ao feto (INNES et al., 2002). Durante este processo de reativação, o protozoário deixa os cistos teciduais na forma de taquizoítos que atravessam a placenta e atinge o embrião ou o feto (GUY et al., 2001).

O sistema imunológico de bovinos se desenvolve de forma progressiva durante a gestação. No primeiro trimestre, o feto é vulnerável às infecções por micro-organismos, uma vez que os órgãos linfóides como o timo, baço e linfonodos não apresentam completo desenvolvimento. No segundo trimestre, o feto é capaz de desenvolver uma resposta imunológica a vários patógenos (INNES et al., 2005). Assim, quando a infecção por *N. caninum* ocorre no primeiro trimestre de gestação, aumenta a ocorrência de morte fetal. No segundo terço, uma resposta rudimentar começa a ser estabelecida, apesar de não ser suficiente para protegê-lo, uma vez que a maioria dos abortos acontece nesse período (ANDERSON et al., 2000). Quando a infecção ocorre no último terço de gestação geralmente o feto sobrevive, podendo nascer infectado e apresentar-se clinicamente sadio ou não

(BUXTON et al., 2002). Também podem apresentar exoftalmia e aparência assimétrica dos olhos. Entretanto, deve-se destacar que estes casos são pouco frequentes e que a grande maioria dos bezerros infectados congenitamente não apresenta sinais clínicos (PICOUX et al., 1998).

Diferenças nos sinais clínicos dependem da idade do feto, do estágio de desenvolvimento do sistema imune, tempo de exposição ao parasito e distribuição das lesões no SNC. Os sintomas nervosos são devido à destruição de grande número de células dos nervos craniais e espinhais o que afeta a condutividade. Miosites e deformidades dos membros são devido à degeneração muscular (ANDERSON et al., 1997).

Os bezerros cronicamente infectados representam importante papel na cadeia epidemiológica da enfermidade por manterem o agente no rebanho (DUBEY, 2003). O aparecimento dos sinais clínicos em bezerros nascidos de mães infectadas ocorre em cerca de cinco dias após o nascimento (GUIMARÃES JÚNIOR e ROMANELLI, 2006).

As lesões macro e microscópicas concentram-se no feto abortado e na placenta. Os fetos podem estar autolisados ou mumificados, sendo esta última forma relativamente comum nos abortos causados por este parasito. Em certos casos se observa unicamente o esqueleto ósseo, tendo em vista que o restante dos tecidos pode ser reabsorvido no útero ou o feto ser eliminado com a placenta. Raras são as alterações macroscópicas que se apresentam na musculatura esquelética ou cardíaca, em forma de pequenas áreas esbranquiçadas que se aprofundam ao corte (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003).

3. 6 – Diagnóstico

Diversas são as técnicas empregadas no diagnóstico da neosporose bovina, podendo dividir-se em dois grupos.

3.6.1 -Diagnóstico parasitológico

Revelam a presença do parasito e neste grupo incluem os seguintes testes: histopatologia, imunohistoquímica, reação em cadeia da polimerase (PCR), isolamento do agente em cultivo celular ou bioprova (BJÖRKMAN e UGGLA, 1999).

O exame histopatológico, imunohistoquímico e o método da PCR são os mais utilizados para o diagnóstico de aborto bovino por *N. caninum*. A associação dessas técnicas de diagnóstico com informações referentes ao histórico do rebanho e sorologia da mãe aumenta a probabilidade de detectar a infecção por *N. caninum* nos fetos bovinos (GOTTSTEIN et al., 1998; BASZLER et al., 1999).

Vários métodos baseados em PCR foram desenvolvidos nos últimos anos, visando a região ITS1 do parasito e a sequência Nc-5 específica de *Neospora*, com diferentes modificações como Nested ou Semi-nested PCR, na intenção de aumentar a sensibilidade e especificidade da técnica (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2002).

No cultivo celular, o cérebro e a medula espinhal de bovinos, fetos e bezerras, são as principais amostras biológicas empregadas para o isolamento de *Neospora caninum* (LOCATELLI-DITTRICH, 2004).

3.6.2 - Diagnóstico sorológico

Estes testes são empregados para evidenciar a presença de anticorpos e as técnicas mais utilizadas são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), método imunoenzimático (ELISA), Western Blot e o teste de aglutinação direta (PITEL, 2001).

A RIFI foi a primeira prova sorológica utilizada para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum*. É baseada no princípio da fixação de taquizoítos do protozoário em lâminas de microscopia e utilização de conjugado anti-IgG bovina marcado com isotiocianato de fluoresceína (BJÖRKMAN e UGGLA, 1999).

Como os taquizoítos utilizados na RIFI apresentam-se intactos, o teste detecta principalmente os anticorpos direcionados para antígenos presentes na superfície celular do parasita (ANDRIANARIVO et al., 2001). Pesquisas epidemiológicas em diversos outros hospedeiros têm demonstrado que a RIFI apresenta uma pequena ocorrência de reação cruzada com outros parasitos (TREES et al., 1994). É considerada referência para detectar anticorpos anti-*N. caninum* e tem sido usada em cães, raposas, gatos, bovinos, caprinos, ovinos, búfalos, equinos, roedores e primatas (BJORKMAN; UGGLA, 1999).

O primeiro teste de ELISA para neosporose foi padronizado e descrito por Björkman et al. (1994). O teste imunoenzimático apresenta algumas vantagens em relação à RIFI como

a realização de um maior número de análises, rapidez, registro das reações realizado de maneira objetiva e o exame pode ser automatizado (PEREIRA-BUENO et al., 2003).

O Western Blot (Immunoblotting) também é utilizado como teste confirmatório em várias espécies animais. Os antígenos imunodominantes utilizados nesta prova possibilitam evidenciar soros com baixos títulos (PINHEIRO et al., 2005).

3. 7 – Controle e prevenção

As medidas de prevenção e controle da neosporose muitas vezes podem tornar-se inviáveis economicamente ou pouco práticas (MUNHÓZ, 2009), pois ainda não há tratamento efetivo. Nos últimos anos, outros desafios para o controle da neosporose tornaram-se conhecidos, como a descoberta de novos hospedeiros de *N. caninum* (GONDIM, 2006), a possibilidade de outras vias de transmissão do parasito, como através do sêmen (ORTEGAMORA et al., 2003) e dificuldades no diagnóstico preciso da infecção (GONDIM, 2008).

Segundo Dubey (2003) a adoção de medidas de controle é de grande importância, tais como: redução da exposição de cães a tecidos infectados como placenta e fetos abortados; redução do número de cães coabitando com o rebanho; uso de maternidades individuais; no caso de transferência de embriões, uso somente de receptoras soronegativas; compra de animais com pelo menos dois resultados negativos para *N. caninum*. Para Moen, Wouda e Mul (1998), deve-se sempre investigar a causa de aborto, enviando feto e placenta e para French et al. (1999), eliminação de animais soropositivos através de uma avaliação sorológica e histórico reprodutivo

4 - REFERÊNCIAS

ALVES NETO A.F.; BANDINI L.A.; NISHI S.M.; SOARES R.M.; DRIEMEIER D, ANTONIASSI N.A.; SCHARES G.; GENNARI S.M. Evaluation of the viability of sporulated oocysts of *Neospora caninum* under different temperature and disinfectants treatments, **Journal Parasitology**, v. 97, p.135-39,2009.

ANDRIANARIVO, A. G. et al. Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, v. 87, p. 817-825, 2001.

ANDERSON, M.L.; BLANCHARD, P.C.; BARR, B.C.; DUBEY, J.P.; HOFFMAN, R.L.; CONRAD, P. A. Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.2, n.198, p. 241-244, 1991.

ANDERSON, M. L.; REYNOLDS, J. P.; ROWE, J. D.; SVERLOW, K. W.; PACKHAM, A. E.; BARR, B. C.; CONRAD, P. A. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. infection in dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 210, p. 1169-1172, 1997.

ANDERSON, M.L.; ANDRIANARIVO, A.G., CONRAD, P.A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.2, p.417-431, 2000.

ÁLVAREZ-GARCIA, G. Identificación y caracterización de antígenos de *Neospora caninum* con interés inmunodiagnóstico en bovinos. 301f. Tese (Doutorado em Veterinária) – Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2003.

BARROS, J.C; NETO, L.F.F.; CUNHA I.C.; ANDREOTTI, R. Diagnóstico da perda econômica causada pela neosporose na reprodução de novilhas de corte. Anais... In: 48º Sociedade Brasileira de Economia Administração e Sociologia Rural, Campo Grande, 2010.

BASZLER, T. V.; GAY, L. J. C.; LONG, M. T.; MATHISON, B. A. Detection by PCR of *Neospora caninum* in foetal tissues from spontaneous bovine abortions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 4059-4064, 1999.

BJERKAS, I.; DUBEY, J. P. Evidence that *Neospora caninum* is identical to the Toxoplasma-like parasite of Norwegian dogs. **Acta Veterinária Scandinavica**, v. 32, n.3, p. 407-410, 1991.

BJÖRKMAN, C.; LUNDÉN, A.; HOLMDAHL, J. et al. *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasit. Immunol.*, v.16, p.643-648, 1994a.

BJORKMAN, C.; NASLUND, K.; STENLUND, S.; MALEY, S. W.; BUXTON, D.; UGGLA, A. An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 41-44, 1999.

BUXTON, D.; MALEY, S.W.; WRIGHT, S.; THOMSON, K.M.; RAE, A.G.; INNES, E.A. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v.118, p.267–279, 1998.

BUXTON, D.; McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 546-552, 2002.

BRAUTIGAM, F.E., HIETALA, S.K., GLASS, R. Resultados de levantamento sorológico para espécie *Neospora* em bovinos de corte e leite. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15, Campo Grande. Anais... Campo Grande: **Sociedade Matrossense do Sul de Medicina Veterinária**, p. 284, 1996.

CARDOSO, JOSÉ MÁRCIO S. et al. Perfil sorológico dos anticorpos colostrais para *Neospora caninum* em bezerros livres da infecção. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animals Science.**, São Paulo, v. 45, n. 5, 2008.

COLLANTES-FERNANDEZ E.; ZABALLOS, A.; ÁLVARES-GARCÍA, G.; ORTEGAMORA, L. M. Quantitative Detection of *Neospora caninum* in Bovine Aborted

Fetuses and Experimentally Infected Mice by Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.4, p.1194-1198, 2002.

COLLERY, P. Neosporosis in domestic animals. **Irish Veterinary Journal.**, v. 49. p. 152-156, 1996.

DAVISON, H.C.; FRENCH, N.P.; TREES, A.J. Herd-specific and age-specific seroprevalence of *Neospora caninum* in 14 British dairy herds. **Veterinary Record**, v. 144, n. 20, p. 547- 550, 1999.

DUBEY, J. P. et al. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 10, p. 1259-1263, 1988

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology** , v. 67, n. 1-2, p. 1-59, 1996.

DUBEY, J. P. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 214, p. 1160-1163, 1999

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. **Parasitology Research**, v. 86: 165-168, 2000.

DUBEY, J.P.; BARR B.C.; BARTA J.R, et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v. 32:929–946,2002.

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

ELLIS, J. et al. The phylogeny of *Neospora caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 64, p. 303-311, 1994.

FUCHS, N., S. SONDA, B. GOTTSTEIN, and A. HEMPHILL. Differential expression of cell surface- and dense granule-associated *Neospora caninum* proteins in tachyzoites and bradyzoites. **Journal Parasitology**, v. 84: p,753-758, 1998.

GONDIM L.F.P., BARBOSA Jr H.V., RIBEIRO FILHO C.H.A. & Saeki H. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 82, p, 273- 276 ,1999.

GONDIM L.F.P.; PINHEIRO A.M.; SANTOS P.O.; JESUS E.E.; RIBEIRO M.B.; FERNANDES H.S.; ALMEIDA M.A.; FREIRE S.M.; MEYER R, McALLISTER M.M.; Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**, v. 101, p. 1-7, 2001.

GONDIM L.F.P., McALLISTER M.M., PITT W.C. & ZEMLICKA D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Internacional Journal for Parasitology**, v. 34, p.159-161, 2004.

GOTTSTEIN, B.; HENTRICH, B.; WYSS, R.; THUR, B.; BUSATO, A.; STARK, K. D.; MÜLLER, N. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 679-691, 1998.

GUEDES M.H.P.; GUIMARÃES A.M.; ROCHA C.M.B.M.; Hirsch C. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas e fetos provenientes de municípios do Sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 189-194, 2008.

GUIMARÃES JÚNIOR J.S.; ROMANELLI P.R.; Neosporose em animais domésticos. **Seminário Ciências Agrárias**, v.27, p. 665-678, 2006.

GUY, C. S. et al. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: Spontaneous transplacental infection is associated with an acute rise in maternal antibody. **Veterinary Record**, v.149, p.443-449, 2001.

HEMPHILL, A., GOTTSTEIN, B., KAUFMANN, H. Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. **Journal Parasitology**, v.112, p.183-197, 1996.

INNES, E.A.; ANDRIANARIVO, A.G.; BJÖRKMAN, C. et al. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends Parasitology**, v.18, p.497-504, 2002.

INNES, E. A.; WRIGHT, S.; BARTLEY, P.; MALEY, S.; MACALDWIE, C.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, p. 29-36, 2005.

LINDSAY D.S.; UPTON S.J.; DUBEY J.P.; A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. **International Journal for Parasitology**, v. 29:1521–1523, 1999.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; VAN DER VINNE, R.; PINCKNEY, R.D. Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13,n.3. p.103-109, 2004.

MOEN, A.R.; WOUDA, W.; MUL, M.F.; GRAAT, E.A.M.; VAN VERTEN, T. Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. **Theriogenology**, v.49, p.1301-1309, 1998.

MOSKWA, B.; PASTUSIAK, K.; BIEN, J.; CABAJ, W. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. **Parasitology Research**, v. 100, p. 633-636, 2007.

ORTEGA-MORA, L.M. Diagnóstico de la infección y del aborto causado por *Neospora caninum* en los bovinos. **Produção Animal**, v. 190, p.52-62, 2003.

PARÉ, J.; THURMOND, M.C.; HIETALA, S.K. Congenital *Neospora caninum* infections in dairy cattle and associated calfhoo mortality. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.60, p.133-139, 1996.

PEREIRA-BUENO, J., QUINTANILLA-GOZALO, A., PÉREZ-PÉREZ, V., ESPIFELGUEROSO, A., ÁLVAREZ-GARCÍA, G., COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., ORTEGAMORA, L. M. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion

associated with *Neospora caninum* in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 111, p. 143-152, 2003.

PICOUX, J. B.; ADLER, C.; CHASTANT, S.; MILLEMANN, Y.; REMY, D. La neosporose bovine: une cause mafeure d'avortement? **Bulletin de la Sociedade Veterinary Praticce de France**, v.82, n. 4, p. 177-201, 1998.

PINHEIRO, A.M.; COSTA, M.F.; PAULE, B.;VALE, V.; RIBEIRO, M.; NASCIMENTO, L.; SCHAER, R.E.; ALMEIDA, M.A.O.;MEYER, R.;FREIRE, S.M. Serogic immunoreactivity to *Neospora caninum* antigens in dogs determined by indirect immunofluorescence, western blotting and dot-ELISA. **Veterinary Parasitology**, v 130, p. 73-79, 2005.

PITEL P.H. et al. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horses in France. **Equine Veterinary Journal**, v.33, p.205-207, 2001.

RAGOZO, A.M.A.; PAULA, V.S.O.; SOUZA S.L.P.; Bergamaschi, D.P., Gennari S.M. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros de bovinos procedentes de seis estados brasileiros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, p.33-37, 2003.

SARTOR, I.F.; GARCIA FILHO, A.; VIANNA, L.C. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros e de corte da região de Presidente Prudente, SP. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.72, p.413-418, 2005.

SERRANO-MARTINEZ, E.; FERRE, I.; OSORO, K.; ADURIZ, G.; MOTA, R. A.; MARTINEZ, A.; DEL-POZO, I.; HIDALGO, C. O.; ORTEGA-MORA, L. M.: Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. **Theriogenology**, v. 67, p. 729-737, 2007.

SILVA, M.I.S.; ALVES, L.C.A.; FAUSTINO, M.A.G.; ALMEIDA, M.A.; PINHEIRO, M.A.; JEUS, E.E.V.; CUNHA, A.P.; NASCIMENTO, E.S.; LIMA, M.M. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros do município de Gravatá, Pernambuco. Anais 12º **Congresso Brasileiro Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, RJ – 2002.

SOUZA, M.E.; Aspectos Epidemiológicos da infecção por *Neospora caninum* em bovinos e cães no estado de Alagoas. 124f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária), Universidade Federal Rural de Pernambuco- 2011.

THILSTED, J.P.; DUBEY, J.P. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.1, n.3, p.205-209, 1989.

TREES, A.J.; GUY, F.; LOW, J.C.; ROBERTS, L.; BUXTON, D.; DUBEY, J.P. Serological evidence implicating *Neospora* species as a cause of abortion in British cattle. **Veterinary Record**, v.134, p.405-407, 1994

WOUDA, W.; BRINKHOF, J.M.A.; VAN MAANEN, C.; de GEE, A.L.W.; MOEN, A.R. Serodiagnosis of neosporosis in individual cows and dairy herds, a comparative study of three enzyme-linked immunosorbent assays. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v.5, p.711-716, 1998.

5. ARTIGO

Neospora caninum EM BOVINOS EM MATADOUROS NOS ESTADOS DE
PERNAMBUCO E ALAGOAS, BRASIL

(FORMATADO PARA O PERÍODICO PESQUISA VETERINÁRIA)

Neospora caninum EM BOVINOS EM MATADOUROS NOS ESTADOS DE
PERNAMBUCO E ALAGOAS, BRASIL

RESUMO: A neosporose bovina é uma doença infecciosa causada pelo *Neospora caninum*, parasito intracelular obrigatório, sendo considerada uma das principais causas de aborto na espécie bovina em diversos países. Objetivou-se estudar a ocorrência de *N. caninum* em vacas e fetos nos Estados de Pernambuco e Alagoas, Brasil. Foram coletadas 306 amostras de soro sanguíneo de vacas abatidas e 30 fetos nos Estados de Pernambuco e Alagoas. Para o diagnóstico sorológico utilizou-se a técnica de reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) com ponto de corte 1:200 para os soros das vacas e para os soros fetais utilizou ponto de corte 1:25 a pesquisa do DNA parasitário utilizou-se tecidos fetais submetidos à técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Na sorologia, observou-se 39/306 (12,6%) das vacas positivas e 5/30 (16,7%) dos fetos positivos. Na detecção do parasito 8/30 (26,6%) dos fetos foram positivos na PCR. Os resultados obtidos neste estudo quanto a presença do parasito nos fetos são inéditos para a região estudada e permitem concluir que este agente deve ser incluído no estudo das causas de aborto na espécie bovina nesta região do Brasil.

PALAVRAS-CHAVES: neosporose, diagnóstico, bovinos

Introdução

Neosporose bovina é uma doença cosmopolita causada pelo *N. caninum* (DUBEY et al., 1988). Essa doença é considerada uma das principais causas de aborto em bovinos no mundo, sendo responsável por grandes prejuízos econômicos em rebanhos de corte e leite (DUBEY; LINDSAY, 1996).

Na América do Sul, rebanhos positivos para *N. caninum* foram notificados na Argentina, Brasil, Chile, Paraguai, Peru, Uruguai e Venezuela (MOORE, 2005).

A transmissão vertical é considerada a principal forma de manutenção do parasito nos rebanhos bovinos (DUBEY et al., 1988).

O primeiro relato de infecção por *N. caninum* em bovinos com sinais de aborto no Brasil foi feito no ano de 1996 no Estado de São Paulo (BRAUTIGAM et al., 1996).

Guedes et al. (2008) realizaram estudo sobre a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em soros de vacas e fetos em matadouro e concluíram que *N. caninum* deve ser incluído no diagnóstico diferencial em casos de abortamento em bovinos no Estado de Minas Gerais, Brasil.

Quando essa infecção atinge o feto em um período em que seu sistema imune ainda não está suficientemente desenvolvido ocorre a multiplicação do protozoário, levando-o à morte geralmente até o 6 mês de prenhes (LINDSAY e DUBEY, 1990).

Considerando a escassez de informações sobre a infecção por este parasito nos Estados de Pernambuco e Alagoas, objetivou-se estudar a ocorrência de infecção por *N. caninum* em vacas em matadouros.

Material e métodos

Área de estudo

As amostras foram coletadas em dois matadouros com Inspeção Municipal, sendo um localizado na cidade de São Joaquim do Monte, Pernambuco e outro na cidade de Viçosa, Alagoas. A cidade de São Joaquim do Monte encontra-se na Mesorregião do Agreste, Microrregião do Brejo Pernambucano. Situa-se a uma latitude 08°25'57" Sul e a uma longitude 35°48'16" Oeste, com uma população bovina de 23.504 cabeças (IBGE, 2010). A cidade de Viçosa está localizada na Mesorregião do Leste Alagoano na Microrregião Serrana dos Quilombos, possui referências geográficas: 9°22'17" Sul e longitude 36°14'27" Oeste. Possui um efetivo de bovinos 31.900 cabeças (IBGE, 2010).

Obtenções das amostras biológicas

Foram colhidas um total de 306 amostras de sangue de vacas, onde 133 pertencentes ao estado de Pernambuco e 173 do Estado de Alagoas, e 30 amostras de sangue fetal, 3 do Estado de Pernambuco e 27 do Estado de Alagoas, independente do estágio de gestação e histórico de problema reprodutivo. A coleta das amostras foi realizada na linha de abate por meio de punção da veia jugular (vacas) ou diretamente do coração (fetos). Após a retração do coágulo sanguíneo, as amostras séricas foram armazenadas em temperatura de freezer até o momento do processamento. Além disso, também foram colhidas amostras de coração e cérebro de 30 fetos que foram mantidos congelados até o seu processamento.

Processamento das amostras

Para a pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* foi empregada a técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Como antígeno utilizou-se taquizoítos da cepa NC-1,

mantidos em cultura de células VERO e utilizados para sensibilizar as lâminas. Como anticorpo secundário foi utilizado o conjugado comercial anti-bovino IgG (Sigma, USA, F7887) marcado com isotiocianato de fluoresceína. Foram utilizadas nas reações soros controle positivo e negativo. Considerou-se positivo, o soro que apresentou título 200 para vacas e 25 para fetos com completa fluorescência da superfície dos taquizoítos de *N. caninum* (DUBEY; SCHARES, 2006).

As amostras de cérebro e coração foram submetidas à extração de DNA, utilizando-se kit comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega®) de acordo com o protocolo do fabricante.

Para a PCR foram utilizados os pares de primers (Np21=5' GGGTGTGCGTCCAATCCTGTAAC 3') e (Np6=5' CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT 3'). As reações de amplificação foram realizadas para volume final de 12,5µL contendo: 2,5µL de DNA genômico; 0,5µL de cada primer (Np21 e Np6); 2,75µL de Água Mili-Q ultrapura e 6,25µL de MasterMix (mistura para PCR - Promega®) de acordo com o protocolo do fornecedor. O perfil térmico das etapas de reações foram feitas em um termociclador BIOER XP Thermal Cyclor (YAMAGE *et al.* 1996).

Os produtos amplificados foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com Blue Green (LGC®), visualizados através de luz ultravioleta e fotodocumentados.

Resultados

Do total de amostras estudadas dos municípios para anticorpos anti-*N. caninum* em soros de vacas, observou-se 12,7% (39/306) de animais positivos, sendo 17,3% (23/133) em São Joaquim do Monte, PE e 9,3% (16/173) no município de Viçosa, AL (Tabela 1).

Tabela 1. Pesquisa anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas abatidas nos estados de Pernambuco e Alagoas, 2011

Município/Estado	Total de amostras	Positivas		Negativas	
		FA	FR (%)	FA	FR (%)
São Joaquim do Monte/PE	133	23	17,3	110	82,7
Viçosa/AL	173	16	9,3	157	90,7

FA frequência absoluta – FR frequência relativa

Na sorologia dos fetos observou-se 16,7% (5/30) de amostras positivas, sendo uma com título 200 e quatro com título 25. Todas as amostras positivas foram procedentes do Estado de Alagoas (Tabela 2).

Tabela 2. Pesquisa anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros fetais nos Estados de Pernambuco e Alagoas, 2011

Município/Estado	Total de amostras	Positivas		Negativas	
		FA	FR (%)	FA	FR (%)
São Joaquim do Monte/PE	3	-	-	3	100,0
Viçosa/AL	27	5	18,6	22	81,4

FA frequência absoluta – FR frequência relativa

Na PCR dos fetos em São Joaquim do Monte, observou-se (6/14) 42,85% das amostras teciduais positivas e em Viçosa (2/16) 12,5% de positivos. Nos tecidos fetais pesquisados (cérebro e coração) observaram-se dois fetos positivos no cérebro, quatro no coração e dois fetos positivos tanto no cérebro como no coração, totalizando oito fetos positivos.

Discussão

A frequência média global de animais positivos observada neste estudo (12,7%) está dentro do limite de variação observado para outros estados do Brasil (Aguiar *et al* 8,8% a Benetti *et al* 53,5%), respeitando alguns fatores que podem interferir diretamente na ocorrência de anticorpos nas populações de bovinos estudadas em diferentes regiões do Brasil. Destaca-se que a média observada para os municípios do estado de Pernambuco e Alagoas para vacas abatidas foi consideravelmente inferior àquela observada para vacas abatidas no estado de Minas Gerais (GUEDES *et al.*, 2008) que registraram frequência de 97,2%.

A variação observada entre os diferentes estudos pode estar relacionada ao perfil da população de vacas abatidas, pois na Microrregião de Lavras- MG, os animais eram constituídos por vacas mestiças e velhas, descartadas de fazendas produtoras de leite localizadas em oito municípios do Sul de Minas Gerais. Já neste estudo, as vacas eram na sua maioria de raça para corte e constituídos por animais mais jovens. De acordo com DUBEY (1999), os animais mais velhos do rebanho apresentam maior risco de infecção pela possibilidade de ingestão de oocistos de *N. caninum* no ambiente, caracterizando a transmissão horizontal do parasito. Este fato também foi confirmado anteriormente por Sanderson *et al.* (2000) nos EUA e Guimarães Jr. *et al.* (2004) no Brasil que observaram maior frequência de bovinos infectados por *N. caninum* com o aumento da idade dos animais.

Outro fator que deve ser considerado para as diferenças observadas é a raça dos animais, pois Munhoz *et al.* (2009) observaram em estudo realizado no Rio de Janeiro que vacas da raça Holandês preto e branco apresentaram mais chances de infecção quando

comparado com animais de raça zebuína e consideraram que a raça é um importante fator de risco individual para a infecção de bovinos.

Quanto à sorologia fetal, observou-se que 16,7% das amostras analisadas foram positivas. Esses resultados são semelhantes àqueles obtidos por Cadore et al. (2010) que realizaram pesquisa de anticorpos em fetos no Sul do Brasil e detectaram 15% de amostras positivas. Ainda se assemelham aos resultados obtidos por Wouda et al. (1997b) na Holanda que relataram 17% de positividade e por Sondgen et al. (2001) que detectaram 12,6% de fetos positivos na Alemanha. Outros estudos observaram resultados mais elevados como o de Morales et al. (2001b), no México que relataram 77% dos fetos examinados positivos e nos Estados Unidos por Anderson et al. (1995) que observaram 42,5% de positivos. De acordo com Cadore (2010), as variações observadas entre os diferentes estudos podem ser decorrentes principalmente do tipo de amostragem realizada, da técnica utilizada e da diluição do soro.

O resultado obtido na sorologia permite confirmar a infecção fetal por *N. caninum* uma vez que anticorpos detectados contra o parasito indicam que o feto produziu anticorpos, já que nos bovinos não existe a transferência de anticorpos maternos via placenta (CARDOSO et al., 2008). Contudo, outros fetos deste estudo também poderiam estar infectados, sem apresentar anticorpos detectáveis, pois de acordo com Dubey (2003), amostras de soro fetal podem apresentar resultado falso-negativo na dependência de fatores como o estágio de desenvolvimento fetal, nível de exposição e tempo entre a infecção e a coleta de sangue. Por outro lado, a presença de anticorpos assegura a ocorrência da infecção congênita sem a interferência da imunidade passiva. Neste estudo, a idade fetal não foi determinada, mas esses resultados indicam que a gestação no caso dos fetos positivos encontrava-se em estado mais avançada, pois nesse período (terço final da gestação), o sistema imunológico do feto

encontra-se apto a responder a estímulos antigênicos, favorecendo a sobrevivência fetal e o nascimento de bezerros saudáveis ou não (BUXTON et al., 2002).

Os resultados deste estudo quanto à sorologia fetal divergem daqueles obtidos por Guedes et al. (2008) que relataram frequência de vacas positivas de 97,2% e somente 12,7% de amostras de soro fetal positivas para animais no estado de Minas Gerais, Brasil. Os autores discutem que a baixa frequência de anticorpos anti-*N. caninum* em soros fetais, se comparada com outros estudos, pode ser explicada, em parte, pela possibilidade da maioria dos fetos serem oriundos de vacas com idade avançada, que foram enviadas para abate, provavelmente pela baixa produção de leite ou problemas reprodutivos. Neste caso, de acordo com ROMERO et al. (2002) e DIJKSTRA et al. (2003), a taxa de infecção congênita por *N. caninum* diminui com o aumento do número de gestações e conseqüentemente com a idade das vacas. Segundo os mesmos autores, a imunidade adquirida atenua a possibilidade de recrudescência da infecção, reduzindo a taxa de transmissão vertical do *N. caninum*.

Quanto aos resultados da PCR, observou-se que 26,6% (8/30) dos fetos foram positivos. Os resultados demonstraram que a frequência de amostras positivas nessa técnica foi maior em fetos no matadouro de Pernambuco quando comparado à Alagoas, seguindo a mesma tendência do resultado da sorologia das vacas. Neste estudo, destaca-se, ainda que foram observadas vacas negativas na sorologia e com fetos positivos na sorologia fetal e PCR.

Santos et al. (2011) analisaram amostras de tecidos de 24 fetos no estado de Minas Gerais, Brasil e detectaram que 33,3% apresentaram lesões histológicas compatíveis no encéfalo e coração e dois também no músculo esquelético e fígado. As amostras de cérebro apresentaram resultados na PCR semelhantes ao percentual de positivos obtido neste estudo, mesmo sendo amostras de propriedades com distúrbios reprodutivos. Moore et al. (2002) e Corbellini et al. (2002) também observaram na imuno-histoquímica positividade de 12,1% e 81,8%, respectivamente para os fetos analisados. As diferenças observadas entre os estudos

pode ser justificada, pois o tipo de amostra foi distinta em propriedades com histórico de problemas reprodutivos e ainda de acordo com a sensibilidade da técnica de diagnóstico utilizada.

Os resultados obtidos neste estudo quanto a presença do parasito nos fetos são inéditos para a região estudada e permitem concluir que este agente deve ser incluído no estudo das causas de aborto na espécie bovina nesta região do Brasil.

Referências

Anderson, ML, Palmer, CW, Thurmond, MC, Picanso, JP, Blanchard, PC, Breitmeyer, RE, Layton, AW, McAllister, M, Daft, B, Read, DH, Dubey, JP, Conrad, PA, 1995. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. J. Am. Vet. Med. Assoc. 207, 1206-1210.

Buxton, D, Maley, SW, Wright, S, Thomsom, KM, Rae, AG, Innes, EA, 2002. The comparative pathogenesis of neosporosis. Trends Parasitol. 18, 546-552.

Cadore, GC, Vogel, FSF, Sangioni, LA, Pena, HFJ, Gennari, SM, 2010. IgM e IgG como marcadores da infecção transplacentária por *Neospora caninum* em fetos bovinos. Pesq. Vet. Bras. 30, 551-553.

Cardoso, JM, Funada, MR, Soares, RM, Gennari, SM, 2008. Perfil sorológico dos anticorpos colostrais para *Neospora caninum* em bezerros livres da infecção. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 45, 379-384.

Corbellini, LG, Driemeier, D, Cruz, CFE, Gondim, LFP, Wald, V, 2002. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. Vet. Parasitol. 103, 195.

- Dijkstra, T, Barkena, H, Eysker, M, Beiboer, MI, Wouda, W, 2003. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. *Vet. Parasitol.* 110, 161-169.
- Dubey, JP, Carpenter, JL, Speer, CA, Topper, MJ, Uggla, A, 1988. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192,1269-1285.
- Dubey, JP, Koestner, A, Piper, RC, 1990. Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. *J. Am. Vet Med. Assoc.* 197, 857-860.
- Dubey, JP, Lindsay, DS, 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 67, 1-59.
- Dubey, JP, 2003. Review of *Neospora caninum* and Neosporosis in animals. *Korean J Parasitol.* 41, 1-16.
- Dubey, JP, Schares, G, 2003. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet. Parasitol.* 141, 1-34.
- Guedes, MNP, Guimarães, AM, Rocha, MBM, Hirsch, C, 2008. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas e fetos provenientes de municípios do Sul de Minas Gerais. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 17,189-194.
- Guimarães Jr, JS, Souza, SLP, Bergamaschi, DP, Gennari, SM, 2004. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. *Vet. Parasitol.* 124, 1-8.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - <http://www.ibge.gov.br/home/2010>.
- Yamaga, M, Flechtner, O, Gottstein, B, 1996. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *J. Parasitol.* 66, 272-279.
- Lindsay, DS, Dubey, JP, 1990. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). *J. Parasitol.* 76, 410-413.

Moore, DP, Campero, CM, Odeón, AC, Posso, MA, Cano, D, Luenda, MR, Basso, W, Venturini, MC, Spath, E, 2002. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. *Vet. Parasitol.* 107, 303-316.

Moore, DP, 2005. Neosporosis in South America. *Vet. Parasitol.* 127, 87-97.

Morales, E, Trigo, FJ, Ibarra, F, Puente, E, Santacruz, M, 2001. Neosporosis in Mexican dairy herds: Lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. *J. Comp. Pathol.* 125,58-63.

Munhoz, KF, 2009. Soro-ocorrência de anticorpos contra *Neospora caninum* em ovinos de propriedades rurais localizadas no norte do Paraná, Brasil. p.12-25. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual de Londrina, Paraná.

Romero, JJ, Perez, E, Dolz, G, Frankena, K, 2002. Factors associated with *Neospora caninum* serostatus in cattle of 20 specialized Costa Rican dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 53, 263-273.

Sanderson, MW, Gay, JM, Baszler, TV, 2000. *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. *Vet. Parasitol.* 90, 15-24.

Santos, DS, Andrade, MP, Varachin, MS, Guimarães, AM, 2011. *Neospora caninum* in bovine fetuses of Minas Gerais, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 20, 281-288.

Sondgen, P, Peters, M, Bärwald, A, Wurm, R, Holling, F, Conraths, FJ, Schares, G, 2001. Bovine neosporosis: immunoblot improves foetal serology. *Vet. Parasitol.* 24, 279-290.

Wouda, W, Moen, AR, Visser, IJR, Van, KF, 1997. Bovine fetal neosporosis: A comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart and liver. *J Vet. Diagn. Invest.* 9,180-18.