

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**“PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI- *Neospora caninum* EM BOVINOS LEITEIROS
DA REGIÃO SUDOESTE DO ESTADO DE MATO GROSSO”**

Pós-Graduanda: Ana Helena Benetti

Orientador: Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo

JABOTICABAL-SP

2006

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**“PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum*
EM BOVINOS LEITEIROS DA REGIÃO SUDOESTE DO
ESTADO DE MATO GROSSO”**

Ana Helena Benetti

Orientador: Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do Título de Doutor em Medicina Veterinária (Área: Reprodução Animal).

JABOTICABAL – SP – BRASIL

Agosto 2006

Benetti, Ana Helena
B465p Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos
leiteiros da região sudoeste do Estado de Mato Grosso / Ana Helena
Benetti. – Jaboticabal, 2006
xiv, 54 f. : il. ; 28 cm

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006

Orientador: Gilson Hélio Toniollo

Banca examinadora: Adjair Antônio do Nascimento, Gilson
Pereira Oliveira, Odilon Vidotto, Vanete Thomaz Soccol

Bibliografia

1. *Neospora caninum*. 2. Soroprevalência. 3. Bovinos.
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 619:618.3:636.2

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ANA HELENA BENETTI - nascida em 31 de março de 1973, em Bebedouro - SP. Médica Veterinária, formada pela Universidade Estadual de Londrina (UEL) em 1996. Fez Residência na área de Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária, na Universidade Estadual Paulista – UNESP / Jaboticabal, de março de 1997 a fevereiro de 1999. Em julho de 1999 iniciou a carreira de docência no ensino superior na Universidade de Cuiabá (UNIC), Cuiabá, Mato Grosso. Concluiu o curso de Mestrado em Reprodução Animal na UNESP / Jaboticabal em 2001. Na Faculdade de Medicina Veterinária da UNIC ministra as disciplinas: Clínica Médica de Pequenos Animais, Semiologia e Patologia Clínica Veterinária, Obstetrícia Veterinária e Fisiopatologia da Reprodução, com ênfase em pequenos animais.

“Tentar e falhar é, pelo menos, aprender. Não chegar a tentar é sofrer a inestimável perda do que poderia ter sido”.

(Geraldo Eustáquio)

DEDICO

- ❖ Ao meu amigo e orientador Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo, pelas incomparáveis sabedoria, fineza, paciência e compreensão dispensadas nesses dez anos de orientação (Graduação, Residência, Mestrado e Doutorado).

“Que ninguém venha a ti sem que volte melhor e mais feliz.

Todo mundo deveria ver a bondade em teu rosto, teus olhos, teu sorriso”

(Madre Teresa de Calcutá)

- ❖ À minha família:

Papai, Mamãe, Juninho, Thaís e Lívia.

Como é grande o meu amor por vocês...

- ❖ A você, Otávio Augusto:

Amar é ser capaz de aceitar o outro tal qual é. Amar é poder dizer:

“Preciso de ti”

(Marcel Beauchemin)

AGRADEÇO

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho, quer seja pelos méritos pessoais ou simplesmente pela amizade:

- Meu chefe e amigo: Prof. Dr. Lázaro Manoel de Camargo;
- Meus amigos e colegas de trabalho: Cláudia G. N. Fernandes, Patrícia Scapucin, Andréia Rizzieri Yamanaka, José Antônio S. Ribas, Marcelo Diniz dos Santos, Cássia Aldrin, Andréa Bouer;
- Meu amigo: Fábio Bernardo Schein;
- Thaís Rabelo dos Santos, Prof. Dr. Alvimar José da Costa e demais colegas do CPPAR;
- Prof^a Dr^a Solange Maria Gennari;
- Tatiana Evelyn Hayama Ueno;
- Prof^a Dr^a Rosângela Zaccarias Machado;
- Prof. Dr. José Roberto Mineo, Deise Ap. de Oliveira Silva, Janaína Lobato;
- Membros da banca examinadora do Exame Geral de Qualificação: Dr. Adjair A. do Nascimento, Dr. César R. Esper, Dr. Francisco G. Leite e Dr. Gilson Oliveira;
- Prof. Dr. João Ademir de Oliveira;
- Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes;
- Membros da banca examinadora da defesa: Dr. Adjair A. do Nascimento, Dr. Gilson Oliveira, Dr. Odilon Vidotto e Dr^a. Vanete Soccol.

MUITO OBRIGADA!

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

(Cora Coralina)

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO.....	xiii
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Histórico	3
2.2. Morfologia do parasito e ciclo biológico.....	3
2.3. Hospedeiros definitivos	4
2.4. Hospedeiros intermediários.....	5
2.5. Vias de transmissão	5
2.6. Aspectos clínicos da neosporose	7
2.7. Diagnóstico da neosporose	8
2.8. Epidemiologia da neosporose	10
2.8.1. Bovinos.....	10
2.8.2. Caninos	13
2.8.3. Humanos	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Colheita das amostras sanguíneas	17
3.1.1. Bovinos.....	17
3.1.2. Caninos	17
3.1.3. Humanos	17
3.1.4. Fêmeas bovinas e respectivos fetos	17
3.2. Exames sorológicos	18
3.2.1. Local.....	18

3.2.2. Técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI) para detecção de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i>	18
3.2.2.1. Bovinos.....	18
3.2.2.2. Caninos	19
3.2.2.3. Humanos	19
3.2.2.4. Fêmeas bovinas e respectivos fetos	20
3.3. Propriedades	20
3.4. Análise estatística	22
4. RESULTADOS	24
4.1. Bovinos.....	24
4.2. Caninos	25
4.3. Humanos	26
4.4. Fêmeas bovinas e respectivos fetos	27
4.5. Análise estatística	28
5. DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÕES	40
7. REFERÊNCIAS.....	41

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Ig = imunoglobulina

PCR = Reação de Polimerase em Cadeia

DNA = ácido desoxiribonucléico

RNA = ácido ribonucléico

ELISA = ensaio imunoenzimático de imunoadsorção

HIV = vírus da imunodeficiência adquirida

AIDS = Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

DIC = Delineamento Inteiramente Casualizado

IFI = Imunofluorescência Indireta

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Valores de ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos de diferentes estados brasileiros, respectivas técnicas e autores 11
- Tabela 2** - Frequência e ocorrência de infecção por *Neospora caninum* em carnívoros em algumas regiões brasileiras 15
- Tabela 3** - Ocorrência e frequência de infecção por *Neospora caninum* em humanos sem histórico de problemas reprodutivos 16
- Tabela 4** - Características gerais das propriedades analisadas na região sudoeste do Estado de Mato Grosso, segundo ficha cadastral do rebanho leiteiro.... 21
- Tabela 5** - Propriedades da região sudoeste do Estado de Mato Grosso, total de bovinos leiteiros por propriedade, total de colheitas por propriedade e porcentagem de colheita por propriedade 23
- Tabela 6** - Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros da região sudoeste do Estado de Mato Grosso, segundo as propriedades analisadas..... 24
- Tabela 7** - Correlação dos caninos e bovinos soropositivos com propriedades analisadas na região sudoeste do Estado de Mato Grosso 25
- Tabela 8** - Porcentagens de trabalhadores rurais de propriedades da região sudoeste do Estado de Mato Grosso sororreagentes ou não à presença de anticorpos anti-*Neospora caninum*, de acordo com o sexo. 26

- Tabela 9** - Relação entre trabalhadores rurais, bovinos e caninos soropositivos a anticorpos anti-*Neospora caninum* e respectivas propriedades da região sudoeste do Estado de Mato Grosso27
- Tabela 10** -Classificação dos fetos, provenientes da região sudoeste do Estado de Mato Grosso, e resultados de sorologia de acordo com a idade.....28
- Tabela 11** -Número e porcentagem de vacas gestantes abatidas e respectivos fetos, provenientes da região sudoeste do Estado de Mato Grosso, positivos a anticorpos anti-*Neospora caninum* em diferentes diluições, pela IFI.....28
- Tabela 12** -Propriedades da região sudoeste do Estado de Mato Grosso, prevalência para anticorpos anti-*Neospora caninum*, porcentagem de cães soropositivos e histórico de abortamento nas propriedades29
- Tabela 13** -Distribuição da freqüência de bovinos leiteiros soropositivos a anticorpos anti-*Neospora caninum* procedentes da região sudoeste do Estado de Mato Grosso, segundo faixa etária30

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros da região sudoeste do Estado de Mato Grosso pertencentes a 24 propriedades rurais amostradas31
- Figura 2** - Porcentagem de bovinos leiteiros da região sudoeste do Estado de Mato Grosso positivos a anticorpos anti-*Neospora caninum* em diferentes titulações, pela IFI32

**“PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI- *Neospora caninum* EM BOVINOS LEITEIROS
DA REGIÃO SUDOESTE DO ESTADO DE MATO GROSSO”**

RESUMO - Considerando a importância da neosporose como interferente na produtividade animal, avaliou-se a frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros, complementando os estudos com amostras sorológicas colhidas de caninos e humanos de convívio rural, inter-relacionando os resultados. Com o objetivo de investigar a possível transmissão vertical em bovinos, colheu-se também sangue de fêmeas e de seus respectivos fetos, abatidos em frigorífico, provenientes da região sudoeste do Estado de Mato Grosso. O total de 1076 soros correspondente a: 932 de fêmeas bovinas leiteiras, 37 de cães, 67 de humanos, provenientes de 24 propriedades da região sudoeste do Estado de Mato Grosso, 20 soros de fêmeas bovinas e 20 de seus respectivos fetos. Os soros examinados por meio da Imunofluorescência Indireta (IFI) revelaram a presença de anticorpos contra *Neospora caninum* em 499 bovinos (53,54%), 25 caninos (67,57%) e sete humanos (10,45%). Dos exames sorológicos de animais de abatedouro, duas fêmeas e seus respectivos fetos apresentaram positividade, com infecção caracterizada no terço médio da gestação. Ainda do mesmo grupo, três fêmeas mostraram-se positivas, em diferentes titulações, sem transmissão de anticorpos para os fetos, sendo duas analisadas em período gestacional correspondente ao terço final, e uma inicial. Os resultados obtidos permitem inferir que a infecção pelo protozoário encontra-se amplamente disseminada na região estudada.

PALAVRAS-CHAVE: *Neospora caninum*, soroprevalência, bovinos, caninos, humanos.

**OCCURRENCE OF ANTIBODIES TO *NEOSPORA CANINUM* IN DAIRY CATTLE
FROM FARMS IN THE SOUTHWEST REGION OF THE MATO GROSSO STATE,
BRAZIL**

SUMMARY - To determine the prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies, 932 samples of blood sera from female dairy cattle belonging to 24 farms in the southwest of the state of Mato Grosso were analyzed by means of the indirect immunofluorescent-antibody test (IFAT \geq 200). Serum samples from 37 dogs and 67 humans living in the same farms were tested for anti- *N. caninum* antibodies. From these, 499 (53,54%) of the cattle sera, 25 (67,57%) of the dog sera and seven from the human sera (10,45%) were positive for the infection. In order to determine the occurrence of vertical transmission of *N. caninum* in bovine, maternal and fetal sera obtained from 20 Killed pregnant heifers from the same region were analyzed. Antibodies were found in five heifers (25%) from which two fetuses (10%) showed positive results. Fetal antibodies were detected on mid gestation. These data suggest that neosporosis is present among dairy cattle in the studied geographic region.

KEYWORDS: *Neospora caninum*, seroprevalence, cattle, dog, human.

1. INTRODUÇÃO

O protozoário *Neospora caninum* é um importante parasito intracelular que foi primeiramente descrito em cães com alterações neurológicas, sendo considerado atualmente como o responsável por uma das mais importantes enfermidades causadoras de abortamentos em bovinos leiteiros (GUIMARÃES et al., 2004).

O cão e o coioote são as únicas espécies reconhecidas que podem se comportar como hospedeiro definitivo, no qual ocorre o desenvolvimento sexual do protozoário resultando na eliminação de oocistos nas fezes (GONDIM et al., 2004). Assim, estas espécies assumem um importante papel na cadeia epidemiológica da infecção, sendo consideradas disseminadoras do agente no meio ambiente, podendo contaminar os alimentos e a água. No entanto, o cão também pode ser hospedeiro intermediário com formação de cistos em seus tecidos, à semelhança de eqüinos, bovinos, ovinos, caprinos e cervídeos (DUBEY, 1999).

As pesquisas realizadas nos últimos anos demonstram que a presença e o número de cães nas propriedades seria um importante fator de risco para a infecção e a ocorrência de abortamentos nos bovinos, indicando uma associação entre a infecção em ambas as espécies (BARTELS et al., 1999).

O forte impacto econômico causado pela neosporose proporciona prejuízos devidos aos abortamentos e custos indiretos, estimados em 35 milhões de dólares por ano na Califórnia; na Austrália, o valor encontra-se em torno de 85 milhões para a indústria leiteira e 25 milhões de dólares para a produção de carne, por ano (ANDERSON et al., 2000).

No Brasil, *N. caninum* foi diagnosticado a partir de 1999, em fetos abortados, e através de levantamentos sorológicos de bovinos e cães de diferentes estados. No entanto, são necessárias avaliações científicas aprofundadas sobre a real importância da neosporose na bovinocultura e de seu impacto econômico nas diferentes regiões do Brasil (SOUZA et al., 2002).

Em face da importância da neosporose em vários países e da existência de poucas informações sobre a real situação da prevalência dessa doença no Estado de Mato Grosso, no presente trabalho objetivou-se verificar a frequência de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos leiteiros, caninos e trabalhadores rurais que convivem no mesmo ambiente, para melhor conhecer o ciclo de vida de *N. caninum*, além de caracterizar a transmissão vertical do parasita através da detecção de anticorpos em vacas gestantes abatidas e em seus respectivos fetos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Histórico

A neosporose é uma infecção causada pelo parasito *Neospora caninum*, protozoário do filo Apicomplexa descrito pela primeira vez por Bjerkås et al. (1984). Até 1988, foi erroneamente diagnosticada como toxoplasmose devido às semelhanças morfológicas entre os parasitos e à sintomatologia clínica. A toxoplasmose é uma zoonose de caráter cosmopolita, causada pelo *Toxoplasma gondii* (NICOLLE e MANCEAUX, 1908), coccídio intestinal de felídeos, que tem como principal hospedeiro definitivo o gato doméstico. Em 1988 foi proposta a criação do novo gênero *Neospora*, após esse parasito ter sido isolado e caracterizado morfológicamente por Dubey et al. (1988), sendo denominado de *Neospora caninum*.

Duas espécies do gênero *Neospora* já foram descritas, o *N. caninum*, que infecta uma variedade de mamíferos, e *N. hughesi*, espécie isolada em eqüinos. Em estudo comparativo entre amostras de *Neospora* spp. isoladas de bovinos e caninos, verificou-se que não havia diferença significativa na seqüência de nucleotídeos. Entretanto, a comparação dessas cepas com a de eqüino revelou uma diferença de sete nucleotídeos, propondo uma nova espécie de *Neospora* em eqüinos, identificada como *N. hughesi* (MARSH et al., 1998).

2.2. Morfologia do parasito e ciclo biológico

Pela sua similaridade com outros coccídeos, como *T. gondii* e *Hammondia heydorni*, a caracterização molecular do *N. caninum* vem sendo realizada com o seqüenciamento dos espaços internos transcritos (ITS1) do DNA, permitindo discriminar a variabilidade inter e intra-espécie. A seqüência de ITS1 das cepas de *N. caninum* NC-2, NC-Liverpool, NCSweB1, Nc-beef e NC-Illinois apresentaram 100% de similaridade, enquanto a cepa NC-Bahia, isolada do cérebro de um cão do município de Salvador, Bahia (GONDIM et al., 2001), diferiu em vários pares de bases das cepas da América

do Norte e Europa, demonstrando que a variação intracepa para a região ITS1 parece ser comum em *N. caninum*, ao contrário do que ocorre com *T. gondii*, no qual esta seqüência é altamente conservada (GONDIM et al., 2004).

O ciclo de vida do *N. caninum* apresenta três estágios evolutivos: bradizoítos, taquizoítos e esporozoítos. Sob certas circunstâncias, como prenhez e imunodeficiência, os bradizoítos podem se converter em taquizoítos, que se proliferam assexuadamente promovendo a infecção fetal ou causando lesões nesses animais imunossuprimidos. Os taquizoítos e bradizoítos são os estágios intracelulares encontrados nos hospedeiros intermediários. Estes ingerem os oocistos esporulados, eliminados nas fezes pelo hospedeiro definitivo. Ocorre a liberação dos esporozoítos na luz intestinal, os quais penetram nas células da parede, passando a ser denominados taquizoítos; outros se transformam em bradizoítos, dentro de cistos de parede espessa, permanecendo latentes, em lenta divisão. Os cistos são ovais ou circulares, podendo ser encontrados no Sistema Nervoso Central (SNC), na retina e em outros tecidos (DUBEY e LINDSAY, 1996; DUBEY, 2003).

2.3. Hospedeiros definitivos

McAllister et al. (1998), em trabalho de grande importância epidemiológica, conseguiram identificar o cão doméstico (*Canis familiaris*) como o hospedeiro definitivo do *N. caninum* e, recentemente, observou-se que os coiotes (*Canis latrans*) também eliminam oocistos pelas fezes (GONDIM et al., 2004), sendo esta espécie o primeiro canídeo selvagem confirmado como hospedeiro definitivo desse agente (GENNARI, 2004).

Foi confirmada também a participação do cervídeo (*Odocoileus virginianus*) no ciclo de vida do *N. caninum* (GONDIM, 2005). Animais silvestres estão provavelmente contribuindo para a transmissão do parasito para animais de produção e de companhia. Assim sendo, as medidas de controle e prevenção da neosporose, antes centradas em condutas envolvendo animais domésticos, devem também contemplar a participação de animais silvestres (GONDIM, 2005; YAI et al., 2005).

2.4. Hospedeiros intermediários

Infecções naturais pelo *N. caninum* foram diagnosticadas também em caninos, ovinos, caprinos, bovinos, bubalinos, eqüinos e algumas espécies de animais silvestres, como cervídeos (UGGLA et al., 1989; BARR et al., 1993; HUONG et al., 1998; DUBEY et al., 1999). Experimentalmente foram induzidas em camundongos, ratos, cobaias, coelhos, caninos, felinos, bovinos, ovinos, caprinos, suínos, coiotes e raposas (DUBEY e LINDSAY, 1996). Anticorpos já foram descritos em gatos, camelos, mão-pelada, raposas e vários outros canídeos (DUBEY, 2003).

No Brasil, além da pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* em canídeos e cervídeos, já se pesquisou a ocorrência em gambás (*Didelphis marsupialis*), da cidade de São Paulo, observando-se que, dos 396 animais examinados, 21,2% (84) apresentaram anticorpos, sendo esta a primeira descrição na espécie (YAI et al., 2003).

2.5. Vias de transmissão

Locatelli-Dittrich et al. (2004) confirmaram a transmissão congênita de *N. caninum* através da detecção de anticorpos pré-colostrais em bezerros e do isolamento da cepa BNC/PR3 em um feto de rebanho leiteiro do Estado do Paraná, Brasil.

DeMarez et al. (1999) demonstraram a infectividade em bezerros através da inoculação de oocistos do parasito eliminados nas fezes de cães. Porém, a transmissão transplacentária é considerada a principal via de infecção em bovinos (PARÉ et al., 1996; ANDERSON et al., 1997).

Schares et al. (1998) destacam que *N. caninum* pode persistir durante muito tempo em um rebanho bovino sem a presença do hospedeiro definitivo, sendo que a eficiência da infecção transplacentária pode chegar a 95%.

Estudos demonstram que tanto vacas quanto novilhas infectadas pelo *N. caninum* podem transmiti-lo para seus descendentes, em diferentes gestações, consecutivas ou não (PARÉ et al., 1996; ANDERSON et al., 1997). Santos (2000), no

Brasil, identificou o parasito em fetos de três a sete meses de idade, por meio da técnica de imunistoquímica.

Aspectos interessantes sobre a transmissão do *N. caninum* foram verificados por Okuda et al. (1997), quando observaram em um rebanho, por meio da IFI, que 30% das vacas com histórico de abortamentos apresentavam anticorpos contra *N. caninum*, e que outras 27,7% foram apenas reagentes e não abortaram. Em um estudo prospectivo de nove anos em um rebanho de aptidão leiteira no Estado do Paraná, foram encontradas 37,3% das vacas soropositivas ao *N. caninum*, sendo que destas, 67,3% haviam abortado no período, representando uma taxa de 20% do total de fêmeas gestantes (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2001).

Anderson et al. (1997) observaram a transmissão vertical de *N. caninum* em novilhas que se infectaram por via transplacentária. Estas se apresentavam saudáveis quando jovens, porém, quando adultas, transmitiram o parasito para o feto, caracterizando com isso, a importância da manutenção do *N. caninum* no rebanho bovino. Observações idênticas foram realizadas por Paré et al. (1996), através de um estudo sorológico, onde constataram que mais de 80% dos bezerros nascidos de vacas sorologicamente reagentes para *N. caninum*, também apresentavam anticorpos contra o mesmo agente. Dannatt et al. (1995) comprovaram que de 10 vacas que abortaram, nove apresentaram títulos sorológicos significantes ($>1:640$) de anticorpos contra *N. caninum*, através da IFI, após duas semanas destes abortamentos. Das fêmeas do rebanho, 60% apresentavam anticorpos séricos contra *N. caninum*.

A infecção por *N. caninum* em fetos não pode ser simplesmente descartada devido à ausência de anticorpos em soro ou fluidos fetais. A presença de anticorpos é determinada pela condição imunológica do feto que, por sua vez, depende da idade do mesmo, da dose infectante e da resposta imune da mãe (DUBEY et al., 1997; WOUDA et al., 1997).

Bastos et al. (2005), objetivando determinar a transmissão vertical de *N. caninum* em vacas e suas crias, antes da mamada do colostro, por meio de diferentes titulações pela IFI, detectaram 62,50% de positividade entre as crias de vacas positivas. Evidencia-se desta forma, que as mães soropositivas tiveram maior porcentagem de

bezerros positivos que negativos. Os resultados confirmaram também a possibilidade de o título de anticorpos da mãe ter influência na transmissão para o filho, sendo que títulos elevados provavelmente determinam maior risco de transmissão, e interferem na probabilidade de ocorrência de abortamento, um dos maiores problemas causados pela neosporose.

2.6. Aspectos clínicos da neosporose

O abortamento é a principal evidência clínica da neosporose em vacas infectadas e pode ocorrer entre o terceiro e nono mês de gestação (ANDERSON et al., 1991; BARR et al., 1991). Uma fêmea que abortou devido ao *N. caninum* pode gerar, numa próxima gestação, um bezerro infectado ou, em poucos casos, um novo abortamento (BARR et al., 1993; ANDERSON et al., 1995). Os fetos podem morrer no interior do útero, serem reabsorvidos, mumificados, autolisados, nascerem vivos (doentes) ou mortos, abortados, ou nascerem clinicamente normais, porém, cronicamente infectados (DUBEY e LINDSAY, 1996). Paré et al. (1997) observaram que a infecção adquirida durante a prenhez não necessariamente pode resultar em uma infecção fetal e, conseqüentemente, provocar abortamento. Possivelmente, isso pode estar relacionado a uma resposta imune da fêmea.

Em bezerros com infecções clínicas aparentes, os danos causados pelo *N. caninum* ao Sistema Nervoso Central (SNC) resultam em sinais variados que, muitas vezes, se expressam como disfunções de membros, desde leves defeitos de propriocepção até a completa paralisia. Entretanto, alguns bezerros congenitamente infectados podem não desenvolver sintomatologia no período pós-natal. As manifestações clínicas podem ocorrer por vários fatores, como idade do feto, fase de desenvolvimento do sistema imunitário e distribuição das lesões pelo SNC (ANDERSON et al., 1997).

O aborto associado à neosporose bovina segue dois modelos: o endêmico e o epidêmico (ANDERSON et al., 2000). O endêmico ocorre na maioria dos rebanhos com vacas infectadas via congênita, e é caracterizado por uma elevada taxa de abortamento

(5% - 60% / ano), que persiste durante anos, sendo duas a três vezes maior nas vacas soropositivas do que nas soronegativas. Os abortos epidêmicos são menos comuns e caracterizam-se por várias ocorrências durante um período relativamente curto (um a três meses), e geralmente 80% ou mais dos casos ocorrem em vacas soropositivas (WREN, 1999; ANDERSON et al., 2000). Em alguns rebanhos parece ocorrer a mistura dos dois modelos (ANDERSON et al., 2000).

A transmissão congênita em cães foi confirmada em 1990 (DUBEY et al., 1990). A sintomatologia clínica da neosporose nesta espécie geralmente está associada a problemas neurológicos, acometendo principalmente filhotes e quase sempre todos os animais de uma mesma ninhada. Geralmente, os sinais clínicos são semelhantes aos da toxoplasmose, sendo mais característico na neosporose, a paresia de membros pélvicos em filhotes com menos de 12 meses de idade, podendo ocorrer também, paralisia de mandíbula, dificuldade de deglutição, flacidez e atrofia muscular (DUBEY et al., 1992; DUBEY e LINDSAY, 1993). São menos freqüentes os casos de miocardite, pneumonia e dermatites (ODIN e DUBEY, 1993; GREIG et al., 1995).

2.7. Diagnóstico da neosporose

Dentre os métodos desenvolvidos para o diagnóstico da neosporose, a detecção de anticorpos específicos no soro sanguíneo pela IFI, utilizando como antígeno taquizoíto de *N. caninum*, é largamente utilizada para os estudos epidemiológicos (TREES et al., 1994; PARÉ et al., 1996; SOUZA, 2001). Apesar do *N. caninum* compartilhar diversos antígenos com o *T. gondii*, a IFI é considerada uma técnica específica, sendo pouca ou nula a reatividade cruzada com outros coccídios (YAMANE et al., 1993).

O ponto discriminativo ("cut-off") indicativo de infecção em bovinos ainda não foi totalmente padronizado. Em uma revisão sobre o *N. caninum*, foi considerado como específico o ponto discriminativo de 200 (DUBEY e LINDSAY, 1996). É importante mencionar que o diagnóstico sorológico da neosporose bovina depende também da anamnese, além de investigar outras importantes enfermidades infecciosas abortivas

como brucelose, leptospirose, rinotraqueíte infecciosa dos bovinos (IBR) e diarreia viral bovina (BVD), que freqüentemente estão presentes nos rebanhos (ANDERSON et al., 2000). O limite utilizado para determinar a infecção a partir de exames de soros e fluidos fetais é inferior ao dos bovinos adultos, visto que os fetos possuem menor exposição aos antígenos, resultando em menor quantidade de anticorpos (OSAWA et al., 1998).

O diagnóstico pode ser realizado também pela análise histopatológica de diversos órgãos e confirmado pela imunoistoquímica. A presença de lesões caracterizadas por encefalite multifocal necrosante associada a infiltrados não supurativos em vários órgãos são forte indicativo de neosporose em fetos bovinos (ANDERSON et al., 1991; PESCADOR, 2005). Porém, alguns estudos têm mostrado que grande parte do cérebro de fetos bovinos enviados para análise apresenta consistência líquida, dificultando a obtenção de fragmentos para o exame histopatológico. Avaliam-se, então, lesões sugestivas em outros órgãos, como músculo esquelético, pulmões, coração, fígado e rim, na ausência do cérebro em boas condições (PESCADOR, 2005).

A imunoistoquímica, em estudo feito por Pescador et al. (2005) com 237 fetos bovinos abortados, enviados para a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), entre junho de 1999 e maio de 2004, revelou a presença de taquizoítos e raros cistos de *N. caninum* no cérebro de 55,2% (37/67), fígado de 9% (6/66), rim de 9% (9/66), músculo esquelético de 8,5% (3/70), pulmão de 4,4% (3/68) e coração de 4,3% (3/69) dos fetos que apresentaram lesões histológicas sugestivas de infecção por protozoário.

As pesquisas nas áreas de epidemiologia, imunologia, diagnóstico, aplicação e desenvolvimento de métodos sorológicos, caracterização molecular e diversidade genética de *N. caninum* estão sendo desenvolvidas para compreender a biologia do parasita, as vias de transmissão, a resposta imune e a eficácia das drogas, e para aperfeiçoar os métodos de diagnóstico da doença (McALLISTER e LATHAM, 2002).

2.8. Epidemiologia da neosporose

2.8.1. Bovinos

As primeiras descrições da presença de anticorpos anti-*N. caninum* no Brasil foram feitas em bovinos e mostradas em resumos de congressos, com informações reduzidas, mas possuem valor histórico por demonstrarem pela primeira vez o agente em nosso meio. Brautigam et al. (1996) encontraram anticorpos em bovinos de leite do Estado de São Paulo e de corte do Mato Grosso do Sul. Desde então, vários pesquisadores têm detectado anticorpos em soros de bovinos de pecuária leiteira (MELO e LEITE, 1999) e de corte (STOBBE e CÔRTEZ, 1999), búfalos (GONDIM et al., 1999), cães (BELO et al., 1999), e em outras espécies.

Souza (2001), no Estado de São Paulo, utilizando a IFI, detectou 230 (56,0%) búfalos com anticorpos contra *N. caninum*. Estudando a presença de anticorpos contra *T. gondii* (IFI), diagnosticou 205 (49,0%) animais sororeagentes; 33,9% dos búfalos examinados estavam positivos para ambos coccídios. Anticorpos anti-*N. caninum* foram também pesquisados em 196 búfalos de três fazendas do Pará, sendo encontrados em 139 (70,9%) por meio da IFI (RODRIGUES et al., 2005).

N. caninum foi considerado como causa de abortamento em bovinos de pecuária de leite nos Estados Unidos, Nova Zelândia, Canadá, Grã-Bretanha, Japão, África do Sul, Países Baixos, Suécia, Israel, Irlanda, Dinamarca, México e Austrália (BARR et al., 1990; ANDERSON et al., 1991; DUBEY e LINDSAY, 1993; OTTER et al., 1995). Segundo Dubey e Lindsay (1996), a neosporose provavelmente tem distribuição mundial.

Gondim e Sartor (1997) e Pituco et al. (1998) descreveram a presença de anticorpos em vacas leiteiras do Estado de São Paulo, em propriedades com problemas reprodutivos, em especial abortamentos. Gondim et al. (1999) descreveram o primeiro caso de abortamento bovino causado pelo *N. caninum* por meio da técnica de imunoistoquímica. Observaram cisto do parasito em cérebro de um feto de oito meses de idade gestacional, sendo que a sorologia demonstrou alto título de anticorpos (6400) contra *N. caninum*.

Na Tabela 1 são apresentados os resultados de pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* em diferentes estudos realizados com bovinos no Brasil, em diferentes regiões, indicando que o agente está disseminado pelo país, ocorrendo em bovinos de corte e leite (GENNARI, 2004).

Tabela 1 - Valores de ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos de diferentes estados brasileiros, respectivas técnicas e autores.

AUTOR	ESTADO	AMOSTRAS EXAMINADAS	OCORRÊNCIA (%)	TÉCNICA
Brautigam et al. (1996)	SP	40	15,0	ELISA
	MS	50	8,0	ELISA
Pituco et al. (1998)	SP	102	34,3	ELISA
Gondim et al. (1999a)	BA	447	14,0	RIFI
Andreotti et al. (1999)	MS	91	7,7	ELISA
Belo et al. (1999b)	SP	28	67,8	RIFI
Sartor et al. (1999)	SP	521	16,3	RIFI
			30,1	ELISA
Stobbe et al. (1999)	SP	84	36,7	RIFI
Melo e Leite (1999)	MG	39	7,7	ELISA
Ogawa et al. (1999)	PR	385	11,7	RIFI
Hasegawa (2000)	SP	777	15,5	RIFI
Melo (2001)	MG	584	18,7	ELISA
Locatelli-Dittrich et al. (2001 ^a)	PR	147	42,0	ELISA
Locatelli-Dittrich et al. (2001b)	PR	172	34,8	ELISA
Corbellini et al. (2001b)	SC	29	65,5	ELISA
Costa et al. (2001)	MG	88	6,8	RIFI
	SP	411	23,1	RIFI
Jesus et al. (2002b)	BA	391	10,3	RIFI
Corbellini et al. (2002)	RS	223	11,2	RIFI
Silva et al. (2002)	PE	469	34,7	RIFI
Munhoz et al. (2002a)	RJ	140	33,6	ELISA
Munhoz et al. (2002b)	RJ	126	23,8	ELISA
Andreotti et al. (2002)	GO	441	17,4	ELISA
	MS	151	16,6	ELISA
	SP	12	41,6	ELISA
Ragozo et al. (2003)	MS	110	28,2	RIFI
	MG	162	29,0	RIFI
	PR	90	22,2	RIFI
	RJ	150	14,7	RIFI
	RS	140	20,0	RIFI
	SP	150	23,6	RIFI
Guimarães Júnior et al. (2004)	PR	623	21,55	RIFI
Aguiar (2004)	RO	2109	8,7	RIFI

ELISA – Ensaio imunoenzimático; RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta; C – raça Nelore; H – raça Holandesa.

A importância econômica da neosporose bovina é atribuída principalmente aos custos associados ao abortamento, ao valor dos fetos, à inseminação artificial ou à cobertura, à diminuição da produção de leite, ao aumento do descarte e à reposição dos animais. As perdas indiretas estão relacionadas com o estabelecimento do diagnóstico, falhas na estação de reprodução, aumento do período de lactação, possível perda na produção de leite e de perdas por descarte de vacas positivas (ANDREOTTI et al., 1999), embora essas perdas não estejam devidamente quantificadas no mundo. Na Califórnia, foi estimado que esse protozoário pudesse causar prejuízos de \$35 milhões por ano aos produtores de leite; na Austrália, perdas mais elevadas, sendo \$85 milhões na bovinocultura de leite e \$25 milhões na produção de carne (THURMOND e HIETALA, 1996; ANDERSON et al., 2000).

Schein et al. (2004) em pesquisa para detecção de bovinos leiteiros positivos a anticorpos contra *Brucella abortus* em 68 propriedades leiteiras do Município de Araputanga, Mato Grosso, constataram que nos últimos 12 meses havia ocorrido abortamentos em 47,0% das propriedades. Inconseqüentemente, em 81,3% delas não foi dado o destino correto para os fetos e anexos fetais abortados, podendo este fato contribuir para a disseminação de outros agentes patogênicos.

As fêmeas mais susceptíveis ao abortamento são as com mais de oito anos de idade e a taxa de aborto é maior em vacas do que em novilhas (DUBEY e LINDSAY, 1996). Entretanto, Thornton et al. (1994) relataram que na neosporose a susceptibilidade da idade ao abortamento é imprecisa, apesar de terem verificado na Nova Zelândia que os abortamentos produzidos por *N. caninum* eram comuns em fêmeas com mais de quatro anos de idade.

Na Califórnia, a neosporose foi diagnosticada em 42% dos casos de abortamentos em bovinos (ANDERSON et al., 1995), sendo considerada a principal causa desta patologia (BARR et al., 1990; ANDERSON et al., 1991). Estudos na Inglaterra e no País de Gales revelaram uma incidência de 4,2% de abortamentos causados pelo *N. caninum* em seus rebanhos (OTTER et al., 1995). Em rebanhos isolados foram relatadas taxas de aborto de até 16% na Grã-Bretanha (DANNATT et al., 1995) e de 30% a 40% na Nova Zelândia (THORNTON et al., 1991; THORNTON,

1992). No México, Morales et al. (1998) verificaram que de 22 amostras de soro sanguíneo de vacas que abortaram 21 (96%) foram reagentes contra *N. caninum* e, dos 22 fetos examinados pela técnica de imunistoquímica, 100% apresentaram lesões compatíveis com a doença.

Diversos autores desenvolveram estudos correlacionando a sorologia de bovinos de pecuária leiteira com a epidemiologia da infecção pelo *N. caninum* (THORNTON et al., 1991; PARÉ et al., 1998). Mainar-Jaime et al. (1999) relataram a combinação entre a presença de cães e a soropositividade da neosporose no rebanho leiteiro, indicando que a infecção por oocistos pode contribuir para o estabelecimento do *N. caninum* em bovinos.

Corbellini et al. (2002) detectaram em torno de 10% de prevalência de bovinos positivos a anticorpos anti-*N. caninum* em propriedades do Rio Grande do Sul, porém não houve correlação desses resultados com a presença fixa de cães nas propriedades estudadas, e sim com o fato de cães errantes ou silvestres serem freqüentadores das mesmas.

2.8.2. Caninos

Sawada et al. (1998) e Wouda et al. (1999) observaram que cães criados em propriedades leiteiras apresentaram maior soroprevalência que cães mantidos em áreas urbanas, fato também observado por Sánchez et al. (2003) em pesquisa semelhante realizada na região de Tizayuca, Hidalgo, México.

Trees et al. (1993), por meio da IFI e utilização do ponto de corte 1:200, observaram uma freqüência de 13% de cães sororreagentes ao *N. caninum*. Não relataram correlação entre os níveis de anticorpos e raça, sexo, idade, tipo de alimentação ou presença de outros cães no mesmo ambiente de convívio.

Cañón-Franco et al. (2003) e Aguiar (2004), em dois estudos realizados com cães em um mesmo município do Estado de Rondônia, encontraram valores de prevalência, por meio da IFI, de 8,3% e 12,6%, respectivamente, para a região urbana e

rural do município. Estes dados indicam que no meio rural as fontes de infecção para os cães com ingestão de placenta e fetos contaminados, bem como a possibilidade de caça e de ingestão de cistos teciduais em possíveis hospedeiros intermediários, parecem ser importantes na epidemiologia e manutenção do *N. caninum* nesse ambiente.

Pesquisas realizadas em cães, entre 1990 e 1996, mostraram que o *N. caninum* pode causar infecção em recém-nascidos como também em animais com idade em torno de seis anos, e que o sexo não é considerado um fator limitante da infecção. Estudos sorológicos realizados em 894 cães de clínicas veterinárias em Kansas (E.U.A.) por Lindsay et al. (1990), em Liverpool (Reino Unido) por Trees et al. (1993), em North Mymms (Reino Unido) por Lathe (1994) e em Uppsala (Suécia) por Björkman et al. (1994), verificaram que a ocorrência de anticorpos contra *N. caninum* variou entre 0,25% e 16,6%.

No Brasil, foi observada tendência crescente na associação entre níveis de prevalência de infecção em relação ao avançar da idade, sugerindo que a maioria dos cães adquire a infecção pela via horizontal (SOUZA et al., 2002). Bresciani et al. (2005), em pesquisa de anticorpos em cães urbanos e sadios do município de Araçatuba, São Paulo, verificaram que as variáveis sexo, idade, raça, tipo de alimentação, tipo de ambiente e acesso à rua não apresentaram associação com a ocorrência da infecção pelo *N. caninum*, embora tenham encontrado soropositividade em 15,7% dos cães examinados.

As taxas de prevalência da neosporose em caninos variaram de 6,7% a 73,37%, entre os estados de Bahia (11,2 a 13,3%), Minas Gerais (6,7%), São Paulo (21,92 a 35,57%) e Sergipe (63,37% e 73,37%) (MELO et al., 2003). Observando-se a Tabela 2 verifica-se a relação de estudos sobre frequência e ocorrência de infecção por *N. caninum* em carnívoros em algumas regiões brasileiras.

Tabela 2 -Frequência e ocorrência de infecção por *Neospora caninum* em carnívoros em algumas regiões brasileiras.

LOCAL	ESPÉCIE	FREQÜÊNCIA	REFERÊNCIA
Bahia	Cão	18,18%	Santos et al. (1999)
Minas Gerais	Cão	6,7%	Mineo et al. (2001)
São Paulo	Cão (domiciliado)	10%	Gennari et al. (2002)
São Paulo	Cão (errante)	25%	Gennari et al. (2002)
Minas, Rio de Janeiro, Paraná, Distrito Federal	Lobo Guará (<i>Canis Brachiurus</i>)	0%	Melo et al. (2002)
Minas Gerais	Cachorro do Mato (<i>Cerdocyon thous</i>)	0%	Melo et al. (2002)
Vários	<i>Cerdocyon thous</i>	7,1%	Melo et al. (2002)
	<i>Lycalopex gymnoceercus</i>	100%	Cañón-Franco et al. (2002)
	<i>Dusicyon vetulus</i>	0%	(2002)
Sergipe	Cão (errante)	68,37%	Melo et al. (2003)
Monte Negro, Rondônia	Cão	8,3%	Cañón-Franco et al. (2003)

Fonte: MELO et al., 2003.

2.8.3. Humanos

O parasito ainda não foi isolado em humanos, no entanto, em infecção experimental em primatas, Rhesus (*Macaca mulatta*), *N. caninum* causou nos fetos lesões semelhantes à toxoplasmose congênita em humanos (BARR et al., 1994). Na Califórnia, Tranas et al. (1999) detectaram título de 1:100 em 6,7% dos soros humanos analisados pela IFI, o que pode indicar a possibilidade da neosporose.

Lobato et al. (2006) detectaram, no Brasil, anticorpos da classe IgG contra *N. caninum* em 38% de humanos positivos para HIV e em 18% dos com desordens neurológicas, sendo este estudo importante por confirmar a possibilidade da neosporose constituir parasitose oportunista nestes tipos de enfermos. Consideraram também que as soropositividades para *N. caninum* e para *T. gondii* estavam significativamente associadas nesses dois grupos de pacientes examinados. Observaram, no mesmo estudo, 6% de indivíduos saudáveis positivos para anticorpos anti-*Neospora caninum*, sem soropositividade concomitante para *T. gondii*.

Em Salvador, Bahia, foram verificados 5% e 3,8% de soropositividade para anticorpos IgG anti-*N. caninum* em mulheres gestantes com e sem histórico de abortamento espontâneo recorrente, respectivamente, e 15% de sororreagentes entre

os indivíduos com AIDS. São necessárias, no entanto, maiores investigações sobre o potencial zoonótico deste protozoário (MAGALHÃES et al., 2002).

Na Tabela 3 são mostrados dados de ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum*, em indivíduos sem histórico de problemas reprodutivos, obtidos de alguns dos poucos trabalhos disponíveis em literatura.

Tabela 3 - Ocorrência e frequência de infecção por *Neospora caninum* em humanos sem histórico de problemas reprodutivos.

LOCAL	FREQÜÊNCIA	TÉCNICA SOROLÓGICA	REFERÊNCIA
Califórnia (E.U.A.)	6,7%	IFI	Tranas et al., 1999
Bahia (Brasil)	3,8%	IFI	Magalhães et al., 2002
Minas Gerais (Brasil)	6,0%	IFI ELISA WESTERN BLOT	Lobato et al., 2006

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Colheita das amostras de sangue

3.1.1. Bovinos

Foram colhidas 932 amostras de sangue de vacas leiteiras da raça holandesa e mestiças (cruzamentos), pertencentes a 24 propriedades de municípios da região sudoeste do Estado de Mato Grosso. As amostras foram colhidas através da venocentese jugular, utilizando-se tubos a vácuo devidamente identificados, com o animal em estação. Foi confeccionada uma ficha cadastral contendo informações sobre faixa etária dos animais e aspectos reprodutivos do rebanho.

3.1.2. Caninos

Por meio da venocentese jugular foram obtidas amostras sangüíneas de 37 cães hígdidos, com idade superior a seis meses, que conviviam nas propriedades em proximidade com os rebanhos leiteiros.

3.1.3. Humanos

Após serem obtidas as autorizações formais, 67 amostras de sangue foram colhidas de pessoas com idade superior a 15 anos, conviventes nas propriedades estudadas. A colheita foi feita por venocentese cefálica, sob responsabilidade de uma Auxiliar de Enfermagem da Secretaria de Saúde do município de Araputanga, Mato Grosso, e de um Médico Veterinário.

3.1.4. Fêmeas bovinas e respectivos fetos

Foram colhidas também amostras de sangue de fêmeas bovinas abatidas em frigorífico, originárias da região sudoeste do Estado de Mato Grosso, e de seus respectivos fetos, objetivando-se caracterizar a transmissão vertical do *N. caninum*.

Após a retração do coágulo e centrifugação a 1000 g durante 10 minutos, os soros foram extraídos, identificados e mantidos à temperatura de -20 °C, em microtubos de polipropileno, até a realização dos exames sorológicos.

3.2. Exames sorológicos

3.2.1. Local

Os soros de bovinos e caninos foram analisados no laboratório de “Diagnóstico imunoparasitológico” do Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (CPPAR/FCAV/UNESP), Câmpus de Jaboticabal, e os de humanos no “Laboratório de Imunoparasitologia” da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais.

3.2.2. Técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI) para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum*

3.2.2.1. Bovinos

As amostras de soros de bovinos foram examinadas pela IFI, segundo Conrad et al. (1993). Foram utilizados taquizoítas de *N. caninum* cultivados em células Vero e fixados em lâminas de vidro (*Veterinary Medical Research and Development Inc.*, USA) cedidas pelo Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade de São Paulo, SP, e conjugado anti-IgG bovino (Sigma Chemical, F7887). Inicialmente foi feita triagem dos soros na diluição 1:200. As amostras positivas foram novamente examinadas, em diluições seqüenciais, na base dois, até 1:3200. As reações com título igual ou maior que 200 são consideradas positivas (DUBEY e LINDSAY, 1996).

Os soros foram diluídos em solução salina tamponada com fosfato 0,1 M (tampão PBS pH 7,2). Dez microlitros do soro diluído foram adicionados às áreas demarcadas nas lâminas contendo o antígeno. As lâminas foram, então, acondicionadas em câmara úmida e incubadas em estufa a 37 °C por 40 minutos. Em seguida as mesmas foram lavadas três vezes em tampão PBS, por 10 minutos, e

colocadas para secar por dez minutos na estufa a 37 °C. Posteriormente, foram adicionados dez µL do conjugado, marcado com isotiocianato de fluoresceína diluído, de acordo com as informações do fabricante, e em Azul de Evans a 0,01%, sendo as lâminas novamente incubadas, nas mesmas condições anteriormente descritas. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes em tampão PBS e uma vez com água destilada, por 10 minutos cada (para remoção do excesso de sais), e colocadas para secar em estufa a 37 °C durante 10 minutos. Após a secagem adicionou-se glicerina tamponada e as lâminas foram recobertas com lamínulas e examinadas em microscópio de imunofluorescência com objetiva de 40x. Em cada lâmina confeccionada foram colocados um soro negativo e um positivo.

As lâminas foram observadas em microscópio (Olympus BX60) equipado para fluorescência (sistema de epi-iluminação) com objetiva de 40x. Foram consideradas positivas as reações fluorescentes em toda a periferia dos parasitos, ainda que em pequena intensidade. Nas reações negativas, os parasitos presentes na lâmina não apresentaram fluorescência, ou esta ficou apenas localizada em uma das extremidades dos mesmos, sendo caracterizada como “coloração polar” ou “reação apical”.

3.2.2.2. Caninos

As amostras de soros de cães foram examinadas por meio dos mesmos procedimentos utilizados para as de bovinos, porém com triagem inicial na diluição 1:50. As positivas foram novamente examinadas em diluições seqüenciais, na base dois, até 1:3200. Utilizou-se conjugado anti-IgG canino (Sigma Chemical, F 4012). As reações com título igual ou maior que 50 foram consideradas positivas.

3.2.2.3. Humanos

As amostras foram examinadas por meio de procedimentos semelhantes aos utilizados para bovinos, porém de acordo com Camargo (1964) e Mineo et al. (2001). Utilizou-se triagem na diluição de 1:100 (ponto discriminativo) pela IFI, com conjugado anti-IgG humano (Sigma Chemical Co.).

As amostras positivas foram confirmadas pelo teste de “Western-blot”, de acordo com protocolo de Lobato et al. (2006).

3.2.2.4. Fêmeas bovinas e respectivos fetos

Amostras procedentes de rebanhos pertencentes a municípios da região sudoeste do Estado de Mato Grosso foram colhidas durante abates no frigorífico “Savana”, localizado no município de Várzea Grande, Mato Grosso. Foram colhidas amostras de sangue de vacas prenhes cuja base racial era zebuínos, provenientes de propriedades com manejo de recria e engorda.

O sangue foi colhido por meio de punção cardíaca durante os abates. Os fetos obtidos desses animais foram devidamente identificados, obtendo-se também sangue colhido por punção cardíaca. A idade dos fetos foi estimada segundo o comprimento da metade da cabeça até a inserção da cauda, de acordo com recomendações de Roberts (1984).

Os soros maternos e fetais foram acondicionados em microtubos de polipropileno previamente identificados e mantidos a -20 °C, até o momento de se efetuar as análises.

Fragmentos do cérebro dos fetos foram encaminhados para o “Laboratório de Histopatologia” do Departamento de Patologia Animal da FCAV/UNESP-Jaboticabal, para exame histopatológico. Os fragmentos foram fixados em formalina tamponada a 10%, e processados por técnicas histológicas convencionais.

3.3. Propriedades

As 24 propriedades estudadas na região sudoeste do Estado de Mato Grosso localizam-se em área de relevo ondulado, oscilando entre latitude 15° sul e longitude 58° oeste, com altitude média de 200 metros. Quanto às cidades mais próximas, são situadas Araputanga, São José dos Quatro Marcos e Jaurú.

As propriedades apresentavam ordenha mecânica e ou tipo balde ao pé, e a maior parte possuía mão-de-obra basicamente familiar. Algumas características gerais das propriedades estão sumarizadas na Tabela 4.

A maior parte dos animais era criada de forma extensiva em pastagens com lotações que variavam de 0,5 a 4,5 animais/hectare. A presença de um ou mais cães por propriedade foi um achado comum. Em todas as propriedades não havia histórico

de vacinação dos animais contra agentes potencialmente abortivos como *Leptospira* spp., Herpesvírus bovino tipo I (BHV-1) e Diarréia viral bovina (BVD), a não ser contra *Brucella abortus*.

Em 11 (45,83%) das propriedades avaliadas (n=24) houve relatos de casos de abortamentos, registrados em até 12 meses antes da data do preenchimento da ficha cadastral.

Tabela 4 - Características gerais das propriedades analisadas na região sudoeste do Estado de Mato Grosso, segundo ficha cadastral do rebanho leiteiro.

PROPRIEDADES	TOTAL ANIMAIS	FÊMEAS EM LACTAÇÃO	PRODUÇÃO (LITROS/DIA)	ABORTAMENTO (ÚLTIMOS 12 MESES)
1	120	28	200	sim
2	430	57	250	sim
3	250	70	400	sim
4	50	46	150	não
5	300	65	450	sim
6	300	44	470	sim
7	164	30	150	sim
8	160	72	600	não
9	400	50	430	não
10	500	16	65	sim
11	160	27	150	não
12	160	41	140	não
13	200	47	150	não
14	200	30	200	não
15	170	48	200	não
16	44	11	35	não
17	15	6	20	não
18	30	9	30	sim
19	50	8	27	não
20	50	12	30	não
21	60	12	50	sim
22	55	34	210	não
23	210	40	90	sim
24	90	28	180	sim

3.4. Análise estatística

Os resultados referentes aos exames sorológicos efetuados foram estatisticamente analisados por meio do teste de X^2 (qui-quadrado), segundo Everitt (1992).

Para o estudo da prevalência do *N. caninum*, foram realizadas 932 (22,36%) análises, pela IFI, de uma população de 4168 bovinos, pertencente a 24 propriedades. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), no qual cada animal representou uma parcela. As amostras de cada propriedade foram selecionadas aleatoriamente (Tabela 5).

Para se saber quais das propriedades analisadas possuíam as maiores soroprevalências utilizou-se inicialmente um teste de hipótese, baseado no qui-quadrado como indicativo:

TESTE DE HIPÓTESE

H_0 = Todas as prevalências são iguais;

H_1 = Pelo menos uma das prevalências difere das demais (hipótese alternativa).

A partir destes dados foi possível saber significativamente (95% de confiança) quais das propriedades possuíam as maiores prevalências da região estudada e correlacionar as mesmas com os casos de abortamentos e cães positivos nas propriedades.

Com o objetivo de levar em conta um possível efeito da idade dos bovinos como fator de risco para a presença de anticorpos anti-*Neospora caninum*, comparou-se a positividade entre as faixas etárias de 0 a 24 meses, 24 a 48 meses, 48 a 72 meses e idade superior a 72 meses, duas a duas.

Tabela 5 - Propriedades da região sudoeste do Estado de Mato Grosso, total de bovinos leiteiros por propriedade, total de colheitas por propriedade e porcentagem de colheita por propriedade.

Propriedades	Total de animais por propriedade	Total de colheitas por propriedade	(%) colheita por propriedade
1	120	17	14,17
2	430	56	13,02
3	250	68	27,20
4	50	46	92,00
5	300	78	26,00
6	300	70	23,33
7	164	28	17,07
8	160	69	43,13
9	400	94	23,50
10	500	27	5,40
11	160	26	16,25
12	160	37	23,13
13	200	46	23,00
14	200	44	22,00
15	170	48	28,24
16	44	7	15,91
17	15	9	60,00
18	30	5	16,67
19	50	8	16,00
20	50	12	24,00
21	60	20	33,33
22	55	31	56,36
23	210	35	16,67
24	90	51	56,67
Total	4168	932	22,36

4. RESULTADOS

4.1. Bovinos

A partir de 932 amostras de soro sanguíneo de bovinos, observou-se prevalência de soropositivos para anticorpos anti-*N. caninum* igual a 53,54% (499 animais). Verificou-se que *N. caninum* está presente em todas as propriedades estudadas. Na Tabela 6 são apresentados os resultados da ocorrência de anticorpos em bovinos, segundo as propriedades.

Tabela 6 - Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros da região sudoeste do Estado de Mato Grosso, segundo as propriedades analisadas.

PROPRIEDADES	TOTAL DE ANIMAIS DA PROPRIEDADE	ANIMAIS EXAMINADOS	Positivos (N°)	Positivos (%)
1	120	17	4	23,52
2	430	56	24	42,85
3	250	68	56	82,35
4	50	46	42	91,3
5	300	78	29	37,17
6	300	70	32	45,71
7	164	28	18	64,28
8	160	69	33	47,82
9	400	94	66	70,21
10	500	27	14	51,85
11	160	26	10	38,46
12	160	37	12	32,43
13	200	46	17	36,95
14	200	44	17	38,63
15	170	48	39	81,25
16	44	7	4	57,14
17	15	9	3	33,33
18	30	5	2	40
19	50	8	1	12,5
20	50	12	5	41,66
21	60	20	10	50
22	55	31	27	87,09
23	210	35	11	31,42
24	90	51	23	45,09
TOTAL	4168	932	499	53,54

4.2. Caninos

A partir de 37 amostras de soro sangüíneo de cães, observou-se prevalência de soropositivos para anticorpos anti-*Neospora caninum* igual a 67,57% (25 animais). Das 24 propriedades avaliadas, 19 (79,17%) apresentaram pelo menos um cão soropositivo na diluição 1:50, conforme mostra a Tabela 7.

Tabela 7 - Correlação dos caninos e bovinos soropositivos com propriedades analisadas na região sudoeste do Estado de Mato Grosso.

PROPRIEDADES	TOTAL BOVINOS	TOTAL COLHEITA BOVINOS	Nº BOVINOS POSITIVOS	% BOVINOS POSITIVOS	TOTAL CÃES (Nº)	CÃES POSITIVOS (Nº)
1	120	17	4	23,52	1	1
2	430	56	24	42,85	2	2
3	250	68	56	82,35	2	1
4	50	46	42	91,3	1	0
5	300	78	29	37,17	2	1
6	300	70	32	45,71	3	2
7	164	28	18	64,28	1	1
8	160	69	33	47,82	2	1
9	400	94	66	70,21	3	3
10	500	27	14	51,85	1	1
11	160	26	10	38,46	2	0
12	160	37	12	32,43	2	2
13	200	46	17	36,95	1	1
14	200	44	17	38,63	1	0
15	170	48	39	81,25	1	0
16	44	7	4	57,14	1	1
17	15	9	3	33,33	2	1
18	30	5	2	40	2	2
19	50	8	1	12,5	2	1
20	50	12	5	41,66	1	1
21	60	20	10	50	1	1
22	55	31	27	87,09	1	0
23	210	35	11	31,42	1	1
24	90	51	23	45,09	1	1
TOTAL	4168	932	499	53,54	37	25 (67,57%)

4.3. Humanos

Das 67 amostras obtidas, observou-se positividade em sete (10,45%), por meio da IFI, com ponto discriminativo de 1:100, conforme dados da Tabela 8.

Observa-se que as sete amostras soropositivas correspondem a trabalhadores rurais do sexo masculino, provenientes das cinco propriedades relacionadas na Tabela 9, as quais apresentaram ocorrência de no mínimo 23,52% de bovinos soropositivos. Em apenas uma das cinco propriedades citadas não houve presença de cães soropositivos a anticorpos anti-*N. caninum*.

As amostras reativas pela IFI foram confirmadas pelo teste “Western-blot”, com extrato solúvel de *N. caninum*, cepa NC1, e reveladas pelo conjugado anti-IgG humano marcado com peroxidase, de acordo com protocolo de Mineo et al. (2001).

Tabela 8 - Porcentagens de trabalhadores rurais de propriedades da região sudoeste do Estado de Mato Grosso sororreagentes ou não à presença de anticorpos anti-*Neospora caninum*, de acordo com o sexo.

TÍTULO DE ANTICORPOS (RIFI)	SORORREAGENTES (%)	SEXO		NÃO-REAGENTES (%)	SEXO	
		M	F		M	F
100	7 (10,45%)	7	0	60 (89,55%)	43	17

Tabela 9 - Relação entre trabalhadores rurais, bovinos e caninos soropositivos a anticorpos anti-*Neospora caninum* e respectivas propriedades da região sudoeste do Estado de Mato Grosso.

HUMANOS SOROPOSITIVOS	PROPRIEDADES	TOTAL COLHEITA DE HUMANOS	% BOVINOS POSITIVOS	TOTAL CÃES (Nº)	CÃES POSITIVOS (Nº)
1	1	2	23,52	1	1
2	7	4	64,28	1	1
3	15	4	81,25	1	0
4	15	4	81,25	1	0
5	21	2	50	1	1
6	23	3	31,42	1	1
7	23	3	31,42	1	1
7	5	22	-	5	4

4.4. Fêmeas bovinas e respectivos fetos

Das 20 amostras de soro obtidas no frigorífico observou-se positividade em duas fêmeas (10%), sendo também positivos os respectivos fetos (10%), analisados no terço médio da gestação (Tabela 10). Três fêmeas mostraram-se positivas em diferentes titulações, não transmitindo anticorpos para os fetos, sendo dois deles analisados no terço final da gestação e um no terço inicial. Assim sendo, considera-se que cinco fêmeas (25%) mostraram-se positivas para anticorpos anti-*Neospora caninum*, em diferentes diluições, conforme os dados contidos na Tabela 11.

No exame histopatológico não foram encontradas lesões compatíveis com a presença do *N. caninum* nos fragmentos de cérebro dos fetos.

Tabela 10 - Classificação dos fetos, provenientes da região sudoeste do Estado de Mato Grosso, e resultados de sorologia de acordo com a idade.

IDADE GESTACIONAL	Número de fetos	TÍTULOS DE ANTICORPOS				
		1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
Terço inicial	6	0	0	0	0	0
Terço médio	9	2	2	2	1	0
Terço final	5	0	0	0	0	0
TOTAL	20	2 (10%)	2 (10%)	2 (10%)	1 (5%)	0

Tabela 11 - Número e porcentagem de vacas gestantes abatidas e respectivos fetos, provenientes da região sudoeste do Estado de Mato Grosso, positivos a anticorpos anti-*Neospora caninum* em diferentes diluições, pela IFI.

	Total colheita	TÍTULOS DE ANTICORPOS				
		1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
MÃES	20	5 (25%)	3 (15%)	3 (15%)	1 (5%)	0
FETOS	20	2 (10%)	2 (10%)	2 (10%)	0	0

4.5. Análise estatística

A média de soroprevalência para anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros da região sudoeste do Estado de Mato Grosso, entre as propriedades, foi de 49,30% (Figura 1). Entretanto, os resultados da análise estatística mostram que quatro (4, 9, 15 e 22) das seis propriedades que obtiveram as maiores prevalências não apresentaram casos de abortamento, e que três delas (4, 15 e 22) não possuíam cães com sorologia positiva para anticorpos contra *N. caninum*, conforme dados da Tabela 12.

Tabela 12 - Propriedades da região sudoeste do Estado de Mato Grosso, prevalência para anticorpos anti-*Neospora caninum*, porcentagem de cães soropositivos e histórico de abortamento nas propriedades.

Propriedades	Prevalência (%)	% Cães positivos	Abortamento
1	23,52 b	100	sim
2	42,85 b	100	sim
3	82,35 a	50	sim
4	91,3 a	0	não
5	37,17 b	50	sim
6	45,71 b	66,33	sim
7	64,28 a	100	sim
8	47,82 b	50	não
9	70,21 a	100	não
10	51,85 b	100	sim
11	38,46 b	0	não
12	32,43 b	100	não
13	36,95 b	100	não
14	38,63 b	0	não
15	81,25 a	0	não
16	57,14 b	100	não
17	33,33 b	50	não
18	40 b	100	sim
19	12,5 b	50	não
20	41,66 b	100	não
21	50 b	100	sim
22	87,09 a	0	não
23	31,42 b	100	sim
24	45,09 b	100	sim
Média	49,3	67,35	–
Desvio Padrão	20,5	40,67	–

Obs: Todas as propriedades possuem cães;

a, b: letras que diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de qui-quadrado.

A Figura 2 ilustra as porcentagens de bovinos soropositivos de cada propriedade, de acordo com os títulos de anticorpos padronizados pela IFI a partir de 1:200 (ponto discriminativo). Observa-se que em grande parte das propriedades a positividade é mantida nos animais em até pelo menos 1:800.

Com relação à análise da variável faixa etária (Tabela 13) como fator de risco para a positividade a anticorpos anti-*Neospora caninum* nos bovinos avaliados, houve diferença estatística significativa quando comparadas as faixas de 0 a 24 meses com 24 a 48 meses, assim como quando comparadas 24 a 48 meses com idade superior a 72 meses. Não houve diferença entre as demais faixas etárias comparadas duas a duas.

Tabela 13 - Distribuição da freqüência de bovinos leiteiros soropositivos a anticorpos anti-*Neospora caninum* procedentes da região sudoeste do Estado de Mato Grosso, segundo faixa etária.

IDADE (meses)	POSITIVOS				NEGATIVOS				TOTAL	
	fo	fé	(fo-fe) ² /fe	%	fo	fe	(fo-fe) ² /fe	%	Nº	%
0 – 24	66	67	0,015	13,23	59	58	0,017	13,62	125	13,41
24 – 48	131	120	1,008	26,25	93	104	1,163	21,48	224	24,03
48 – 72	113	145	7,062	22,64	157	125	8,192	36,26	270	29,00
> 72	189	167	2,090	37,88	124	146	3,315	28,64	313	33,58
TOTAL	499	499	10,175	-	433	433	12,687	-	932	-

$$\chi_{obs}^2 = 10,175 + 12,687 = 22,86$$

$$\chi_{c(3gl;1\%)}^2 = 11,345$$

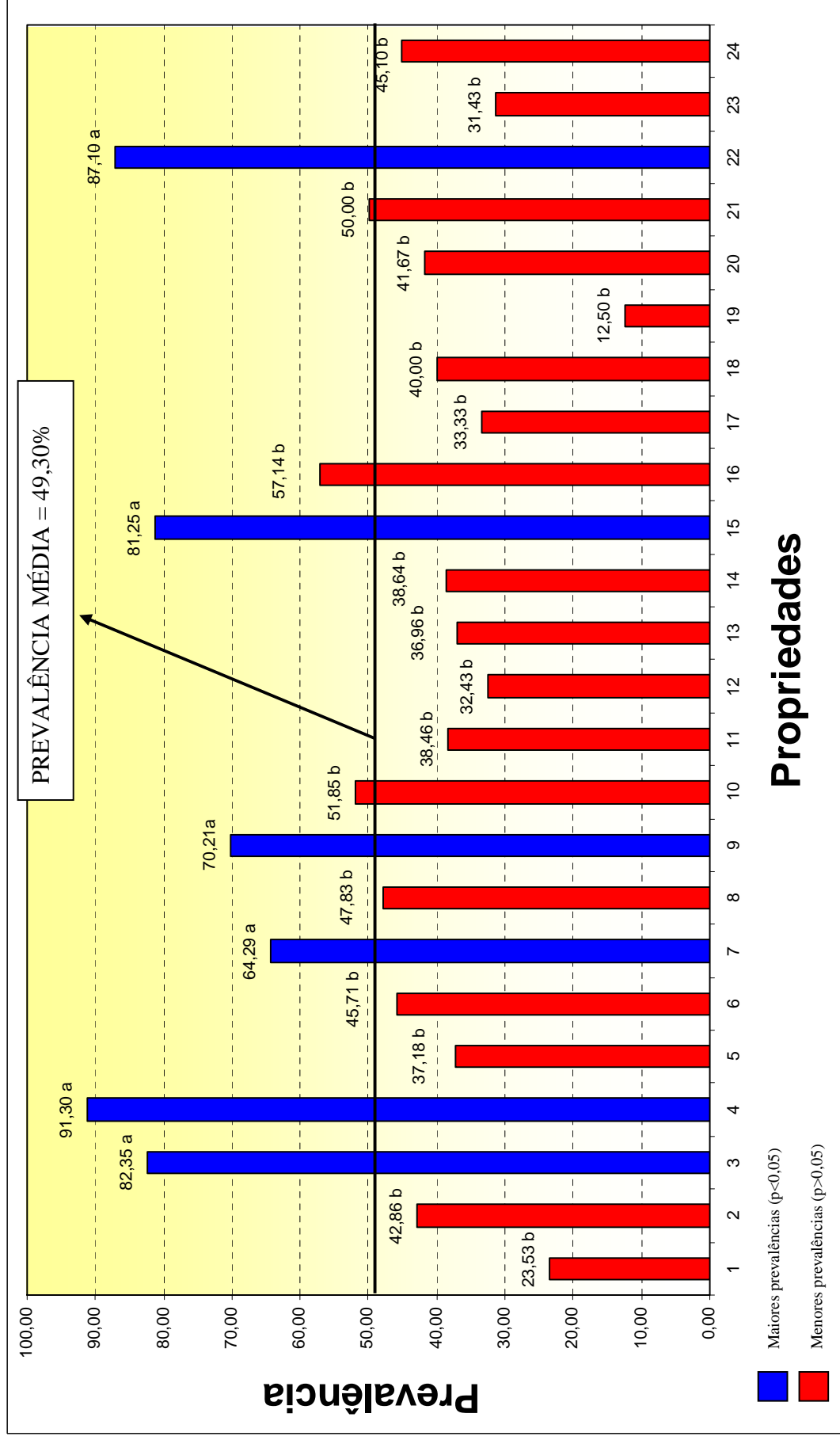


Figura 1: Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros da região sudoeste do Estado de Mato Grosso, pertencentes a 24 propriedades rurais amostradas.

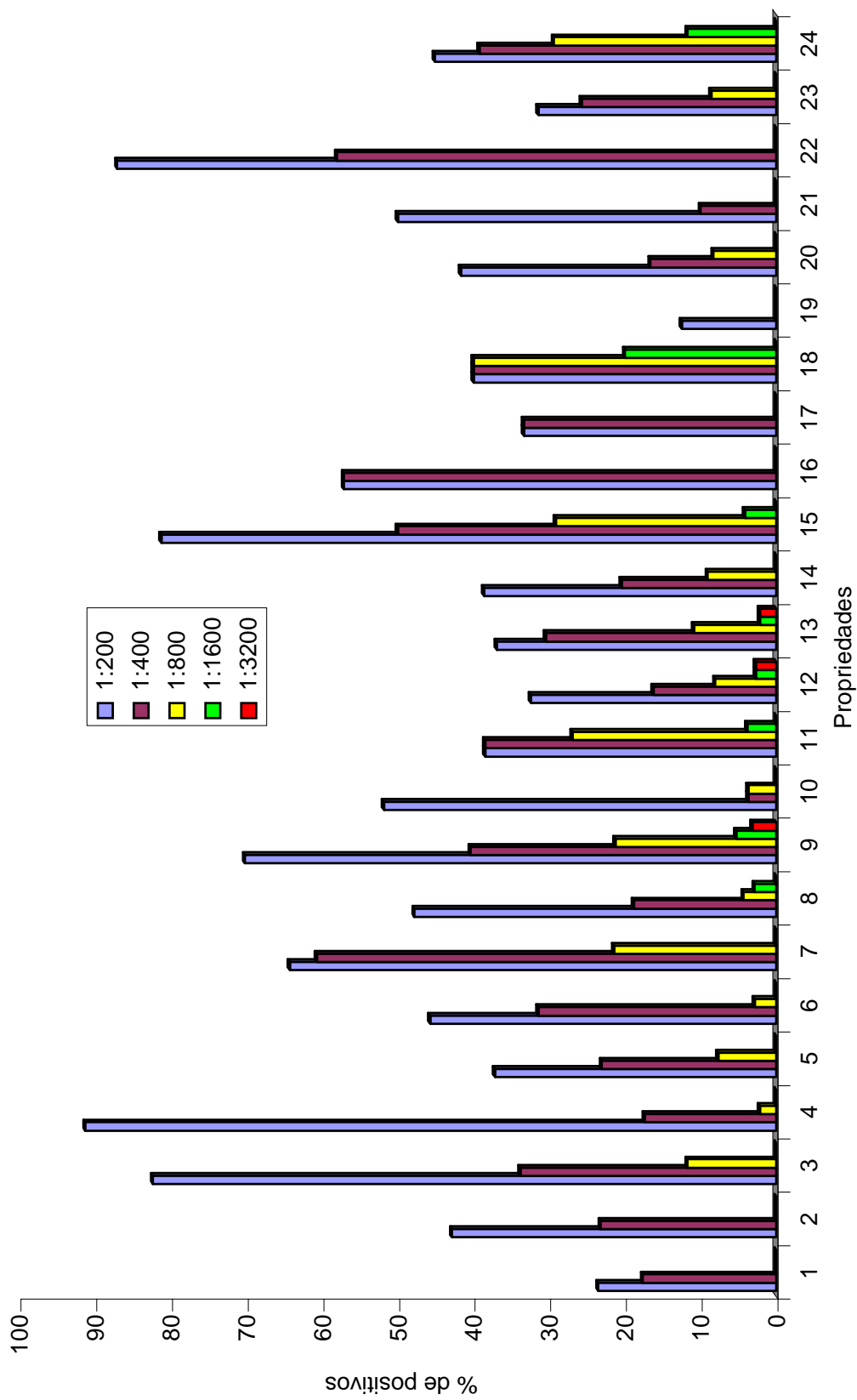


Figura 2: Porcentagem de bovinos leiteiros da região sudoeste do Estado de Mato Grosso positivos a anticorpos anti-*Neospora caninum* em diferentes titulações pela IFI.

5. DISCUSSÃO

A escolha da IFI como método de diagnóstico da infecção humoral de bovinos, caninos e humanos está alicerçada nas observações de Trees et al. (1994) e de Pará et al. (1998). Reações apicais ou polares (fluorescência parcial de taquizoítos) descritas por Conrad et al. (1993) e observadas nos soros examinados não interferiram na interpretação dos resultados obtidos. O ponto discriminativo escolhido para as análises pela IFI em bovinos deste estudo foi de 1:200, segundo recomendações de Dubey e Lindsay (1996).

Analisando a Tabela 6 observa-se que a freqüência de bovinos sororreagentes para *N. caninum* foi de 53,54%, resultado este inferior ao obtido por Belo et al. (1999), que diagnosticaram 67,8% de soropositividade em bovinos pertencentes ao Estado de São Paulo, embora esses autores tenham utilizado número menor de amostras examinadas. No entanto, o resultado de 53,54% deste estudo foi superior à freqüência de bovinos sororreagentes pertencentes aos demais estados, estudados pela IFI e citados na Tabela 1. Vale lembrar que não há informações sobre os pontos de corte utilizados nos referidos trabalhos, sendo este um fato que limita a padronização das informações comparativas entre os diferentes estados, além de outros que também poderiam ser considerados, como manejo, fatores ambientais e rotas de transmissão do parasita.

DUBEY (2003) citou que os valores do ponto de corte precisam ser arbitrados para a mensuração da especificidade e sensibilidade requeridas para cada teste em particular. A variabilidade de índices de infecção por *N. caninum* citados na Tabela 1 (6,8% a 67,8%) pode estar relacionada, dentre outros, aos diferentes pontos discriminativos utilizados e à ausência de técnicas sorológicas padronizadas. Dados como procedência dos animais, manejo, positividade ou não a outros agentes abortivos assim como a profilaxia aplicada para os mesmos, poderiam interferir estatisticamente no percentual de animais sororreagentes (AGUIAR, 2004).

De acordo com Wouda et al. (1999), a presença de cães portadores de anticorpos contra *N. caninum* nas fazendas está associada à prevalência dessa

infecção em bovinos. Entretanto, no presente estudo, observou-se a ausência de cães soropositivos em três das seis propriedades com os maiores números de bovinos sororreagentes (91,3; 87,09 e 81,25% de prevalência). Este resultado pode estar associado ao baixo número de caninos examinados por propriedade, ou ser indicativo de que o parasita mantém-se no rebanho mesmo na ausência do hospedeiro definitivo, sendo a positividade associada à transmissão vertical, o que condiz com as informações de Anderson et al. (1997) quando afirmaram que a transmissão transplacentária é considerada a principal via de infecção em bovinos. Outro motivo relevante pode ter sido a presença de cães errantes nas propriedades que, embora não presentes no momento da colheita e reportados como freqüentadores, podem ter tido participação no ciclo de *N. caninum*, sendo esta informação baseada em fatos citados nos estudos de Corbellini (2002).

Lindsay et al. (1999) observaram que cães, mesmo eliminando oocistos pelas fezes (período latente) podem não soroconverter, sendo este mais um aspecto a ser considerado na análise da fraca correlação entre a presença de cães e a soropositividade em bovinos alcançada neste estudo.

CAÑÓN-FRANCO et al. (2003) e AGUIAR (2004), em dois estudos realizados em um mesmo município do Estado de Rondônia, encontraram valores de prevalência de 8,3% e 12,6%, respectivamente, para a região urbana e rural. Estes dados indicam que no meio rural as fontes de infecção para os cães como ingestão de placenta e fetos contaminados, bem como a possibilidade de caça e de ingestão de cistos teciduais em possíveis hospedeiros intermediários, parece ser importante na epidemiologia e manutenção do *N. caninum* nesse ambiente. Os valores obtidos na sorologia dos cães do presente estudo (67,57%) podem, então, ser justificados pelas afirmações acima citadas para cães do meio rural.

Observou-se também nos resultados obtidos neste estudo que, quatro das seis propriedades com os maiores números de bovinos sororreagentes não apresentaram casos de abortamentos nos últimos 12 meses até o preenchimento da ficha epidemiológica do rebanho (Tabela 12). Okuda et al. (1997) observaram em um

rebanho no Japão, 27,7% de animais sororreagentes sem histórico de abortamento, e Stobbe e Côrtes, no Estado de São Paulo (1999), relataram 26,2%.

Um fato importante a ser mencionado é que, pelo questionário utilizado nas propriedades avaliadas no presente estudo, as pessoas entrevistadas não possuíam, ou omitiram informações concretas. Quase todos os proprietários ou responsáveis que relataram a ocorrência de abortamentos, não tiveram condições de informar o número e a época de ocorrência dos mesmos. Considera-se, então, que deveriam ser implementadas formas de divulgação dos dados para proprietários e trabalhadores rurais sobre possíveis parasitas e outros agentes presentes nos rebanhos, alertando-os sobre etiopatogenia, sinais clínicos e, sobretudo, formas de controle e profilaxia das doenças. Desta forma, talvez, dados mais concretos seriam obtidos nas fichas epidemiológicas e sanitárias presentes nas diferentes pesquisas feitas em rebanhos brasileiros.

Trees et al. (1994) citaram que a presença de anticorpos anti-*N. caninum* nos rebanhos leiteiros não é indicativo da doença, uma vez que bovinos soropositivos podem ser assintomáticos, mas que a magnitude dos títulos séricos para anticorpos é considerada indicativo de infecção. Salienta-se, então, a importância de serem realizados exames sorológicos pela IFI em diferentes titulações a partir do ponto discriminativo, para melhor análise da magnitude da infecção.

Para o soro dos fetos, utilizou-se também ponto discriminativo de 1:200. No entanto, Wouda et al. (1997) citaram que na sorologia fetal os pontos de corte mais aceitos variam de 1:50 a 1:80. Gonzáles et al. (1999) sugeriram o emprego de diferentes pontos de corte de acordo com a idade do feto. Assim sendo, a análise do soro fetal no presente trabalho não foi feita com protocolos diferenciados, o que pode ter interferido no resultado negativo do feto obtido de mãe positiva no terço inicial da gestação (Tabelas 10 e 11).

Wouda et al. (1997) informaram que a infecção por *N. caninum* em fetos não pode ser descartada devido à ausência de anticorpos no soro ou em fluidos fetais. A presença de anticorpos contra o parasito é determinada pela condição imunológica do

feto, que por sua vez depende da idade do mesmo, da dose infectante e da resposta imune da mãe (Dubey et al., 1997).

A partir da análise sorológica pela IFI, realizada em fetos de diferentes idades, Barr et al. (1995) verificaram maior quantidade de sororreagentes em fetos de cinco a nove meses, comparados aos de menos de cinco meses, dados estes que podem ser equiparados aos obtidos no presente estudo, visto que os fetos soropositivos tinham entre quatro e seis meses, período este caracterizado como terço médio da gestação.

As técnicas histológicas são bastante utilizadas no diagnóstico do abortamento por *N. caninum* e são realizadas no feto abortado, o qual deve ser remetido ao laboratório juntamente com os anexos fetais e, se possível, com o soro sangüíneo da mãe (DUBEY e LINDSAY, 1996). A identificação do parasito por meio da histopatologia é difícil, pois as lesões macroscópicas são pouco freqüentes e o número de parasitas também é escasso, tornando difícil sua visualização em cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina (ANDERSON et al., 2000). Esta foi a técnica utilizada neste estudo em fragmentos de cérebro dos fetos abatidos, enviados para o “Laboratório de Histopatologia” do Departamento de Patologia Animal da FCAV - UNESP – Jaboticabal, nos quais não foram encontradas lesões compatíveis com a presença do parasito.

Segundo Dubey e Lindsay (1996), não há uma área exata do cérebro para que possa ser encontrado o *N. caninum*; portanto, qualquer segmento é viável para a realização de exames. No presente trabalho não foi possível a realização de técnicas de imunoistoquímica devido às condições de armazenamento dos referidos cérebros, favoráveis apenas para estudo histopatológico. Lesões histopatológicas sugestivas de infecção por *N. caninum* podem ser observadas em fragmentos de outros tecidos e órgãos, como músculo esquelético, coração, pulmão e fígado (PESCADOR et al., 2005), sugerindo-se, então, para novos estudos, o envio de outros fragmentos para análise, além do cérebro dos fetos.

As técnicas de imunoistoquímica permitem identificar o parasita nos cortes de tecido, utilizando soro policlonal ou anticorpo monoclonal anti-*Neospora*. A sensibilidade das técnicas pode variar em função do número de cortes histológicos e do grau de autólise dos tecidos (ALVAREZ-GARCIA, 2003).

Por causa da baixa sensibilidade da imunistoquímica, alguns pesquisadores têm aplicado a PCR para amplificar seqüências de DNA de *N. caninum* a partir de tecidos fetais frescos, congelados e emblocados em parafina; a técnica pode ser aplicada mesmo se o tecido estiver parcialmente destruído, autolisado ou contaminado (UGGLA et al., 1998). Apesar das vantagens citadas, a PCR inclui custos elevados com equipamentos e material de consumo, além da necessidade de laboratórios adequados para a realização dos testes, motivos pelos quais a técnica não foi escolhida para o presente estudo.

Títulos de anticorpos maiores ou iguais a 800 pela IFI são considerados altos e sugestivos de infecção ativa por *N. caninum* (McALLISTER, 2002). No presente estudo, verificou-se que mais de 10 % dos bovinos apresentaram títulos iguais ou superiores a 800 (Figura 2), o que permite a suposição de que poderiam estar na fase aguda da doença.

Hietala e Thurmond (1999) relataram que os níveis de anticorpos podem apresentar flutuações com a idade; animais entre 13 e 24 meses apresentam tendência de baixas soroprevalências em relação a outras faixas etárias, e esses autores sugeriram que isto ocorra devido ao declínio de anticorpos em bovinos congenitamente infectados. Estas informações apontam as dificuldades e o cuidado que merecem as interpretações da soroepidemiologia do *N. caninum*.

No presente trabalho, quando comparadas as faixas etárias dos bovinos com relação à presença de anticorpos, observou-se que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as faixas de 0 a 24 meses e de 24 a 48 meses, apontando maior prevalência de bovinos soropositivos com idade entre 24 e 48 meses. Este fato pode, então, estar alicerçado nas informações citadas por Hietala e Thurmond (1999).

Na Inglaterra não foi observada evidência no aumento da soroprevalência de acordo com a idade dos bovinos estudados (HEMPHILL e GOTTSTEIN, 2000). Resultado semelhante foi observado por Pitel et al. (2001) na França.

No Brasil, Melo et al. (2001), num estudo em fêmeas leiteiras do Estado de Minas Gerais, também não observaram diferenças entre as faixas etárias de sete a 18 meses, 19 e 30 meses e fêmeas acima de 31 meses, sugerindo haver mesma exposição dos

animais ao parasito. Guimarães et al. (2004), também no Brasil, observaram em fêmeas bovinas acima de 24 meses maiores prevalências para o agente e encontraram a idade como um importante fator de risco.

Diante das divergências entre os resultados obtidos sobre a correlação entre a idade dos bovinos e a presença de anticorpos contra *N. caninum* nos diferentes estudos, conclui-se, baseando-se também em citações de Schares et al. (1998) e Anderson et al. (2000), que as diferenças entre rebanhos podem estar correlacionadas com o tempo de exposição ao parasita e com a forma de transmissão do mesmo, podendo ser vertical, com a manutenção da infecção adquirida, ou horizontal, com uma nova infecção devido à presença do hospedeiro definitivo na propriedade.

O descarte e a reposição de animais do rebanho também podem interferir nos resultados (ANDERSON et al., 2000). Assim sendo, estudos mais abrangentes são sugeridos para uma mesma propriedade quando analisada.

Pesquisas têm sido desenvolvidas no Brasil no sentido de relacionar outros fatores de risco para a infecção por *N. caninum* em bovinos, como a desenvolvida por Guimarães et al. (2004), associando variáveis como raça, histórico reprodutivo completo e alimentação (além da idade e da presença de cães nas propriedades) com a soropositividade a anticorpos. Assim sendo, poderia ser sugerido como trabalho de continuidade do presente estudo, a correlação de outras variáveis, como as acima citadas, com a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos leiteiros do Estado de Mato Grosso.

Os resultados obtidos pela IFI na sorologia dos trabalhadores rurais pertencentes às propriedades da região sudoeste do Estado de Mato Grosso podem contribuir engrandecendo a escassa literatura existente sobre a pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* em humanos. A ocorrência de 10,45% obtida foi superior à relatada por Lobato et al. (2006), que obtiveram 6% de positividade em indivíduos saudáveis do Estado de Minas Gerais, sendo os resultados positivos pela IFI confirmados pelos testes de ELISA e “Western-blot”.

Vale lembrar que os indivíduos amostrados no presente trabalho e em um dos grupos estudados por Lobato et al. (2006) não tinham histórico de problemas

reprodutivos e ou de outras doenças concomitantes, diferentemente da maior parte dos poucos relatos disponíveis em literatura sobre *N. caninum* em humanos.

Petersen et al. (1999) também pesquisaram a presença de anticorpos anti-*N. caninum*, em grupo de mulheres dinamarquesas com abortamentos repetidos de causa desconhecida. Assim sendo, reafirma-se que o presente trabalho, embora trazendo resultados sorológicos em trabalhadores rurais do sexo masculino, traz importantes informações sobre a presença de anticorpos contra *N. caninum* em indivíduos imunocompetentes.

Entretanto, pouco ainda é sabido sobre a epidemiologia do *N. caninum* nos seres humanos. Considera-se que novos estudos deveriam ser desenvolvidos, destacando a proximidade do cão com o homem, assim como é devidamente contemplada em pesquisas a proximidade do homem com o gato, hospedeiro definitivo do *Toxoplasma gondii*.

Outras formas de infecção por *N. caninum* em humanos também poderiam ser investigadas, como sugeriram Lobato et al. (2006), baseando-se no que é descrito para a toxoplasmose em literatura, embora a epidemiologia de ambos os agentes em outras espécies tenha aspectos diferentes.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- Anticorpos anti-*Neospora caninum* estão presentes em rebanhos bovinos leiteiros da região sudoeste do Estado de Mato Grosso;
- A presença de cães sororreagentes nas propriedades levou a uma correlação positiva fraca em relação à ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos;
- A idade das fêmeas bovinas constituiu-se em fator de risco para a presença de anticorpos anti-*Neospora caninum* nos animais na faixa etária de 24 a 48 meses e superior a 72 meses, pela maior prevalência;
- Em bovinos a transmissão vertical de anticorpos anti-*Neospora caninum* foi comprovada, com a observação de 10% de fêmeas bovinas e respectivos fetos positivos no terço médio da gestação;
- Anticorpos anti-*Neospora caninum* estão presentes em soros de trabalhadores rurais conviventes com bovinos e cães das propriedades estudadas;
- Cães e transmissão vertical são importantes na manutenção da neosporose.

7. REFERÊNCIAS *

AGUIAR, D.M. **Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum*, anti-*Brucella abortus* e anti-*Lepstospira spp* em bovinos da zona rural do município de Monte Negro, Rondônia: estudo de possíveis fatores de risco.** 2004. 118 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade de São Paulo, 2004.

ALVAREZ-GARCIA, G. **Identificación y caracterización de antígenos de *Neospora caninum* com interés inmunodiagnóstico en bovinos.** 2002. 279 p. Tese (Doutorado) – Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2003.

ANDERSON, M.L.; ADRIANARIVO, A.G.; CONRAD, P.A.; Neosporosis in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, p. 417-431. 2000.

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. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 198, n.2, p.241-244, 1991.

ANDERSON, M.L.; PALMER, C.W.; THURMOND, M.C.; PICANSO, J.P.; BLANCHARD, P.C.; BREITMEYER, R.E.; McALLISTER, M.; DAFT, B.; KINDE, H.; READ, D.H.; DUBEY, J.P. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 207, n. 9, p. 1206-1210, 1995.

ANDERSON, M.L.; REYNOLDS, J.P.; ROWE, J.D.; SVERLOW, K.M.; PACKHAM, A.E.; BARR, B.G.; CONRAD, P.A. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. Infection in dairy cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 210, n. 8, p.1169-1172, 1997.

* ABNT (NBR 6023:2002)

ANDREOTTI, R.; PINCKNEY, R.; GOMES, A. Diagnóstico sorológico de um rebanho bovino de corte de Mato Grosso do Sul. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11., 1999, Salvador. **Anais...** Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999. p. 226.

BARR, B.C.; ANDERSON, M.L.; BLANCHARD, P.C.; DAFT, B.W.; KINDE, H.; CONRAD, P.A. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. **Vet. Pathol.**, v. 27, n. 5, p. 354-361, 1990.

BARR, B.C.; CONRAD, P.A.; BREITMEYER, R.; SUERLOW, K.; ANDERSON, M.L.; REINOLDS, J.; CHAUVET, A.E.; DUBEY, J.P.; ARDANS, A.A. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 202, n. 1, p. 113-117, 1993.

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

BARR, B.C.; CONRAD, P.A.; SVERLOW, K.W.; TARANTAL, A.F.; HENDRICKX, A.G. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. **Lab. Invest.**, v. 71, n. 2, p. 236-242, 1994.

BARTELS, C.J.M.; WOUUDA, W.; SCHUKKEN, Y.H. Risk factors for *Neospora caninum* - associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997). **Theriogenology**, v. 52, n. 2, p. 247-257, 1999.

BASTOS, S.A.; MELO, D. P. G.; BOAVENTURA, C.M.; SILVA, A.C. Transmissão vertical de *Neospora caninum* em bovinos da microrregião de Goiânia, Goiás. In: FÓRUM BRASILEIRO DE ESTUDOS SOBRE *NEOSPORA CANINUM*, 1., 2005, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2005. p. 41.

BELO, M.A.A.; REZENDE, P.C.B.; CASTAGNOLLI, K.C.; BRESCIANI, K.D.S.; COSTA, A.J. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães criados sob diferentes condições sanitárias. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11., 1999, Salvador-BA. **Anais...** Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999. p. 228.

BJERKÅS, I.; MOHN, S.F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Z. Parasitenkd.**, v. 70, n. 2, p. 271-274, 1984.

BJÖRKMAN, C.; LUNDÉN, A.; UGGLA, A. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in Swedish dogs. **Acta. Vet. Scand.**, v. 35, n. 4, p. 445-447, 1994.

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

BRESCIANI, K.D.S.; GENNARI, S.M.; NUNES, C.; SERRANO, A.C.M.; MOURA, A.B.; STOBBE, N.S.; PERRI, S.H.V.; COSTA, A.J.; DIAS, R.A. Fatores de risco associados à presença de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães de Araçatuba – SP. In: FÓRUM BRASILEIRO DE ESTUDOS SOBRE *NEOSPORA CANINUM*, 1., 2005, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2005. p. 34-35.

CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 6, p. 117-118, 1964.

CAÑÓN-FRANCO, W.A.; BERGAMASCHI, D.P.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; SOUZA, S.L.P.; SILVA, J.C.R.; PINTER, A.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of antibodies anti-*Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 115, n. 1, p. 71-74, 2003.

CONRAD, P.A.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M.A.; ROWE, J.; BONDURANT, R.; TUTER, G.; BREITMEYER, R.; PALMER, C.; THURMOND, M.; ARDANS, A. Detection of serum antibody responses in cattle with natural and experimental *Neospora* infections. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 5, n. 2, p. 572-578, 1993.

CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.F.E.; GONDIM, L.F.P.; WALD, V. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 103, n. 3, p. 195-202, 2002.

DANNATT, L.; GUY, F.; TREES, A.J. Abortion due to *Neospora* species in a dairy herd. **Vet. Rec.**, v. 137, n. 22, p.566-567, 1995.

DeMAREZ,T.; LIDDELL,S.; DUBEY,J.P.; JENKINS, M.C.; GASBARRE, L. Oral inoculation of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, n. 10, p. 1647-1657, 1999.

DUBEY, J.P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Vet. Parasitol.**, v. 84, n. 3-4, p. 349-367, 1999.

DUBEY, J.P.; CARPENTER, J.L.; SPEER, C.A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988.

DUBEY, J.P.; CARPENTER, J.L.; SPEER, C.A.; TOPPER, M.J. A review of *Neospora caninum* and *Neospora*-like infections in animals. **J. Protozool. Res.**, v. 2, n. 13, p. 40-52, 1992.

DUBEY, J.P.; HARTLEY, W.J.; LINDSAY, D.S. Congenital *Neospora caninum* infection in a calf with spinal cord anomaly. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 197, n. 8, p. 1043-1074, 1990.

DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C.; ADAMS, D.S.; McALLISTER, M.M.; ANDERSON-SPRECHER, R.; BASZLER, T.V.; KWOK, O.C.H.; LALLY, N.C.; BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and different enzyme-linked immunosorbent assays. **J. Parasitol.**, v. 83, n. 6, p. 1063-1069, 1997.

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

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Neosporosis. **Parasitol. Today**, v. 9, n. 12, p. 452-458, 1993.

DUBEY, J.P.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; KWOK, O.C.; SHEN, S.K.; GAMBLE, H.R. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horses in North America. **J. Parasitol.**, v. 85, n. 5, p. 968-969, 1999.

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

EVERITT, B.S. **The analysis of contingency tables**. 2. ed. New York, John Wiley & Sons, 1992. 164 p.

GENNARI, S.M. *Neospora caninum* no Brasil: situação atual da pesquisa. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, n. 1, p. 23-28, 2004.

GONDIM, L. F. P.; McALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, n. 2, p. 159-161, 2004.

GONDIM, L.F.P. ***Neospora caninum* em animais silvestres.** In: FÓRUM BRASILEIRO DE ESTUDOS SOBRE *NEOSPOORA CANINUM*, 1., 2005. São Paulo, SP. **Anais...** Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, São Paulo, 2005. p.16.

GONDIM, L.F.P.; GUSMÃO, A.L.; GUIMARÃES, J.E.; ALMEIDA, M. A. O.; SOUZA, R. M. Associação entre ocorrência de abortos e soropositividade para *Neospora caninum* em bovinos leiteiros em Cachoeira, Bahia. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11., 1999, Salvador – BA. **Anais...** Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999. p. 228.

GONDIM, L.F.P.; LASKI, P.; GAO, L.; McALLISTER, M.M. Variation of the internal transcribed spacer 1 sequence within individual strains and among different strains of *Neospora caninum*. **J. Parasitol.**, v. 90, n. 1, p. 119-122, 2004.

GONDIM, L.F.P.; PINHEIRO, A.M.; SANTOS, P.O.M.; JESUS, E.E.V.; RIBEIRO, M.R.; FERNANDES, H.S.; ALMEIDA, M.A.O.; FREIRE, S.M.; MEYER, R.; McALLISTER, M.M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradzoites in gerbils. **Vet. Parasitol.**, v. 2138, p. 1-7, 2001.

GONDIM, L.F.P.; SARTOR, I.F. Detecção de anticorpos contra *Neospora caninum* em vacas leiteiras numa propriedade com histórico de aborto. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 10., 1997, Itapema. **Anais...** Itapema: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1997. p. 346.

GONZÁLES, L.; BUXTON, D.; ATXAERANDIO, R.; ADURIZ, G.; MALEV, S.; MARCO, J.C.; CUERVO, L.A. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. **Vet. Rec.**, v. 144, n. 6, p. 145-150, 1999.

GREIG, B.; ROSSOW, K.D.; COLLINS, J.E.; DUBEY, J.P. *Neospora caninum* pneumonia in adult dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 206, n. 7, p. 1000-1001, 1995.

GUIMARÃES, J.S.; SOUZA, S.L.P.; BERGAMASCHI, D.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 124, n. 1-2, p. 1-8, 2004.

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B.A. European perspective on *Neospora caninum*. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, n. 8, p. 1887-1924, 2000.

HIETALA, S.K.; THURMOND, M.C. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two daired. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, n. 10, p. 1669-1676, 1999.

HUONG, L.T.T.; LJUNGSTRÖM, B.L.; UGGLA, A.; BJÖRKMAN, C. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes in southern Vietnam. **Vet. Parasitol.**, v. 75, n. 1, p. 53-57, 1998.

LATHE, C.L. *Neospora caninum* in British dogs. **Vet. Rec.**, v. 134, n. 20, p. 532, 1994.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; UPTON, S.J.; RIDLEY, R.K. Serological prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs of Kansas. **J. Helminthol. Soc. Wash.**, v. 57, p. 86-88, 1990.

LINDSAY, D.S.; UPTON, S.J.; DUBEY, J.P. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, n. 10, p. 1521-1523, 1999 a.

LOBATO, J.; SILVA, D.A.; MINEO, T.W.P.; AMARAL, J.D.; SEGUNDO, G.R.; COSTA-CRUZ, J.M.; FERREIRA, M.S.; BORGES, A.S.; MINEO, J.R. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 13, n. 1, p. 84-89, 2006.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V.T.; RICHARTZ, R.R.; JOINEAU, M.G.; VINNE, R.V.; PINCKNEY, R.D. Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in southern Brazil. **J. Parasitol.**, v. 87, n. 6, p.1493-1494, 2001.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V.T.; PINCKNEY, R.D.; VINNE, R.V.; RICHARTZ, R.T.; JOINEAU, M.G.; HOFFMAN, D.C.S. Isolamento de *N. caninum* de feto bovino no Paraná e evolução da soroprevalência da neosporose e dos abortos no rebanho. In: XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA & I SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETSIOSES. **Anais...** Ouro Preto: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2004. p. 220.

MAGALHÃES, F.B.; JESUS, E.E.V.; ALMEIDA, M.A.O.; ATTA, A.M.; GONÇALVES, M.S. Serologic evidences of human *Neospora caninum* infection in Brazil. In: MEETING OF BRASILIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY, 27., 2002, Salvador. **Anais...** Salvador: Brazilian Society of Immunology, 2002. p. 114.

MAINAR-JAIME, R.C.; THURMOND, M.C.; BERZAL-HERRANZ, B.; HIETALA, S.K. Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. **Vet. Rec.**, v. 145, n. 3, p. 72-75, 1999.

MARSH, A.E.; BARR, B.C.; PACKHAM, A.E.; CONRAD, P.A. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **J. Parasitol.**, v. 84, n. 5, p. 983-991, 1998.

McALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A.; McGUIRE, A. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Inter. J. Parasitol.**, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, 1998.

McALLISTER, M.M.; LATHAM, S. *Neospora* 2001. **Trends Parasitol.**, v. 18, n. 1, p. 4-5. 2002.

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

MELO, C.B.; LEITE, R.C.; SOUZA, G.N. Freqüência de infecção por *Neospora caninum* em dois diferentes sistemas de produção de leite e fatores predisponentes à infecção em bovinos em Minas Gerais. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 10, n. 2, p. 67-74, 2001.

MELO, C.B.; PINHEIRO, A.M.; OLIVEIRA, A.A.; DANTAS, M.D.M.; JESUS, E.E.V.; ALMEIDA, M.A.O; REIS, A.V.; FEITOSA, A.S.; LEITE, R.C. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães em Aracaju, Sergipe. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 30., Manaus, 2003. **Resumos...** Manaus: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2003. 1 CDROM.

MINEO, T. W. P.; SILVA, D. A. O.; COSTA, G. H. N.; VON ANCKEN, A. C. B.; KASPER, L.H.; SOUZA, M.A.; CABRAL, D. D.; COSTA, A. J.; MINEO, J.R. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 98, n. 4, p. 239-245, 2001.

MORALES, S.E.; TRIGO, T.F.; PUENTE, C.E.; SANTACRUZ, M. Neosporosis bovina en Mexico: diagnostico histologico e inmunologico. In: CONGRESO PANAMERICANO DE CIENCIAS VETERINARIAS, 16., 1998, Santa Cruz de la Sierra. **Memorias...** Bolívia: COMVETBOL, 1998. p. 201.

NICOLLE, C.S.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (on organismes voisins), du *gondii*. **Comp. Rend. Acad. Sci.**, v. 147, p. 763-766, 1908.

ODIN, M.; DUBEY, J.P. Sudden death associate with *Neospora caninum* – myocarditis in a dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 203, n. 6, p. 831-833, 1993.

OKUDA, K.; FUKUTOMI, T.; YOSHINO, T. Detection of *Neospora* antibody and antigens from bovine cases of abortion in Okayama Prefecture. **J. Japan Vet. Med. Assoc.**, v. 50, n. 7, p. 386-389, 1997.

OSAWA, T.; WASTLING, J.; MALEY, S.; BUXTON, D.; INNES, E.A. A multiple antigen ELISA to detect *Neospora* specific antibodies in bovine sera, bovine fetal fluids, ovine and caprine sera. **Vet. Parasitol.**, v. 79, n. 1, p. 19-34, 1998.

OTTER, A.; JEFFREY, M.; GRIFFITHS, I.B.; DUBEY, J.P. A survey of the incidence of *Neospora caninum* infection in aborted and stillborn bovine fetuses in England and Wales. **Vet. Rec.**, v. 136, n. 24, p. 602-606, 1995.

PARÉ, J.; FECTEAU, G.; FORTIN, M.; MARSOALIS, G. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 213, n. 11, p. 1595-1598, 1998.

PARÉ, J.; THURMOND, M.C.; HIETALA, S.K. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhoo mortality. **Can. J. Vet. Res.**, v. 60, n. 2, p. 133-139, 1996.

PARÉ, J.; THURMOND, M.C.; HIETALA, S.K. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. **J. Parasitol.**, v. 83, n. 1, p. 83-87, 1997.

PESCADOR, C.A.; CORBELLINI, L.G.; CORRÊA, A.; SCHMITZ, M.; RAIMUNDO, D.L.; DRIEMEIER, D. Aborto bovino por *Neospora caninum*: fatores associados ao resultado positivo da imunoistoquímica. In: FÓRUM BRASILEIRO DE ESTUDOS SOBRE *NEOSPOORA CANINUM*, 1., 2005, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2005. p. 18-19.

PITEL, P.H.; PRONOST, S.; CHATAGNON, G.; TAINURIER, D.; FORTIER, G.; BALLEET, J.J. Neosporosis in bovine dairy herds from the west of France: detection of *Neospora caninum* DNA in aborted fetuses, seroepidemiology of *Neospora caninum* in cattle and dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 102, n. 4, p. 269-277, 2001.

PITUCO, E.M.; SOARES, J.A.G.; OKUDA, L.H.; STEFANO, E. Ocorrência de neosporose bovina em rebanhos com histórico de abortamento no Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, v. 65, p. 70, 1998.

ROBERTS, S.J. **Obstetricia veterinária y patología de la reproducción**. Buenos Aires: Ed. Hemisferio Sur, 1984. 1021 p.

RODRIGUES, A.A.R.; AGUIAR, D.M.; FUJII, T.U.; VIANNA, R.; DE PAULA, V.S.O.; BUZETI, W.; MACHADO, R.Z.; SOARES, R.M.; GENNARI, S. ***Neospora caninum* em búfalos**. In: FÓRUM BRASILEIRO DE ESTUDOS SOBRE *NEOSPOORA CANINUM*, 1., 2005, São Paulo, SP. **Anais...** Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, São Paulo, 2005. p. 16-17.

SÁNCHEZ, G.F.; MORALES, E.S.; MARTÍNEZ, J.M.; TRIGO, F.J. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. **Vet. Parasitol.**, v. 67, n. 3, p. 23-26, 2003.

SANTOS, A.P.M.E. **Diagnóstico imunohistoquímico do *Neospora caninum* em rebanho bovino leiteiro, da região norte do Estado do Paraná**. 2000. 87 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil. 2000.

SAWADA, M.; PARK, C.H.; KONDO, H.; MORITA, T.; SHIMADA, A.; YAMANE, I.; UMEMURA, T. Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 60, n. 7, p. 253-254, 1998.

SCHARES, G.; PETERS, M.; WURM, R.; BÄRWALD, A.; CONRATHS, F.J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. **Vet. Parasitol.**, v. 80, n. 2, p. 87-98, 1998.

SCHEIN, F.B.; M.D. SANTOS; SIQUEIRA, A.A.F.; MOSQUETTE, R.; FREITAS, S.H.; CASTRO, R.S.; SIMÕES, R.S.; CAMARGO, L.M. Prevalência de brucelose em bovinos de leite e fatores de risco associados à transmissão em seres humanos. **Arq. Inst. Biol.**, v. 71, supl., p. 540-542, 2004.

SOUZA, L.M. **Neosporose e toxoplasmose bubalina: estudo da situação sorológica em rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo, Brasil**. 2001. 69 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SOUZA, S.L.P.; GUIMARÃES JÚNIOR, J.S.; FERREIRA, F.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Parana, Brazil. **J. Parasitol.**, v. 88, n. 2, p. 408-409, 2002.

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

THORNTON, R.N. Bovine abortions. **Laboratory Diagnosis**, v. 19, n. 4, p. 24, 1992.

THORNTON, R.N., GAJADHAR, A., EVANS, J. *Neospora* abortion epidemic in a dairy herd. **N. Z. Vet. J.**, v. 42, n. 5, p.190-191, 1994.

THORNTON, R.N.; THOMPSON, E.J.; DUBEY, J.P. *Neospora* abortion in New Zealand cattle. **N. Z. Vet. J.**, v. 39, n. 4, p. 129-133, 1991.

THURMOND, M.C.; HIETALA, S.K. Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. **Am. J. Vet. Res.**, v. 57, n. 11, p. 1559-1562, 1996.

TRANAS, J.; HEINZEN, R.A.; WEISS, L.M. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 6, n. 5, p. 765-767, 1999.

TREES, A.J.; GUY, F.; TENNANT, B.J.; BALFOUR, A.H.; DUBEY, J.P. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in a population of urban dogs in England. **Vet. Rec.**, v. 132, n. 6, p. 125-126, 1993.

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. **Vet. Rec.**, v. 134, n. 16, p. 405-407, 1994.

UGGLA, A.; DUBEY, J.P.; LUNDMARK, G.; OLSON, P. Encephalomyelitis and myositis in a Boxer puppy due to a *Neospora*-like infection. **Vet. Parasitol.**, v. 32, n. 2-3, p. 255-260, 1989.

WOUDA, W.; DIJKSTRA, T.; KRAMER, A.M.; MAANEN, C. V.; BRINKHOF, J.M. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, n. 10, p. 1677-1682, 1999.

WOUDA, W.; DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. **J. Parasitol.**, v. 83, n. 3, p. 545-547, 1997.

WREN, G. Abortion in cattle: BVDV and *Neospora*. **Bovine Veterinarian.**, v. 1, p. 12-17, 1999.

YAI, L.E.O.; CAÑÓN FRANCO, W.A.; GERARDI, V.C.; SUMMA, M.E.L.; CAMARGO, M.C.G.O.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) from the city of São Paulo, Brazil. **J. Parasitol.**, v. 89, n. 4, p. 870-871, 2003.

YAI, L.E.O.; CAÑÓN FRANCO, W.A.; TIEMANN, J.C.H.; DUBEY, J.P.; DUARTE, J.M.B.; SOUZA, S.L.P.; GERARDI, V.C.; SOUZA, C.E.; FARIAS, N.A.R.; RUAS, J.D.; GENNARI, S.M. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em animais silvestres brasileiros. In: FÓRUM BRASILEIRO DE ESTUDOS SOBRE *NEOSPORA CANINUM*, 1., 2005, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2005. p. 23-25.

YAMANE, I.; THOMFORD, J.W.; GARDNER, I.A.; DUBEY, J.P.; LEVY, M.; CONRAD, P.A. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Babesia gibsoni* infections in dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v. 54, n. 10, p. 1579-1584, 1993.