

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

ABORTO BOVINO POR *Neospora caninum*: FATORES ASSOCIADOS AO
RESULTADO POSITIVO DA IMUNOISTOQUÍMICA

CAROLINE ARGENTA PESCADOR

PORTO ALEGRE

2005

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

ABORTO BOVINO POR *Neospora caninum*: FATORES ASSOCIADOS AO
RESULTADO POSITIVO DA IMUNOISTOQUÍMICA

CAROLINE ARGENTA PESCADOR

Dissertação apresentada como
requisito para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Veterinárias na
área de concentração em Patologia
Veterinária, da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul (RS).
Orientador: Dr. David Driemeier

PORTO ALEGRE
2005

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, por ter me dado saúde, e uma família a qual esta sempre presente para me ajudar e apoiar. Aos meus pais Ivete Terezinha Argenta Pescador e Clóvis Alberto Pescador (in memórian), pelo tremendo esforço e dedicação na busca de fornecer estudo de qualidade para suas duas filhas.

Agradeço, a tia Vera Pescador, por ter me acolhido nestes dois anos em sua casa, fornecendo assim condições para que eu pudesse continuar os meus estudos.

Agradeço, ao meu orientador e amigo, David Driemeier, pessoa que me acolheu e forneceu a oportunidade de acompanhar e aprender cada vez mais com a sua experiência de vida e profissão sobre Patologia Veterinária. Um agradecimento em especial ao amigo e colega de profissão Luís Gustavo Corbellini, pela sua amizade, respeito, confiança e principalmente pela oportunidade de aprendizado a qual foi-me proporcionada durante toda a realização deste trabalho. Ao colega Anderson Seitz, o meu muito obrigado, pela ajuda e tempo dispensado na confecção das imagens deste trabalho.

As técnicas do laboratório de histopatologia Marília e Ângela, aos estagiários, mestrandos e doutorandos, o meu muito obrigado, pela ajuda na elaboração deste trabalho. Enfim, agradeço a todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para a minha formação e realização desta dissertação.

SUMÁRIO

<u>LISTA DE TABELAS</u>	5
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	6
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	6
<u>RESUMO</u>	8
<u>ABSTRACT</u>	9
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	10
<u>2.1 Histórico</u>	13
<u>2.2. Neospora caninum</u>	16
<u>2.2.1. Classificação, características estruturais e antigênicas</u>	16
<u>2.2.2. Ciclo de Vida</u>	21
<u>2.2.3. Patogênese da infecção</u>	24
<u>2.3. Neosporose bovina</u>	32
<u>2.4. Neosporose em outras espécies animais</u>	35
<u>2.4.1. Caninos</u>	35
<u>2.4.2. Búfalos D'água (Bubalus bubalis)</u>	36
<u>2.4.3. Ovinos</u>	37
<u>2.4.4. Caprinos</u>	37
<u>2.4.5. Equinos</u>	38
<u>2.4.6. Animais selvagens</u>	38
<u>3. Material e Métodos</u>	41
<u>3.1- Procedimentos de necropsia</u>	41
<u>3.2- Análise histológica e seleção de casos</u>	41
<u>3.3- Imunoistoquímica</u>	42
<u>3.4- Análise Estatística</u>	43
<u>4. Resultados</u>	44
<u>4.1- Achados macroscópicos</u>	44
<u>4.2- Achados microscópicos</u>	44
<u>4.3- Achados imunoistoquímicos</u>	51
<u>4.4- Análise Estatística</u>	55
<u>5. DISCUSSÃO</u>	57
<u>6. CONCLUSÕES</u>	61
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	62

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1. Eventos históricos sobre o estudo de <i>Neospora caninum</i>.</u>	14
<u>Tabela 2. Isolamento de <i>Neospora caninum</i> em fetos e terneiros congenitamente infectados.</u>	15
<u>Tabela 3. Características filogenéticas dos gêneros <i>Neospora</i>, <i>Hammondia</i> e <i>Toxoplasma</i>.</u>	19
<u>Tabela 4. Relação de hospedeiros definitivos e intermediários de <i>Neospora caninum</i>.</u>	23
<u>Tabela 5. Diagnóstico de <i>Neospora caninum</i> associado ao aborto em bovinos.</u>	32
<u>Tabela 6. Isolamentos descritos de <i>Neospora caninum</i> em cães.</u>	36
<u>Tabela 7. Soroprevalência de anticorpos <i>Neospora caninum</i> em Búfalos D'água (<i>Bubalus bulalis</i>).</u>	36
<u>Tabela 8. Soroprevalência de anticorpos de <i>Neospora caninum</i> em eqüinos.</u>	38
<u>Tabela 9. Soroprevalência de anticorpos de <i>N. caninum</i> em animais silvestres.</u>	40
<u>Tabela 10. Frequência de lesões sugestivas de infecção por protozoário encontradas em cada órgão analisado dos fetos bovinos abortados enviados ao SPV da UFRGS.</u>	44
<u>Tabela 11. Análise histológica de cortes de tecidos corados pela HE em 72 fetos bovinos abortados com lesões sugestivas de protozoário.</u>	46
<u>Tabela 12. Frequência de <i>Neospora caninum</i> observados por órgão através do teste imunistoquímico realizado nos 72 fetos que apresentavam lesões sugestivas de protozoária</u>	51
<u>Tabela 13. Frequência das lesões encontradas nos órgãos positivos na imunistoquímica para <i>Neospora caninum</i>.</u>	51

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ciclo de vida *N. caninum*. 22
- Figura 2. A. *N. caninum* invade as células do útero grávido. B. Protozoário causa lesão na placenta. C. O parasita entra na corrente sanguínea possuindo predileção pelo SNC. D. Secção transversal do córtex cerebral sobre corpo estriado de um feto bovino abortado. E. Cérebro de um feto bovino jovem infectado naturalmente por *N. caninum*, apresentando pouca reação inflamatória e um taquizoíto no interior da lesão, corado pela técnica e imunoistoquímica. F. Cérebro de um feto bovino abortado em idade gestacional avançada, infectado naturalmente por *N. caninum* observando-se um foco central de necrose (n), circundado por reação inflamatória mononuclear (i). No centro a presença de vários taquizoítos, corados em marron pela técnica de imunoistoquímica. 27
- Figura 3. Resposta imune maternal desenvolvida durante a infecção por *N. caninum*.. 28
- Figura 4. (A) Feto bovino abortado, macho, 6 meses de idade gestacional apresentando alterações autolíticas caracterizadas por edema de tecido subcutâneo e embebição pela hemoglobina. As alterações macroscópicas mais significativas observadas foram líquido serosanguinolento na cavidade torácica e abdominal (B,C). 45
- Figura 5. Cérebro de feto bovino abortado apresentando consistência líquida (A), semi-líquida (B,C). Fragmentos de cérebro em processo de fixação em formalina tamponada a 10% para análise histopatológica (D). 46
- Figura 6. Infecção por *Neospora caninum*. Feto bovino abortado. Músculo esquelético. Miosite não-supurativa multifocal. HE, obj.20. 47
- Figura 7. Infecção por *Neospora caninum*. Feto bovino abortado. Coração. Miocardite não-supurativa focal. HE, obj 40. 47
- Figura 8. Infecção por *Neospora caninum*. Feto bovino abortado. Pericárdio. Pericardite não-supurativa difusa acentuada. HE, obj 10. 48
- Figura 9. Infecção por *Neospora caninum*. Feto bovino abortado. Pulmão. Pneumonia intersticial mononuclear e foco de necrose (detalhe). HE, obj. 20 49
- Figura 10. Lesões sugestivas de *Neospora caninum* no cérebro de fetos bovinos abortados (A,B,C). Em A, observa-se à presença de encefalite necrosante não-supurativa acentuada, de fácil visualização. HE, obj. 40. Em alguns casos, pequenos focos inflamatórios eram compostos basicamente por células mononucleares e células da glia (B). HE, obj. 20. Em C, observa-se encefalite necrosante não-supurativa focal leve. HE, obj.20. 50
- Figura 11. Infecção por *Neospora caninum*. Fígado de feto bovino abortado. Imunoistoquímica. Presença de taquizoítos de coloração amarronzada no interior de foco de necrose. Avidina-biotina, obj.40. 52
- Figura 12. Infecção por *Neospora caninum*. Músculo esquelético de feto bovino abortado. Imunoistoquímica. Observa-se grupo de taquizoítos corados em marron entre as fibras musculares esqueléticas. Avidina biotina, obj 40. 53
- Figura 13. Infecção por *Neospora caninum*. Cérebro de fetos bovinos abortados. Imunoistoquímica. Taquizoítos marcados positivamente pelo anticorpo policlonal anti-*N. caninum* (A,B,C) podem ser observados. Em A, observam-se taquizoítos ao redor de pouca reação inflamatória, obj. 20. Em B, grupo de taquizoítos estão

<u>presentes sem reação inflamatória, obj. 20 e em C, há somente um taquizoíto no interior do foco de gliose, obj. 40. Avidina biotina.</u>	54
<u>Figura 14 Relação número de fetos positivos e negativos na imunistoquímica para <i>Neospora caninum</i> em relação à idade.</u>	55

RESUMO

Um total de 237 fetos bovinos abortados foram enviados ao Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul entre junho de 1999 e maio de 2004. Tecidos destes fetos foram analisados através da histologia e imunoistoquímica (IHQ) anti-*Neospora caninum*. Destes, 72 apresentaram lesões histológicas sugestivas de infecção por protozoário, caracterizadas pela presença de miosite não-supurativa, miocardite não-supurativa, pneumonia intersticial mononuclear associada a focos de necrose e encefalite necrosante não-supurativa multifocal. O cérebro apresentava consistência líquida ou semi-líquida em 61,1% dos fetos, dificultando a obtenção de tecido para a análise histológica e IHQ. A IHQ revelou a presença de taquizoítos e raros cistos de *N. caninum* no cérebro de 33/47 (70,2%) dos fetos que apresentam lesões histológicas sugestivas de infecção por protozoário.

No modelo final da análise multivariada, três variáveis estiveram associadas significativamente com resultado positivo na IHQ nos fetos abortados: consistência do cérebro ($P=0,031$), lesão no cérebro ($P=0,028$) e idade ($P=0,189$). As chances de um resultado positivo na IHQ de *N. caninum* foram 4,35 vezes maiores (OR=4,35; 95% CI:1,1320-2,8116) quando o feto apresentava cérebro com consistência considerada normal e 4,94 vezes maiores (OR=4,94; 95%CI: 0,1646-3,0313) na presença de lesão sugestiva de infecção por protozoário caracterizada por encefalite de intensidade variada. A probabilidade de resultado positivo na IHQ foi inversamente proporcional à idade fetal, cada mês adicional de gestação diminuíram as chances de um feto apresentar resultado positivo na imunoistoquímica por 0,41 (OR=0,41, 95%CI: 1,5982-0,1436).

ABSTRACT

The tissues from 237 aborted bovine fetuses submitted to the faculty of veterinary medicine, universidade federal do rio grande do sul, between june 1999 and may 2004, were examined by histopathology and ihc. Lesions suggestive of protozoal infection were observed in 72 aborted fetuses, characterized primary by nonsuppurative myositis, nonsuppurative myocarditis, nonsuppurative pneumonia associated with focal cellular necrosis and multifocal necrotizing nonsuppurative encephalitis. Fetal brains presented liquid or semi-liquid consistency in 61.1% of the fetuses examined, making it difficult to obtain enough area for an appropriate histopathological analysis. Ihc examination of the brain revealed tachyzoites and few cysts of neospora caninum in 33 out of 47 (70.2%) fetuses with lesions suggestive of protozoal infection.

Three variables were significantly associated with the probability of positive results in the ihc for n. Caninum: brain consistency ($p=0.031$), presence of lesion in the brain ($p=0.028$) and fetal age (0.018). The chance of positive results was inverse to fetal age ($or=0.41$). There were increasing odds for positivity in the ihc according to the presence lesion in the brain ($or=4.94$) and brain consistency ($or=4.35$). These results suggest that the brain is the most suitable organ for ihc and that the fetal age could be related to the amount of parasite found in tissues of younger fetuses.

1. INTRODUÇÃO

Aborto refere-se à expulsão de um feto vivo ou morto do útero entre 42 dias até aproximadamente 280 dias, quando incapaz de exercer uma vida independente em um ambiente extra-uterino (HUBBERT et al., 1971). Relatos de abortos são freqüentes no Rio Grande do Sul e contribuem para os baixos índices de prenhez e nascimentos verificados na região (FERNANDES, 1998). Somente 30% a 40% dos fetos bovinos abortados apresentam diagnóstico etiológico definitivo em virtude das múltiplas causas envolvidas (KIRKBRIDE, 1990). Além disso, a expulsão dos fetos pode ocorrer algum tempo depois da morte fetal, resultando em autólise, dificultando a identificação e isolamento do agente etiológico (FERNANDES, 1998). Estudos baseados em diagnósticos etiológicos realizados em fetos bovinos abortados revelam que a maioria dos casos, com causa determinada, é devida a agentes infecciosos (ANDERSON et al., 1990; KIRKBRIDE, 1992).

A obtenção do sucesso no diagnóstico de aborto depende de alguns fatores. O envio de fetos abortados, juntamente com a placenta, a realização de necropsia, incluindo coleta adequada de materiais e a execução de exames histopatológicos, microbiológicos, imunoistoquímicos, sorológicos e micológicos, compõem uma assistência significativa no diagnóstico de causas de aborto (KIRKBRIDE, 1990).

Em 1991, *Neospora caninum*, um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa semelhante a *Toxoplasma gondii*, foi identificado como o agente causador de aborto em bovinos (ANDERSON et al., 2000). Este protozoário pertence à família Sarcocistidae que compreende aproximadamente 200 espécies de coccídios heteroxenos que formam cistos em hospedeiros intermediários (MUGRIDGE et al., 1999). *N. caninum* foi identificado pela primeira vez em cães com encefalomielite, sendo antes desta data confundido com *T. gondii* (DUBEY et al., 1988a). Taquizoítos, cistos contendo bradizoítos e oocistos são os estágios infectantes deste parasito (DUBEY, 2003). Os cães são considerados os hospedeiros definitivos (completos) e eliminam oocistos nas fezes, contaminando o ambiente (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999a, 1999b).

Bovinos, caprinos, ovinos, eqüinos, e cervídeos são os hospedeiros intermediários e infectam-se através da ingestão de oocistos (DUBEY & LINDSAY, 1996a; DUBEY, 2003).

N. caninum é um importante agente etiológico de aborto em bovinos em grande parte do mundo (DUBEY & LINDSAY, 1996a; WOUDA et al., 1997a; PARÉ et al., 1998) e é considerado a principal causa de aborto em bovinos de leite na Califórnia (ANDERSON et al., 1991). A transmissão transplacentária foi induzida em cães, gatos, ovinos e bovinos (DUBEY, 2003).

No Brasil há poucos relatos de diagnóstico de infecção por *N. caninum* em fetos bovinos abortados (GONDIM et al., 1999b; CORBELLINI et al., 2000) e, geralmente, informações limitadas estão disponíveis sobre neosporose bovina na América do Sul. Estudos realizados no Estado do Rio Grande do Sul em trinta fetos bovinos abortados entre os anos 1995 até o primeiro trimestre do ano de 1999, 10% estavam infectados por *N. caninum*, indicando que causas e fatores predisponentes da infecção devem ser melhor avaliadas para que medidas de controle possam ser tomadas (CORBELLINI et al., 2000). Outro trabalho realizado em 2002 apontou uma prevalência de 39,1%, sugerindo que a infecção por *N. caninum* está difundida no Estado (CORBELLINI et al., 2002). Um estudo soropidemiológico realizado em vacas leiteiras no Estado da Bahia apontou uma soroprevalência de 14,9% para *N. caninum* (GONDIM et al., 1999a).

O diagnóstico presuntivo de neosporose bovina é baseado em alterações histopatológicas no sistema nervoso central (SNC), que são caracterizadas por gliose e encefalite multifocal associado a infiltrados inflamatórios em vários outros órgãos incluindo músculo esquelético, coração, fígado, pulmão, rim e placenta (ANDERSON et al., 1991; BARR et al., 1990; NIETFIELD et al., 1992; OTTER, et al., 1995; DUBEY & LINDSAY, 1996a; WOUDA et al., 1997a; MORALES et al., 2001). Gliose é mais comum em fetos abortados no terceiro trimestre de gestação (DUBEY & LINDSAY, 1996a), e as lesões no SNC geralmente são menos proeminentes em fetos de idade mais avançada (WOUDA et al., 1997a). Em 76% dos casos, havia encefalite não-supurativa associada a focos de necrose multifocal (BOULTON et al., 1995). Lesões hepáticas, quando presentes, consistem em infiltrado de células mononucleares periportal associado a focos de necrose (BARR et al., 1990., WOUDA, 1997a). *N. caninum* foi várias vezes observado em fragmentos de SNC e coração, sendo raramente identificado em outros órgãos, incluindo placenta (DUBEY & LINDSAY, 1996a). Wouda et al (1997a), observaram através da realização de imunistoquímica em fetos bovinos abortados, a presença de *N. caninum* em 85%, 14% e 26% dos cortes de cérebro, coração e fígado, respectivamente.

Entretanto, no estudo que vem sendo realizado no Setor de Patologia Veterinária/UFRGS, grande parte SNC dos fetos bovinos enviados para análise apresentou uma consistência semi-líquida, dificultando a obtenção de fragmentos de cérebro para a análise. Adicionalmente, lesões histológicas sugestivas de infecção por protozoário, caracterizadas por infiltrados inflamatórios não-supurativos vêm sendo constantemente observadas em fragmentos de músculo esquelético, coração, pulmão, fígado e rim dos fetos bovinos abortados. Isto gerou a necessidade de avaliar metodologias de diagnóstico patológico na tentativa de observar lesões distintas em outros órgãos que auxiliassem no diagnóstico presuntivo de neosporose na ausência do SNC. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi verificar os fatores associados ao resultado positivo para *N. caninum* na imunoistiquímica e avaliar a frequência e características das lesões sugestivas de infecção por protozoário em diversos tecidos de fetos bovinos abortados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

Na Noruega, no ano de 1984, um protozoário semelhante ao *Toxoplasma gondii* foi apontado como causador de uma doença neurológica em seis cães. Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* não foram detectados nos casos examinados (BJERKAS et al.; 1984).

Em 1988, Dubey et al, realizaram um estudo usando técnicas imunológicas em fragmentos de tecidos de cães com diagnóstico de toxoplasmose no Hospital de Clínicas Veterinárias dos Estados Unidos entre os anos de 1948 e 1987. Em 10 cães anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* não foram detectados (DUBEY et al., 1988a). Baseado nas características que o diferenciava de *T. gondii* e das demais espécies de protozoários formadores de cistos pertencentes ao filo Apicomplexa, esse parasita protozoário foi denominado *Neospora caninum* (DUBEY et al., 1988a).

Após a descrição do parasita em 1988 (DUBEY et al., 1988a), mais de 500 artigos já foram publicados sobre o assunto (DUBEY et al., 2002a). Os eventos históricos estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1. Eventos históricos sobre o estudo de *Neospora caninum*.

Ano	Contribuição	Referência
1984	Protozoário semelhante a <i>Toxoplasma gondii</i> foi apontado como causador de doença neurológica em cães na Noruega.	BJERKAS et al., 1984
1988	Um novo gênero <i>Neospora</i> e o tipo da espécie <i>N. caninum</i> foi proposto como agente causador de doença neurológica em cães nos EUA.	DUBEY et al., 1988a
1988	<i>N. caninum</i> foi isolado em cultivo celular a partir de cães naturalmente infectados.	DUBEY et al., 1988b
1988	Desenvolvimento do teste de imunofluorescência direta para detecção de <i>N. caninum</i>	DUBEY et al., 1988b
1989	Desenvolvimento do teste de imunistoquímica através da utilização de anticorpos policlonais produzidos em coelho.	LINDSAY & DUBEY, 1989a
1989	Desenvolvimento de drogas anti-coccídicas para inibir o desenvolvimento de <i>N. caninum</i> em células de cultura	LINDSAY & DUBEY, 1989b
1989	<i>N. caninum</i> é identificado como causador de aborto em bovinos em uma propriedade leiteira no Novo México.	THILSTED & DUBEY, 1989
1991	<i>N. caninum</i> é apontado como o principal causador de abortos na Califórnia.	ANDERSON et al., 1991
1993	Primeiro relato de isolamento de <i>N. caninum</i> em fetos bovinos abortados	CONRAD et al., 1993
1994	Desenvolvimento da técnica de ELISA para diagnóstico sorológico de neosporose canina e bovina	BJORKMAN et al., 1994
1995	Detecção de anticorpos contra <i>N. caninum</i> a partir do soro fetal de fetos bovinos abortados da Califórnia	PARÉ et al., 1995a
1995	Primeira revelação do DNA de <i>N. caninum</i> através da técnica de PCR	BARR et al., 1995
1996	Detecção de DNA de <i>N. caninum</i> em fragmentos de cérebro e pulmão.	PAYNE et al., 1996
1996	<i>Neospora</i> sp foi isolado do SNC de um equino adulto com sinais neurológicos.	LALLY et al., 1996 HOLMDAHL & MATTSON, 1996
1996	Uma nova espécie (<i>Neospora hughesi</i>) foi acrescentada ao gênero <i>Neospora</i> spp.	MARSH et al., 1996
1998	Cães são definidos como os hospedeiros definitivos de <i>N. caninum</i> .	MARSH et al., 1998
1998	Realização do teste de aglutinação direta para o diagnóstico sorológico de <i>N. caninum</i>	MCALLISTER et al., 1998
1998	Realização do teste de aglutinação direta para o diagnóstico sorológico de <i>N. caninum</i>	ROMAND et al., 1998
2002	DNA de <i>N. caninum</i> detectado no sangue de vacas após a inoculação via oral de oocistos de <i>N. caninum</i> .	O'HANDLEY et al., 2002
2004	Coiotes (<i>Canis latrans</i>) são considerados os segundos hospedeiros definitivos de <i>N. caninum</i> , após os cães.	GONDIM et al., 2004

Após o primeiro relato de isolamento de *N. caninum* em fetos bovinos abortados em 1993 (CONRAD et al., 1993), pesquisadores em vários países passaram a isolar *N. caninum* a partir de fetos bovinos abortados e de fragmentos de SNC de bezerros a termo congenitamente infectados (DUBEY et al., 2003). Os isolamentos estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2. Isolamento de *Neospora caninum* em fetos e terneiros congenitamente infectados.

País	Cepa	Origem	Referência
EUA	NC-Illinois	Terneiro com sinais clínicos	GONDIM et al., 2002
Itália	NC-PVI	Terneiro com 45 dias de idade	MAGNINO et al., 1999
Itália	NC-PGI	Terneiro com 8 meses de idade	FIORETTI et al., 2000
Japão	JPA-1	Terneiro com sinais clínicos	YAMANE et al., 1997
Portugal	NC- Porto 1	Feto	CANADA et al., 2002

A infecção por *N. caninum* é relatada em várias partes do mundo, incluindo Austrália, Nova Zelândia, Europa, Korea, Japão, Tailândia e nas Américas (DUBEY, 2003). Aborto e mortalidade neonatal em bovinos associados à infecção por *N. caninum* são descritos na Argentina, Austrália, Bélgica, Brasil, Canadá, Costa Rica, França, Alemanha, Hungria, Irlanda, Israel, Itália, Japão, Korea, México, Polônia, Portugal e Espanha entre outros (DUBEY, 2003). Estudos quantitativos realizados nos EUA indicam que Nova Zelândia, Holanda e Alemanha apresentam cerca de 12% a 42% de abortos em bovinos leiteiros causados por *N. caninum* (DUBEY, 2003).

2.2. *Neospora caninum*

2.2.1. Classificação, características estruturais e antigênicas

N. caninum pertence à família Sarcocystidae que compreende aproximadamente 200 espécies de coccídios heteroxenos que formam cistos em hospedeiros intermediários (MUGRIDGE et al., 1999). Baseado em características fenotípicas a família é, também, subdividida em duas subfamílias, a Sarcocystinae e a Toxoplasmatinae. Tradicionalmente, a maioria destas espécies (mais de 180) tem sido classificada na família Sarcocystinae, sendo subdividida em 2 gêneros: *Sarcocystis* e *Frenkelia* (MUGRIDGE et al., 1999). Em contraste, poucas espécies têm sido classificadas dentro da subfamília Toxoplasmatinae, sendo localizadas em quatro diferentes gêneros: *Toxoplasma* (1 espécie); *Hammondia* (2 espécies); *Neospora* (2 espécies) e *Besnoitia* (6 espécies) (CURRENT et al., 1990; FRENKEL et al., 1987; DUBEY et al., 1988a).

Grande parte das descrições genéricas da subfamília Toxoplasmatinae está baseada somente nas características fenotípicas, ou seja, hospedeiro, ciclo de vida, modo de transmissão, tipo de célula infectada, morfologia e localização dos cistos (MUGRIDGE et al., 1999). Com o objetivo de melhorar o sistema de classificação, criou-se uma análise filogenética molecular (MUGRIDGE et al., 1999).

Estudos morfológicos têm demonstrado que *N. caninum* possui estruturas típicas de coccídios da família Sarcocistidae, filo Apicomplexa, como o complexo apical, anel polar e conóide (DUBEY et al., 1988a; ELLIS et al., 1994; JARDINE et al., 1996; SPEER et al., 1999).

Trabalhos comparativos ultraestruturais realizados a partir de microscopia eletrônica apontam significativas diferenças entre a estrutura dos taquizoítos, bradizoítos e cistos de *N. caninum* e *T. gondii* (tabela 3) (SPEER et al., 1999; DUBEY & LINDSAY., 1996a; MUGRIDGE et al., 1999).

Uma comparação seqüencial de análises realizadas a partir do DNA ribossomal de *N. caninum* apontam diferenças seqüenciais de 4 nucleotídeos entre *T. gondii* e *N. caninum*, indicando que ambos são espécies distintas (MARSH et al., 1995).

Várias características morfológicas e biológicas a partir da análise seqüencial de genes da subunidade do RNA do ribossomo (1srRNA) sugerem que *N. caninum* é mais próximo de *H. heydorni* que *T. gondii* (MUGRIDGE et al., 1999).

T. gondii, *N. caninum*, *H. hammondi* e *H. heydorni*, são parasitas coccídios que apresentam similariedade no tamanho de oocistos (DUBEY et al., 1993). Gatos (felinos) são os hospedeiros definitos de *T. gondii* e *H. hammondi*, e cães (caninos) são os hospedeiros definitos de *N. caninum* e *H. heydorni*. Entretanto, ambas espécies apresentam importantes diferenças biológicas e ultraestruturais (tabela 3). Enquanto *T. gondii* causa infecção disseminada em humanos e animais, e *N. caninum* é considerado um importante agente causador de aborto em bovinos, *H. hammondi* e *H. heydorni* são espécies cuja importância patológica é ainda considerada desconhecida (DUBEY, 2003). Recentemente, Mehlhorn & Heydorn (2000), questionaram a validade do gênero *Hammondia* e *Neospora* e argumentaram que este grupo, somente *T. gondii* e *T. heydorni* eram válidas. Entretanto, Frenkel & Dubey (2000) relataram minuciosamente as diferenças estruturais, biológicas e genéticas entre *T. gondii* e *H. hammondi*.

Recente estudo filogenético baseado na subunidade ribossomal do DNA (ITS-1) sugeriu estreita associação entre *N. caninum* e *H. heydorni* onde ambos necessariamente não apresentam o mesmo grau de parentesco (MUGRIDGE et al., 2001), já previamente sugerido (HILL et al., 2001).

O genoma do DNA de *N. caninum* pode ser diferenciado de *H. heydorni* através da utilização do “primer” Np6/21, tendo como alvo a seqüência genômica Nc5 de *N. caninum* (HILL et al., 2001). Resultados de PCR competitivo têm demonstrado que o DNA de oocistos de *H. heydorni* não foi amplificado, e não interferem com a amplificação do DNA de oocistos de *N. caninum* em amostras usando o específico primer Nc5 (HILL et al., 2001). Estes resultados recentemente foram confirmados por Dijkstra et al (2001) que demonstraram que cães espalhavam oocistos de *N. caninum* nas fezes após receberem como alimentação a placenta de vacas naturalmente infectadas. A identidade dos oocistos de *N. caninum* foi confirmada através da realização de bioensaio em gerbils e por PCR usando “primer” Np6/21 (DIJKSTRA et al., 2001).

Adicionalmente, Guo & Johnson (1995), Spencer et al (2000), amplificaram o DNA de oocistos de *H. heydorni* e *N. caninum* utilizando o primer F6, com o objetivo de diferenciar os parasitas pertencentes ao filo Apicomplexa.

Recentemente, Slapeta et al (2002) descreveram um PCR específico para *H. heydorni* baseado na amplificação da região ITS-1, com o objetivo de identificar os seus oocistos.

As antigas classificações, baseadas somente nas características fenotípicas já estão sofrendo mudanças. Uma nova classificação baseada na análise filogenética molecular tem sido utilizada e vêm demonstrando significativas diferenças entre os parasitas protozoários formadores de cistos pertencentes ao filo Apicomplexa.

Tabela 3. Características filogenéticas dos gêneros *Neospora*, *Hammondia* e *Toxoplasma*.

Características	N. caninum	H. heydorni	H. hammondi	T. gondii
Distribuição geográfica	Mundial	Provavelmente mundial	Provavelmente mundial	Mundial
Tipo de hospedeiro				
Hospedeiro definitivo	Cães	Caninos	Felinos	Felinos
Hospedeiro intermediário	Vários mamíferos	Vários mamíferos	Vários mamíferos	Mamíferos e aves
Ciclo de vida	Heteroxeno obrigatório	Provavelmente Heteroxeno obrigatório	Heteroxeno obrigatório	Heteroxeno facultativo
Tipo desenvolvimento em: Hospedeiro definitivo	?	Endopoligenia Gametogênese	Endopoligenia Gametogênese	Endodiogenia, Endopoliogenia Gametogênese
No ambiente	Esporogônia	Esporogônia	Esporogônia	Esporogônia
Hospedeiro intermediário	Endodiogenia	Endodiogenia	Endodiogenia	Endodiogenia
Rota transmissão natural				
Hospedeiros Definitivos p/ intermediários.	Via oocistos	Via oocistos	Via oocistos	Via oocistos
Hospedeiros Intermediários p/ definitivo	Via cisto em tecido	Via cisto em tecido	Via cisto em tecido	Via cisto em tecido ou taquizoítos
Hospedeiro definitivo p/ definitivo	?	?	Não há transmissão	Via oocistos
Hospedeiro. intermediário p/ intermediário	?	?	Não há transmissão	Via cistos ou taquizoítos
Transmissão vertical em Hospedeiro intermediário	Sim	?	?	Sim

Fonte: **International Journal for Parasitology**, nº10, v. 29, 1999.

Tabela 3 (continuação). Características Filogenéticas dos gêneros *Neospora*, *Hammondia* e *T. gondii*

Características	<i>N. caninum</i>	<i>H. heydorni</i>	<i>H. hammondi</i>	<i>T. gondii</i>
Oocistos	2 esp ^a ., 4 espz ^b .	2 esp., 4 espz.	2 esp., 4 espz.	2 esp., 4 espz.
Tamanho dos oocistos (não esporulado, µm)	10.5-12.5 x 10.5-12	10-14.5 x 9-13	11-13 x 10.5-12.5	11-14x9.5-11
Tamanho dos esporozoítos (µm)	7.5-9.5 x 5.5-6.5	5.5-9.5 x 4.5-6	8-11x 6-7.5	8-9.5 x 5-6.5
Localização dos cistos	SNC	Cérebro	Músculo estriado e cérebro	Vários tecidos
Tamanho dos cistos no SNC (µm)	Até 107	At least 20	Até 25a	Até 50b
Espessura da parede do cisto(µm)	1-4	?	< 0.5	< 0.5
Septa	ausente	ausente	ausente	
Tamanho dos bradizoítos (µm)	6-8 x 1-2	?	4-7 x 2	ausente 7-8 x 1.5
Taquizoítos no hospedeiro natural				
Localização	Vários tipos de células	?	Células linfóides	Vários tipos de células
Tamanho (µm)	3-7 x 1-5	?	?	3.5-7 x 2-4
Vacúolo parasitóforo	ausente ou presente	?	?	presente
Taquizoítos em células de cultura				
Vacúolo parasitóforo	Presente	Presente	Presente	Presente
Tipo de multiplicação	Endodiogenia	Endodiogenia	Endodiogenia	Endodiogenia
Roptrias anteriores ao núcleo	8-18	6-12	Ausente	Ausente
Roptrias posterior ao núcleo	poucas	6-12	Ausente	Ausente
Micromenas anterior ao núcleo	várias (mais de 150)	?	Poucas	Poucas
Micromenas posterior ao núcleo	Poucas	?	Ausente	Ausente
Microporos	Raros	?	Common	Common
Patogenicidade	Sim	?	?	Sim
Maior causa de abortos	Bovinos	?	?	Ovinos e caprinos
Imunidade cruzada	?	?	Com <i>T. gondii</i>	Com <i>H. hammondi</i>

^aesporocistos; ^besporozoítos.

Fonte: **International Journal for Parasitology**, nº10, v. 29, 1999.

2.2.2. Ciclo de Vida

Cães são considerados os hospedeiros intermediários e definitivos de *N. caninum* (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999a, 1999b; BASSO et al., 2001a; DUBEY et al., 2002b), pois ambas as fases assexuada e sexuada do ciclo de vida desse protozoário podem ser completadas no cão (DUBEY et al., 2002b).

O ciclo de vida de *N. caninum* envolve 3 estágios: taquizoítos, cistos e oocistos (DUBEY, 2003). Taquizoítos e cistos são os estágios encontrados no hospedeiro intermediário e ambos ocorrem intracelularmente (DUBEY et al., 2002b). Os cistos apresentam formato oval e podem medir até 107µm de diâmetro e são encontrados em células do SNC de hospedeiros intermediários (DUBEY & LINDSAY, 1996a).

Recentemente, Peters et al (2001a) relatou a presença de cistos de *N. caninum* mensurando cerca de 0,3-1,0 µm de espessura em músculo esquelético de bovinos e caninos infetados naturalmente.

Canídeos domésticos e selvagens são considerados hospedeiros definitivos de *N. caninum* (McALLISTER et al., 1998, 1999; GONDIM et al., 2004), e excretam oocistos não esporulados nas fezes após a ingestão de cistos contendo bradizoítos em tecidos de animais contaminados (hospedeiro intermediário) (McALLISTER et al., 1998; GONDIM et al., 2004). Os hospedeiros intermediários (Tabela 4) se contaminam pela ingestão de oocistos presentes no meio ambiente, liberados das fezes do hospedeiro definitivo (Tabela 4). Quando os oocistos são ingeridos pelos hospedeiros intermediários ocorre à liberação dos esporozoítos no intestino, que penetram nas células e transformam-se em taquizoítos (LINDSAY et al., 1999a). Os taquizoítos penetram em diversas células do hospedeiro, desenvolvendo severas lesões a partir da ruptura das células (BUXTON et al., 2002). Em bovinos a principal forma de disseminação de *N. caninum* em rebanhos leiteiros é a transmissão vertical. Ela ocorre quando os taquizoítos invadem o útero gravídico contaminando o feto, podendo assim manter a infecção por várias gerações (PARÉ et al., 1994; BJORKMAN et al., 1996).

Anticorpos de *N. caninum* tem sido encontrado em coiotes na América do Norte (*Canis latrans*), em raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) na Inglaterra e em dingos (*Canis familiaris dingo*) na Austrália (LINDSAY et al., 1996a; BARBER et al., 1997; BUXTON et al., 1997a). O aumento da população destes animais, principalmente no Canadá e América Central tornou maior a probabilidade de contato com os animais

domésticos, ampliando os riscos de transmissão de *N. caninum* entre coiotes e bovinos (GONDIM et al., 2004).

Uma vez que cervídeos são considerados presas naturais de canídeos selvagens são susceptíveis a infecção por *N. caninum* e as primeiras evidências de infecção nesta espécie (*Odocoileus hemionus columbianus*) ocorreram em 1994 (WOODS et al., 1994). Adicionalmente entre os anos de 1995-1998, 400 amostras de soro de cervídeos de cauda branca (white-tailed deer) foram coletadas no norte de Illinois. Anticorpos acima de 1:40 foram encontrados em 162 cervídeos dos 400 analisados (40,5%), indicando uma alta prevalência de anticorpos contra *N. caninum* no soro destes animais (DUBEY et al., 1999b). A alta prevalência de anticorpos de *N. caninum* em cervídeos sugere a presença de um ciclo silvestre. Cervídeos são herbívoros e, portanto devem participar como hospedeiros intermediários no ciclo silvestre (WOODS et al., 1994). O ciclo de vida de *N. caninum* está representado na Figura 1.

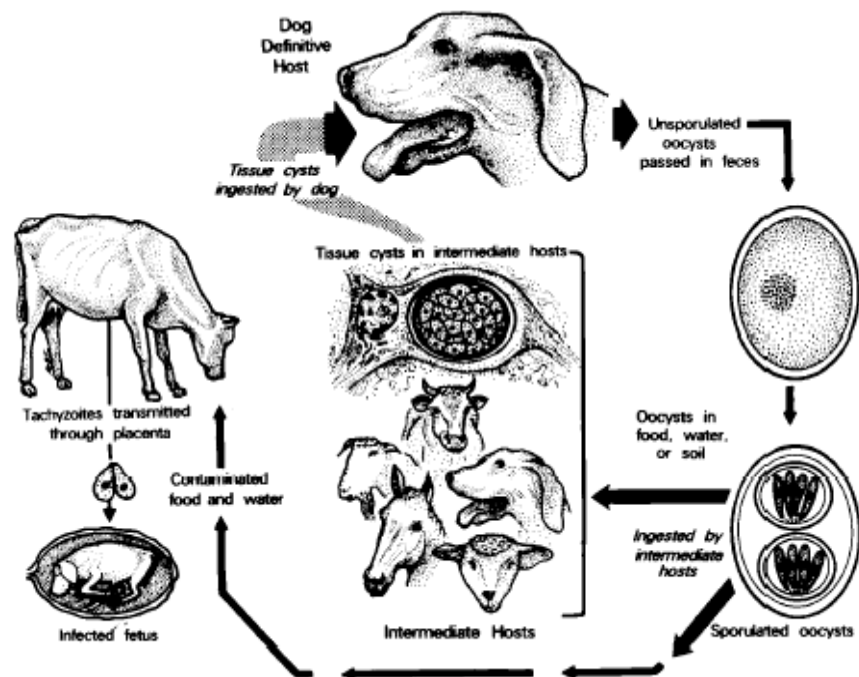


Figura 1. Ciclo de vida *N. caninum*.

Fonte: The Korean Journal of Parasitology, nº1, v.41, 2003.

Tabela 4. Relação de hospedeiros definitivos e intermediários de *Neospora caninum*.

Tipo de hospedeiro	Espécie	Referências
Hospedeiro definitivo	Caninos	MCALLISTER et al., 1998
	Coiotes (<i>Canis latrans</i>)	GONDIM et al., 2004
Hospedeiro intermediário	Caninos	DUBEY et al., 1988a,b; DUBEY & LINDSAY, 1996a
	Bovinos	THILSTED et al., 1989; ANDERSON et al., 1991; BARR et al., 1991.
	Ovinos	DUBEY & LINDSAY, 1996a.
	Caprinos	DUBEY et al., 1992; CORBELLINI et al., 2001.
	Eqüinos	DUBEY & PORTERFIELD, 1990; GRAY et al., 1996; MARSH et al., 1996.
	Gerbils (<i>Meriones unguiculatus</i>)	DUBEY & LINDSAY, 2000; SCHARES et al., 2001.
	Ratos (<i>Psammomys ubesus</i>)	PIPANO et al., 2002.
Cervídeos	WOODS et al., 1994; DUBEY et al., 1999b.	

2.2.3. Patogênese da infecção

A maior fonte de infecção por *N. caninum* em bovinos leiteiros é a transmissão transplacentária, em vacas naturalmente infectadas que passam a infecção para o feto durante a gestação (ALMERIA et al., 2003).

A infecção em bovinos pode ser estabelecida a partir da ingestão de oocistos esporulados. Quando isso ocorre durante a gestação, o parasita invade as células do útero gravido promovendo algumas epidemias de aborto (BUXTON et al., 2002). Toda a infecção fetal ocorre a partir de uma parasitemia materna. Entretanto, a doença também ocorre em bovinos que já abrigaram uma infecção persistente antes do estabelecimento da gestação (BUXTON et al., 2002). Embora a principal manifestação da infecção por *N. caninum* seja o aborto, estudos apontam que taxas de repetição de aborto devido à neosporose são menores que 4% (WOUDA et al., 1998). Acima de 95% dos terneiros podem nascer clinicamente normais, porém soropositivos. Somente uma minoria dos fetos apresenta infecção que leva ao aborto (DAVISON et al., 1999a; BUXTON et al., 2002).

A transmissão de *N. caninum* da mãe para o feto depende de alguns fatores como a escolha de um momento oportuno para a realização da parasitemia durante a gestação, a quantidade e duração da parasitemia, a eficácia da resposta imune materna e a capacidade do feto em montar uma resposta imunológica (INNES et al., 2000). Se a transmissão do parasita ocorre no início da gestação, os efeitos serão sempre mais letais para o feto (BARR et al., 1991, 1994). Estudos de infecção experimental por *N. caninum* em vacas em início de gestação resultaram em morte fetal (WILLIAMS et al., 2000; INNES et al., 2001a). A habilidade da vaca e do feto em montar uma resposta contra a infecção exerce uma importante influência no controle da doença (INNES et al., 2002). Um estudo com o objetivo de examinar a resposta imune local e sistêmica foi realizado em grupos de vacas gestantes infectadas com *N. caninum* a partir de 70, 140 e 210 dias de gestação (INNES et al., 1999). Foram observadas diferenças na magnitude da resposta imune celular e na detecção de anticorpos dependendo do tempo de desafio durante a gestação. Todos os animais que nasceram a partir de vacas infectadas aos 70 dias de gestação nasceram soronegativos para *N. caninum* e não foram constatadas evidências de resposta imune mediada por células (INNES et al., 1999).

Os mecanismos imunológicos mediados por células (CMI) representam um começo e importante papel na redução da multiplicação de *Neospora caninum* dentro do

hospedeiro, reduzindo a parasitemia (ALMERIA et al., 2003). A resposta celular ao *N. caninum* pode ser caracterizada pela indução de células T, sendo mediada pela produção de IL-12 e IFN- γ (KHAN et al., 1997, WILLIAMS et al., 2000). Estas duas citocinas têm sido apontadas como essenciais para garantir a imunidade do hospedeiro contra um número variado de agentes infecciosos, em particular *T. gondii* (KHAN et al. 1997). A produção de citocinas Th-1, tal como IFN- γ e IL-12 têm garantido proteção imunológica contra a infecção por *N. caninum*, inibindo a sua multiplicação intracelular em taquizoítos *in vitro* (INNES et al., 1995; YAMANE et al., 2000) e *in vivo* (KHAN et al., 1997; BASZLER et al., 1999). Entretanto, durante a gestação um considerável nível de imunomodulação pode existir e respostas tal como aquelas induzidas por IFN- γ podem ser potencialmente danosas podendo ocasionar rejeição ou aborto do feto (INNES et al., 2002; ALMERIA et al., 2003).

Em bovinos a gestação dura em média 280 dias e a imunidade fetal desenvolve-se progressivamente (BUXTON et al., 2002). Antes dos 100 dias de gestação, o feto bovino é incapaz de reconhecer e responder contra patógenos, habilitando os organismos tal como o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e *N. caninum* a produzirem uma infecção fatal (MALEY et al., 2003). Após os 150 dias de gestação, o feto já é maturo e, portanto consegue reconhecer e responder contra a infecção. A partir do terceiro trimestre de infecção por *N. caninum* é provável o não-reconhecimento da doença clínica (MALEY et al., 2003).

Quando *N. caninum* invade as células do útero gravido (Figura 2), ele se multiplica e causa uma destruição focal de ambos tecidos materno e fetal. Adicionalmente, a interface materno-fetal inicia uma resposta inflamatória (BUXTON et al., 2002). Ao mesmo tempo em que é estabelecida uma lesão placentária, associada com inflamação materno-fetal, o parasita entra via corrente sangüínea e invade outros tecidos, possuindo predileção pelo SNC. Aqui o parasita se localiza inicialmente ao redor dos vasos sangüíneos e em fetos jovens inicia uma incontrolável multiplicação, muitas vezes podendo ser letal, causando destruição do neurópilo com pouca reação inflamatória (BUXTON 2002). Os fetos mais velhos apresentam uma capacidade melhor de responder contra o parasita, sendo a sua multiplicação mais restrita. As áreas de necrose ficam confinadas em pequenos focos, circundadas por intensa resposta inflamatória. Além do SNC, órgãos como coração, músculo esquelético, pulmão e fígado podem apresentar diversos graus de reação inflamatória (BUXTON et al., 2002).

Mães cronicamente infectadas (Figura 3), no terço inicial da gestação apresentam uma resposta imunológica mediada através da produção de células Th-1. Esta citocina garante imunidade celular, podendo resultar na produção de citocinas pró-inflamatórias tal como: gamma interferon (IFN- γ), interleucina 12 (IL-12) e INF- α que, geralmente, estão ausentes ou presentes em baixas concentrações na placenta podendo ser obtida em resposta a uma infecção (QUINN et al., 2002; MALEY et al., 2003). Este processo permite o controle da infecção do protozoário, mas pode ser nociva para a sobrevivência do feto, devido, a produção de óxido nítrico, que é extremamente danoso para o parasita, mas que também pode matar o feto (QUINN et al., 2002). Com o avançar da gestação (150 dias) há um aumento na produção de progesterona, havendo assim, uma produção de Th-2, responsável pela imunidade humoral (QUINN et al., 2002). Comitadamente, interleucinas como IL-4, IL-5 e IL-10 são produzidas, garantindo o desenvolvimento do feto (QUINN et al., 2002). Entretanto, estas citocinas não são adequadas para o controle da infecção parasitária, levando, por conseguinte uma grande carga parasitária para a mãe, aumentando o risco de uma transmissão congênita (QUINN et al., 2002). A IL-10 suprime a produção de IFN- γ , diminuindo a capacidade da mãe de controlar a multiplicação por *N. caninum* durante a gestação (INNES et al., 2000).

Portanto, se a infecção ocorre no primeiro trimestre de gestação, quando os níveis hormonais de progesterona são baixos e consecutivamente há uma baixa produção de Th-2, o risco de aborto é relativamente alto, entretanto a transmissão do parasita para o feto é baixa. Em contraste se a infecção ocorre durante o terceiro trimestre de gestação, quando há um aumento de Th-2, o risco de aborto é relativamente baixo, enquanto que a transmissão congênita é relativamente alta (QUINN et al., 2002).

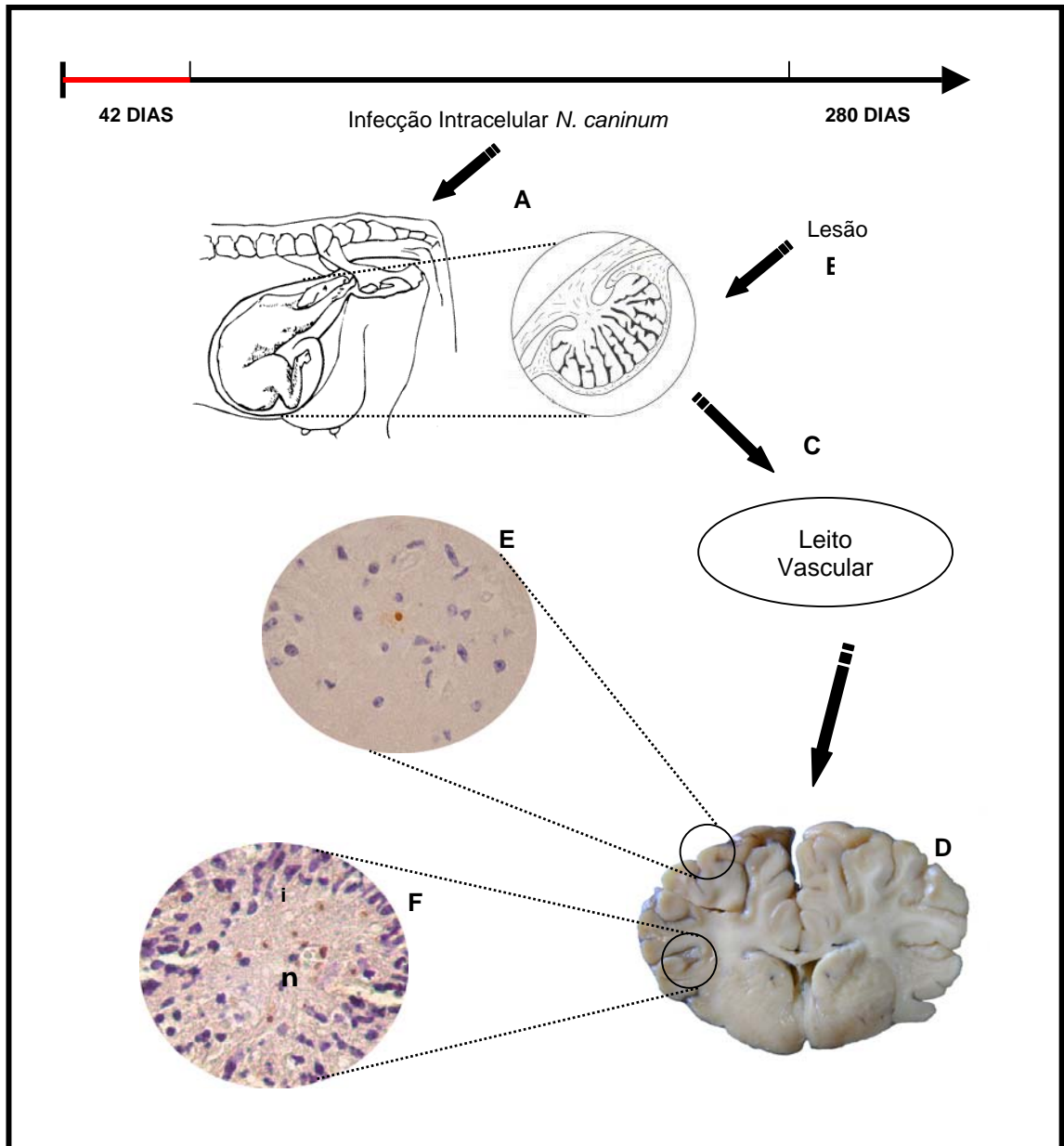


Figura 2. **A.** *N. caninum* invade as células do útero grávido. **B.** Protozoário causa lesão na placenta. **C.** O parasita entra na corrente sanguínea possuindo predileção pelo SNC. **D.** Secção transversal do córtex cerebral sobre corpo estriado de um feto bovino abortado. **E.** Cérebro de um feto bovino jovem infectado naturalmente por *N. caninum*, apresentando pouca reação inflamatória e um taquizoíto no interior da lesão, corado pela técnica e imunoistoquímica. **F.** Cérebro de um feto bovino abortado em idade gestacional avançada, infectado naturalmente por *N. caninum* observando-se um foco central de necrose (n), circundado por reação inflamatória mononuclear (i). No centro a presença de vários taquizoítos, corados em marron pela técnica de imunoistoquímica.

Adaptado de BUXTON et al.,2002. Fonte: **Trends in Parasitology**, nº12 v. 41,2002.

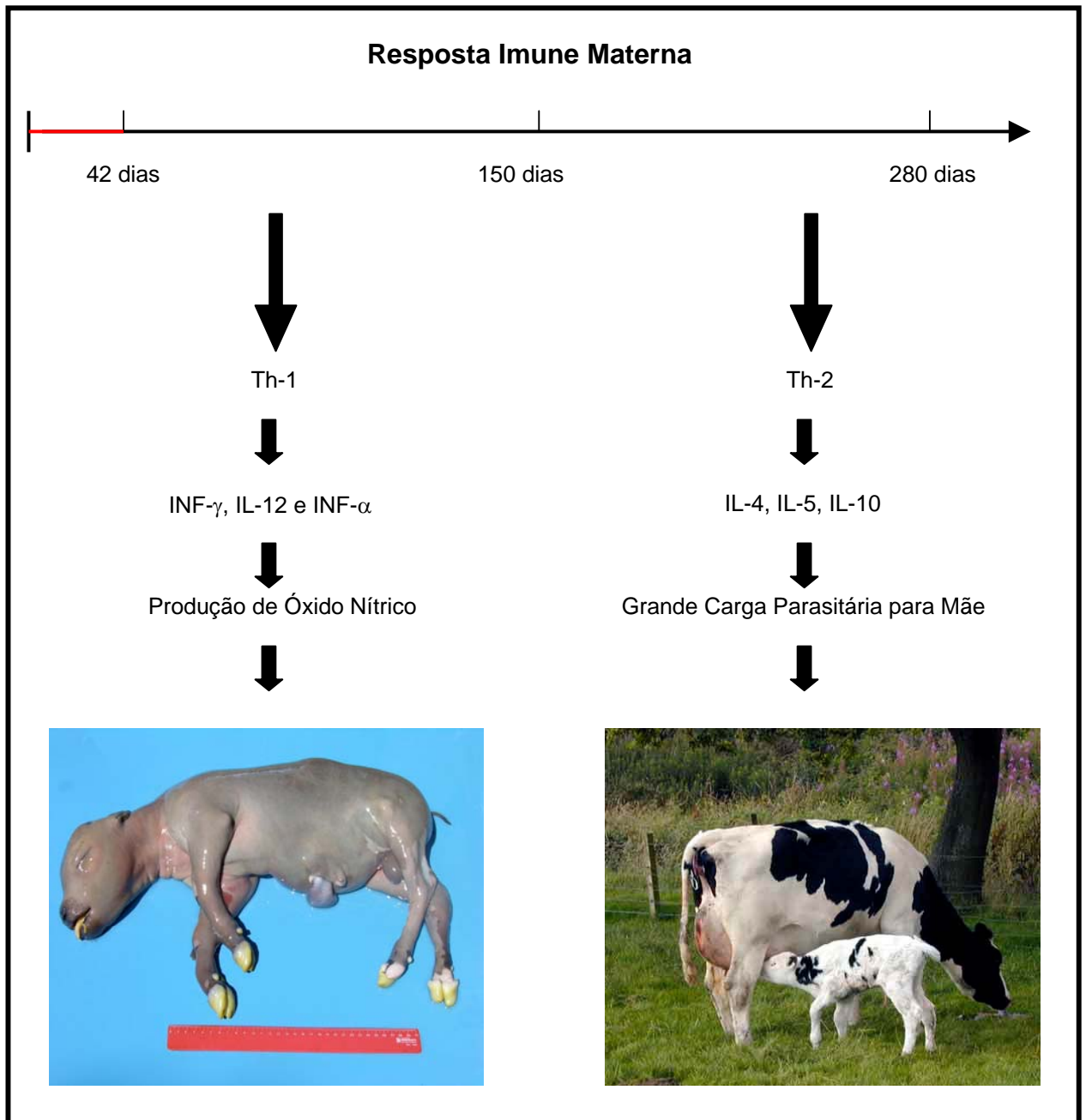


Figura 3. Resposta imune materna desenvolvida durante a infecção por *N. caninum*.

Mães cronicamente infectadas, no terço inicial da gestação apresentam uma resposta imunológica mediada através da produção de células Th-1. Esta citocina garante imunidade celular, podendo resultar na produção de citocinas pró-inflamatórias tal como: gamma interferon ($\text{INF-}\gamma$), interleucina 12 (IL-12) e $\text{INF-}\alpha$ que, geralmente, estão ausentes ou presentes em baixas concentrações na placenta podendo ser obtida em resposta a uma infecção. Este processo permite o controle da infecção do protozoário, mas pode ser nociva para a sobrevivência do feto, devido, a produção de óxido nítrico, que é extremamente danoso para o parasita, mas que também pode matar o feto. Com o avançar da gestação (150 dias) há um aumento na produção de progesterona, havendo assim, uma produção de Th-2,

responsável pela imunidade humoral. Comitadamente, interleucinas como IL-4, IL-5 e IL-10 são produzidas, garantindo o desenvolvimento do feto.

2.2.4. Diagnóstico

O exame histopatológico do feto e da placenta, associado à demonstração dos parasitas nas lesões através da técnica de imunoistoquímica, são necessários para montar um diagnóstico definitivo de neosporose (ANDERSON et al., 2000; DUBEY & LINDSAY, 1996a; HELMAN et al., 1998; DUBEY, 2003).

Fetos abortados geralmente estão autolisados e apresentam marcado edema do tecido subcutâneo e acúmulo de fluido serosanguinolento nas cavidades (THILSTED et al., 1989), observando-se raramente lesões macroscópicas relevantes (BARR et al., 1990; DUBEY & LINDSAY, 1996a). Quando presentes, as lesões macroscópicas geralmente são caracterizadas por focos de áreas pálidas situadas no coração e músculo esquelético (DUBEY & LINDSAY, 1996a).

Lesões microscópicas características de neosporose têm sido descritas em diversos trabalhos (BARR et al., 1990; DUBEY et al., 1990; NIETFELD et al., 1992; THILSTED et al., 1989; CORBELLINI et al., 2000.), sendo muitas vezes caracterizadas por encefalite multifocal necrosante associada a infiltrados inflamatórios não-supurativos em órgãos como fígado, coração e músculo esquelético (THILSTED et al., 1989; WOUDA et al., 1997a). O cérebro fetal geralmente é o órgão mais afetado (DUBEY, 2003) apresentando, portanto, as lesões mais significativas (DUBEY et al., 1999a; ANDERSON et al., 2000). Apesar disso, nem todas as áreas do cérebro são uniformemente afetadas (DUBEY & LINDSAY, 1996a), sendo que qualquer parte do SNC pode ser utilizada no exame histopatológico (DUBEY & LINDSAY, 1996a). Um estudo realizado por Helman et al (1998) demonstrou que a maioria das lesões ocasionadas por *N. caninum* estão situadas na substância cinzenta do SNC, sendo caracterizadas por encefalite linfo-histiocitária multifocal, geralmente localizadas ao redor ou em áreas adjacentes a pequenas artérias (HELMAN et al., 1998). Lesões de infecção por *N. caninum* raramente são observadas em outros órgãos, incluindo pulmão, rim e placenta (DUBEY & LINDSAY, 1996a; NIETFELD et al., 1992). Um estudo realizado por Barr et al (1990) demonstrou encefalite e miocardite em 100% dos fetos analisados, adrenalite em 80%, miosite em 72%, nefrite em 66%, placentite em 53% e pneumonia em 44% dos 82 fetos bovinos estudados. Placentite, caracterizada por múltiplos focos de necrose associados à presença de *N. caninum*, tem sido descrita em

casos de aborto bovino (BARR et al., 1990; MACALDOWIE et al., 2004). Lesões presentes no miocárdio geralmente são severas, mas freqüentemente estão mascaradas pela autólise (DUBEY et al., 1990d). *N. caninum* pode ser identificado em fragmentos de cérebro, medula espinhal, músculo estriado, fígado, rim, pulmão, adrenal e tecido adiposo, associado à inflamação granulomatosa ou não-supurativa (HELMAN et al., 1998). Wouda et al. (1997a) observaram a presença de *N. caninum* em 98% no SNC, 26% no fígado e 14% no coração de 80 fetos bovinos abortados examinados. Adicionalmente, um outro estudo realizado no Brasil apontou a presença de encefalite não-supurativa em 81,8% dos fetos bovinos abortados enviados (CORBELLINI et al., 2001). Infiltrados inflamatórios compostos por células mononucleares também foram observados em fragmentos de coração, músculo esquelético, pulmão, fígado e rim respectivamente (CORBELLINI et al., 2001). Adicionalmente, Morales et al. (2001) analisaram 211 fetos pertencentes a propriedades leiteiras do México, sendo que 53% das lesões observadas eram caracterizadas por necrose e gliose multifocal. *N. caninum* foi detectado através da imunistoquímica em 36% no SNC; 45% no miocárdio e 45% no fígado. Estudos baseados na análise histopatológica de fragmentos de cérebro, coração e fígado, constataram a presença de *N. caninum* em 17% dos 2.053 fetos submetidos ao laboratório de diagnóstico de Saúde Animal em Drachten (WOUDA et al., 1994).

O órgão de eleição para o diagnóstico de *N. caninum* em fetos é o cérebro (DUBEY et al., 1999a). Entretanto, fetos com idade entre 3-4 meses apresentam lesões menos proeminentes no SNC que fetos com idade mais avançada (WOUDA et al., 1997a), podendo assim, resultar em diagnóstico falso negativo. Adicionalmente, grande parte do SNC dos fetos apresenta uma consistência semilíquida (DUBEY et al., 1999a), dificultando a obtenção de fragmentos para o exame histológico. Uma vez, não havendo a observação de lesões histológicas presuntivas de infecção por *N. caninum*, a imunistoquímica não será realizada, fazendo com que o diagnóstico de neosporose seja excluído (BOGER et al., 2003). A utilização da técnica de imunistoquímica é necessária, pois geralmente há poucos taquizoítos e cistos contendo bradizoítos em tecidos autolisados, que muitas vezes não são visíveis em secções de hematoxilina e eosina (DUBEY, 2003). Entretanto, reações cruzadas com *T. gondii* podem ser observadas ocasionalmente com o uso de anticorpos policlonais anti-*N. caninum*, provavelmente devido à grande variação na fonte de animais utilizados para a produção de anticorpos, no tipo de antígeno e estágio dos parasitas utilizados na imunização dos

animais, associado a variações observadas nos procedimentos imunoistoquímicos entre os diversos laboratórios (DUBEY & LINDSAY, 1996a; VAN MAANEN et al., 2004).

O teste de imunoistoquímica é considerado um método altamente específico, porém pouco sensível. Variações consideráveis nos resultados encontrados entre diversos laboratórios muitas vezes têm sido atribuídas à experiência do operador, a utilização de anticorpos diferentes, diluições diferentes, e a variações no tratamento enzimático do tecido (VAN MAANEN et al., 2004).

Até o presente momento diversos tipos de testes sorológicos têm sido utilizados no diagnóstico de neosporose bovina: teste de imunofluorescência indireta (IFAT) (CONRAD et al., 1993a; DUBEY et al., 1996b), vários tipos de ELISA (PARÉ et al., 1995a, 1995b; BASZLER et al., 1996; BJÖRKMAN et al., 1997) e teste de aglutinação para *N. caninum* (NAT) (DUBEY, 2003). Há uma grande variedade de procedimentos e forma de conduzir estes testes sorológicos, entretanto a grande maioria deles está baseada na utilização de culturas derivadas de taquizoítos a partir do isolamento de *N. caninum* de bovinos ou caninos (BJÖRKMAN & LUNDEN, 1994). Testes sorológicos podem ser utilizados como forma de diagnóstico em um rebanho que apresenta problemas de aborto. Isso é possível traçando uma análise comparativa a partir da titulação obtida entre um grupo de vacas que abortaram e de vacas que não abortaram dentro de um mesmo rebanho, fazendo assim uma associação entre os abortos existentes e os títulos sorológicos encontrados (THURMOND & HIETALA, 1999). Diagnósticos sorológicos como IFAT podem também ser realizados para a detecção de *N. caninum* em fetos bovinos abortados, principalmente em fetos que se encontram em idade gestacional mais avançada (BARR et al., 1995; OTTER et al., 1997a; WOUUDA et al., 1997b; SLOTVED et al., 1999). Entretanto, o resultado negativo não elimina a possibilidade de infecção, principalmente em fetos muito jovens que ainda não desenvolveram imunidade necessária capaz de produzir níveis detectáveis de anticorpos contra o do parasita. Adicionalmente, a autólise fetal pode causar também degradação de imunoglobulinas (WOUUDA et al., 1997b), ocasionando baixos níveis de anticorpos específicos de *N. caninum* (JENKINS et al., 2002). O resultado positivo pela IFAT indica que há infecção, mas não confirma que o aborto foi causado por *N. caninum* (ANDERSON et al., 2000).

A detecção de *N. caninum* por reação em cadeia de polimerase (PCR) tem sido considerada útil no diagnóstico complementar, sendo utilizada em diversas pesquisas sobre o assunto (HO et al., 1996; PAYENE & ELLIS, 1996; ELLIS et al., 1998). Um

estudo realizado por Sondgen et al. (2001) apontou que a técnica de PCR é mais sensível que os outros testes utilizados no diagnóstico de neosporose em fetos bovinos abortados. Adicionalmente, Gottstein et al. (1998) identificaram *N. caninum* em um grande número de fetos através da técnica de PCR, que não apresentavam lesões histopatológicas sugestivas de infecção pelo protozoário. Uma das vantagens das técnicas de diagnóstico molecular é a capacidade de amplificar pequenas quantidades de parasitas presentes em grandes quantidades de tecido. Entretanto fatores como o custo, tempo e equipamentos aparecem como pontos limitantes para que esses métodos de diagnóstico sejam aplicados na rotina (ANDERSON et al., 2000).

2.3. Neosporose bovina

A neosporose é uma emergente e importante doença reprodutiva que causa abortos em bovinos e tem sido relatada em diversos países (Tabela 5) apresentando distribuição mundial (ANDERSON et al., 1991; THORNTON et al., 1991; NIETFELD et al., 1992).

Tabela 5. Diagnóstico de *Neospora caninum* associado ao aborto em bovinos.

País	Nº de fetos examinados	% fetos infectados	Referência
Alemanha	135	12,6	SOUDGEN et al. (2001)
Argentina	240	12,1	MOORE et al. (2002)
Austrália	729	21,0	BOULTON et al. (1995)
Brasil	46	39,1	CORBELLINI et al. (2002)
EUA	698	24,4	ANDERSON et al. (1991); THURMOND et al. (1995a)
EUA	266	42,5	ANDERSON et al. (1995)
Holanda	2053	17	WOUDA et al. (1997a)
México	211	77	MORALES et al. (2001)
Suíça	242	21,0	SAGER et al. (2001)

Fonte: **Korean Journal of Parasitology**, n°1,v.41, 2003

Em bovinos adultos o único sinal clínico de neosporose observado é o aborto. Vacas de várias idades podem abortar a partir do terceiro mês de gestação (DUBEY, 2003). Entretanto, a idade média dos fetos bovinos abortados geralmente está entre 5-6 meses de gestação como se tem observado em diversos trabalhos (THILSTED & DUBEY, 1989; DUBEY & LINDSAY, 1996a; ANDERSON et al., 2000; DUBEY, 2003).

Além do aborto, a infecção por *N. caninum* pode causar reabsorção e mumificação fetal, natimortalidade ou resultar em nascimento de terneiros cronicamente infectados e ou clinicamente normais (DUBEY & LINDSAY, 1996a; DUBEY, 2003). Terneiros infectados congenitamente podem apresentar sinais neurológicos caracterizados por ataxia, perda dos reflexos e perda de propriocepção (BARR et al., 1991,1993; BRYAN et al., 1994; DUBEY & LINDSAY, 1996a), todavia poucos casos têm sido descritos.

A frequência de abortos causados por *N. caninum* pode ser classificada como esporádica, endêmica ou em surtos epidêmicos (ANDERSON et al., 2000).

N. caninum pode ser transmitido aos bovinos via horizontal, infecção pós-natal através da ingestão de oocistos liberados pelos cães, ou através da transmissão vertical via transplacentária durante a gestação (ANDERSON et al., 2000).

Em um estudo realizado na Alemanha, observou-se que 93% dos terneiros que nasceram a partir de vacas soropositivas, apresentaram sorologia positiva para *N. caninum*, indicando que a transmissão vertical foi o principal modo de transmissão da infecção nos rebanhos examinados (SCHARES et al., 1998). A transmissão de *N. caninum* em bovinos através da transferência de embriões ou via venérea é pouco provável. A transferência de embriões tem sido recomendada como forma de prevenir a transmissão vertical (BAILLARGEON et al., 2001). Landmann et al. (2002) confirmaram estes achados e demonstraram que embriões produzidos comercialmente previnem a transmissão de *N. caninum* de vacas soropositivas para vacas soronegativas. Adicionalmente embriões pré-implantados em bovinos são resistentes à invasão por *N. caninum* (BIELANSKI et al., 2002).

A transmissão lactogênica de *N. caninum* tem sido demonstrada experimentalmente em terneiros recém-nascidos que tomaram colostro juntamente com taquizoítos de *N. caninum*. Entretanto não há evidências de infecção natural (DAVISON et al., 2001).

Um recente estudo soroepidemiológico realizado na República Tcheca demonstrou uma soroprevalência de 3,19% (13/470), indicando que a infecção por *N. caninum* deve entrar no diagnóstico diferencial de outras enfermidades reprodutivas que cursam com histórico de aborto (VÁCLAVEK et al., 2003). Adicionalmente, no Uruguai, soro de 217 bovinos foi testado para *N. caninum* através da IFAT, sendo 60% soropositivos (KASHIWAZAKI et al., 2004).

Na Holanda a neosporose bovina foi inicialmente diagnosticada em 1990 sendo considerada, após esta data, uma enfermidade de grande importância para os bovinos daquele país (WOUDA et al., 1992). Estudos realizados na Escócia (TREES et al., 1994), Irlanda do Norte (McNAMEE et al., 1996), Inglaterra (DAVISON et al., 1999b) e Portugal (CANADA et al., 2004) revelaram uma maior soroprevalência de *N. caninum* entre vacas com histórico de aborto. No Brasil um estudo soroepidemiológico realizado no Mato Grosso do Sul constatou uma soroprevalência de 7,7% de *N. caninum* em bovinos de corte (ANDREOTTI et al., 1999) e de 14,3% em bovinos de leite principalmente acima de 2 anos, provenientes do norte do Paraná (GUIMARAES et al., 2004).

Estimar a prevalência da infecção em um rebanho é um passo importante para desenvolver estratégias de controle na infecção por *N. caninum* (THURMOND et al., 1995b). Diante disso, a realização de testes sorológicos dentro de um rebanho foi uma das formas encontradas para avaliar a prevalência da infecção e estimar a extensão da transmissão vertical (ANDERSON et al., 2000). Entretanto, numerosas evidências epidemiológicas relatam à existência de infecção pós-natal (transmissão horizontal), partindo de uma fonte de contaminação externa (THURMOND et al., 1990; BARTELS et al., 1999). A quebra do ciclo de transmissão de *N. caninum*, através da redução do contato entre o hospedeiro definitivo (cão) e tecido previamente infectado como, placenta e fetos bovinos abortados, associados à redução da exposição de bovinos com as fezes dos hospedeiros definitivos, vêm minimizar a transmissão pós-natal (THURMOND et al., 1995b; DUBEY, 2003).

Outras medidas preventivas consideradas de fácil controle e precaução, que diminuam os fatores de risco associados à transmissão horizontal incluem práticas de manejo como manter cães presos, silos fechados, controlar a população de ratos e outros possíveis hospedeiros intermediários (LINDSAY et al., 1999a). A eliminação de vacas com histórico de aborto por *N. caninum* é considerada uma outra medida de controle em relação à infecção, pois estes animais apresentam grandes chances de contaminar sua progênie, justificando, portanto o abate (THURMOND & HIETALA, 1997a).

Fármacos que previnem a transmissão do parasita da mãe para o feto são ainda desconhecidos, entretanto pesquisas nesta área estão sendo realizadas (DUBEY, 2003).

Até o presente momento, não há uma demonstração concreta que vacinas produzidas com antígenos mortos previnam o aborto em bovinos por *N. caninum* (INNES et al., 2002). Resultados encorajadores têm sido obtidos em camundongos

vacinados com parasitas mortos e seus produtos (INNES et al 2001b). Recentemente um trabalho realizado na Costa Rica, empregando o uso de vacinas com antígenos mortos de *N. caninum* demonstraram uma redução de 46,2% das taxas de aborto em rebanhos com alta incidência de abortamento por (ROMERO, et al., 2004).

Atualmente, não há uma estimativa confirmada das reais perdas da indústria leiteira bovina sobre os danos agregados a neosporose (DUBEY, 2003). Custos indiretos incluem ajuda profissional, descarte de animais e diminuição na produção de leite (THURMOND & HIETALA 1997a; HERNANDEZ et al., 2001).

Em geral, sabe-se menos sobre as causas de aborto em bovinos de corte do que em bovinos de leite, devido à dificuldade em encontrar pequenos fetos que são expelidos no primeiro trimestre (DUBEY, 2003). Todavia, um estudo soroepidemiológico realizado por Barling et al. (2000) demonstrou uma associação positiva entre o título de anticorpos de *N. caninum* encontrado em terneiros e o ganho de peso, projetando que a perda por cada terneiro fique em torno de \$15.62 dólares.

2.4. Neosporose em outras espécies animais

2.4.1. Caninos

Casos de neosporose canina já foram relatados em diversas partes do mundo (DUBEY & LINDSAY, 1996a; LINDSAY & DUBEY, 2000). Desde então, anticorpos de *N. caninum* foram observados em 37.8% dos cães analisados na Argentina (BASSO et al., 2001b); 22% na Nova Zelândia (REICHEL et al., 1998), em 10% na Turquia (COSKUN et al., 2000), em 6.7% e 21,6% no Brasil respectivamente (MINEO et al., 2001; de SOUZA et al., 2002) e em 6.4% na Itália (CRINGOLI et al., 2002). A apresentação clínica da neosporose em cães adultos é variada (LINDSAY et al., 1999c) e inclui distúrbios neurológicos, polimiosite, miocardite e dermatite (BARBER et al., 1996; DUBEY & LINDSAY, 1996a; RUEHLMANN et al., 1995). Adicionalmente, quatro casos de neosporose cutânea foram recentemente observados, incluindo uma associação com a infecção por *Leishmania* sp. em um cão (TARANTINO et al., 2001; PERLÉ et al., 2001; ORDEIX et al., 2002).

N. caninum já foi isolado de cães com sinais neuromusculares diversas vezes (Tabela 6) (DUBEY, 2003). O diagnóstico da neosporose em cães é realizado mediante

a utilização da técnica de imunofluorescência indireta (IFI), histopatologia e imunistoquímica (DUBEY & LINDSAY, 1996a).

Tabela 6. Isolamentos descritos de *Neospora caninum* em cães.

Identificação/Nome	País	Referência
NC- GERI ^b	Alemanha	PETERS et al.(2000)
NC- 6-Argentina a	Argentina	BASSO et al. (2001a)
NC- Bahiab	Brasil	GONDIM et al. (2001)
NC- 1b	Estados Unidos	DUBEY et al. (1998a)
NC- 2b	Estados Unidos	HAY et al. (1990)
NC- 3b	Estados Unidos	CUDDON et al (1992)
NC- 4b	Estados Unidos	DUBEY et al. (1998a)
NC- 5b	Estados Unidos	DUBEY et al. (1998a)
CN-1	Estados Unidos	MARSH et al. (1998)
NC- livb	Reino Unido	BARBER et al. (1995)

^aIsolado de fezes de cães

^bIsolado de cães congenitalmente infectados.

Fonte: **The Korean Journal Parasitology**. vol.41, nº1, 2003.

2.4.2. Búfalos D'água (*Bubalus bubalis*)

Búfalos D'água (*Bubalus bubalis*) é considerada uma espécie muito importante para a economia de vários países incluindo Brasil, Índia, Itália e Vietnã (FUJII et al., 2001). A prevalência de anticorpos de *N. caninum* em Búfalos D'água em 4 países está representada na Tabela 7.

Tabela 7. Soroprevalência de anticorpos *Neospora caninum* em Búfalos D'água (*Bubalus bulalis*).

País	Nº animais	Tipo	Teste	Ponto corte	% Positivos	Referência
Brasil	222	Leite	NAT ^a	1:40	53	FUJII et al. (2001)
			IFAT ^b	1:25	64	
Egito	75	Corte	NAT	1:40	60	DUBEY et al. (1998b)
Itália	1377	Leite	IFAT	1:200	34.6	GUARINO et al. (2000)
Vietnã	200	Corte	IFAT	1:200	1.5	HUONG et al. (1998)
			ELISA ^c	0.2	1.5	

^aTeste de aglutinação para neospora; ^bTeste Imunofluorescência indireta; ^censaio imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay).

Fonte: **The Korean Journal Parasitology**. vol.41, nº1, 2003.

Pouco se sabe sobre as causas de aborto em búfalos D'água no mundo (FUNGII et al., 2001). Uma apresentação oral da prevalência de anticorpos de *N. caninum* em búfalos na região nordeste do Brasil (GONDIM et al., 1999c) é o único relato de neosporose em búfalos neste país. Recentemente, Guarino et al. (2000), relataram a presença de cistos tipo *N. caninum* em 2 de 4 fetos abortados pertencentes a uma propriedade leiteira da Itália, entretanto este relato ainda precisa ser confirmado (DUBEY, 2003).

2.4.3. Ovinos

N. caninum em ovinos foi inicialmente diagnosticado em um cordeiro congenitamente infectado na Inglaterra (DUBEY et al., 1990b). Subseqüentemente, aspectos clínicos da neosporose em ovinos foram relatados no Japão (KOBAYASHI et al., 2001). Koyama et al. (2001) obtiveram o primeiro isolamento de *N. caninum* em uma ovelha adulta.

Pouco se sabe sobre a prevalência de *N. caninum* em ovinos naturalmente infectados e evidências de que *N. caninum* não esteja associado a taxas significativas de aborto na Inglaterra já foram relatados (OTTER et al., 1997b). Em um recente estudo realizado nesse país somente 3 de 660 ovelhas que abortaram apresentaram anticorpos para *N. caninum* (HELMICH et al., 2002). Entretanto ovelhas prenhas apresentam alta susceptibilidade a infecções experimentais por taquizoítos de *N. caninum* (DUBEY & LINDSAY, 1990c; McALLISTER et al., 1996; BUXTON et al., 1997b, 1998; JOLLEY et al., 1999; INNES et al., 2001a). Ovinos podem também ser infectados pela ingestão oral de oocistos de *N. caninum* (O'HANDLEY et al., 2002).

2.4.4. Caprinos

Aborto e mortalidade neonatal associado à infecção por *N. caninum* foi relatado em cabritos nos Estados Unidos (BARR et al., 1992), em um rebanho de caprinos leiteiros na Costa Rica (DUBEY et al., 1996c) e em um cabrito de 3 dias de idade no Brasil, proveniente de uma propriedade com histórico de aborto (CORBELLINI et al., 2001). Pouco se sabe sobre a prevalência de anticorpos de *N. caninum* em cabritos (DUBEY, 2003). Ooi et al. (2000) não encontrou anticorpos de *N. caninum* em 24

cabritos provenientes da Tailândia. Caprinos clinicamente normais foram inoculados com *N. caninum* em diferentes estágios de gestação, resultando em aborto, natimortalidade, morte fetal com reabsorção ou nascimento de cabritos clinicamente normais (LINDSAY et al., 1995).

2.4.5. Eqüinos

Parasitas semelhante a *N. caninum* foram observados em tecidos de dois fetos eqüinos (DUBEY & PORTERFIELD, 1990a), em um feto congenitamente infectado (LINDSAY et al., 1996b) e em 5 eqüinos adultos (GRAY et al., 1996; DAFT et al., 1996; MARSH et al., 1996; HAMIR et al., 1998; CHADLE et al., 1999). Em 1996 uma nova espécie de *Neospora* sp foi isolada do SNC de um eqüino, que clinicamente apresentava sinais neurológicos (MARSH et al., 1996), sendo mais tarde denominado de *N. hughesi* (MARSH et al., 1998). Posteriormente, *N. hughesi* foi isolado de três eqüinos adultos (MARSH et al., 1998; CHADLE et al., 1999; DUBEY et al., 2001). A soroprevalência de *N. caninum* em eqüinos está representada na Tabela 8.

Tabela 8. Soroprevalência de anticorpos de *Neospora caninum* em eqüinos.

País	Nº animais	Teste	Ponto Corte	% Positivos	Referências
Argentina	76	NAT	1:40	0	DUBEY et al (1999c)
Brasil	101	NAT	1:40	0	DUBEY et al. (1999d)
Coréia do Sul	191	IFAT	1:100	2	GUPTA et al. (2002)
EUA	296	NAT	1:40	21.3	DUBEY et al. (1999e)
	536	IFAT	1:50	11.5	CHADLE et al. (1999)
	208	IFAT	1:100	17	VARDELEON et al.
	300	IFAT	1:50	10	(2001)
					MCDOLE et al. (2002)
França	434	NAT	1:40	23	PITEL et al. (2001)

Fonte: **The Korean Journal Parasitology**. vol.41, nº1, 2003.

2.4.6. Animais selvagens

N. caninum foi diagnosticado em dois veados de cauda preta (*Odocoileus hemionus columbianus*) encontrados mortos na Califórnia (WOODS et al., 1994). Adicionalmente, cistos de *N. caninum* foram encontrados no cérebro de um veado natimorto (*Cervus eldi siamensis*) em um zoológico na França (DUBEY et al., 1996b), e em um zoológico em Paris (PETERS et al., 2001b). PETERS et al. (2001b) observou a

presença de anticorpos de *N. caninum* em fluídos fetais de dois antílopes (*Tragelaphus imberberis*) gêmeos a termo no zoológico em Hannover, na Alemanha.

Neosporose foi relatada em um rinoceronte (*Ceratotherium simum*) que microscopicamente apresentava extensas áreas de miocardite (WILLIAMS et al., 2002).

Anticorpos de *N. caninum* foram encontrados em 40% de cervídeos selvagens (Tabela 9), levantando a possibilidade da presença de um ciclo silvestre. A maioria destes cervídeos apresenta titulação acima de 1:1600. A prevalência de anticorpos de *N. caninum* não aumenta com a idade, indicando a possibilidade de uma transmissão congênita (DUBEY et al., 1999b). Schares et al. (2001) apresentou evidências de infecção congênita de *N. caninum* em raposas vermelhas.

Tabela 9. Soroprevalência de anticorpos de *N. caninum* em animais silvestres.

Espécie Animal	País	Nº animais	Teste	% Positivos	Referência	
Cães selvagens (dingos) da Austrália (<i>Canis familiaris dingo</i>)	Australia	169	IFAT	15.9	BARBER et al. (1997)	
Coiotes (<i>Canis latrans</i>)	EUA	52	IFAT	10	LINDSAY et al. (1996a)	
Cuatis (<i>Procyon lotor</i>)	EUA	95	NAT	10	LINDSAY et al. (2001b)	
Guepardo (<i>Acinonyx jubatus</i>)	S. Africa	16	IFAT	6.3	CHEADLE et al. (1999)	
Leões (<i>Panthera leo</i>)	S. Africa	18	IFAT	16.6	CHEADLE et al. (1999)	
Raposa Vermelha (<i>Vulpes vulpes</i>)	Bélgica	123	IFAT	78	BUXTON et al. (1997a)	
	Irlanda	70	IFAT	1.4	WOLFE et al. (2001)	
	Espanha	122	PCR	10.7	ALMEIRA et al. (2002)	
	Suécia	221	ELISA	0	JAKUBEK et al. (2001)	
	Inglaterra	52	IFAT	2	BARBER et al. (1997)	
	Inglaterra	16	IFAT	6	SIMPSON et al. (1997)	
	Raposa Cinza (<i>Urocyon cinereoargenteus</i>)	EUA	26	NAT	15.4	LINDSAY et al. (2001a)
	Raposas do Chile (<i>Pseudolapex fulvipes</i>)	-	2	IFAT	100	PATITUCCI et al. (2001)
Veados da cauda branca (<i>Odocoileus virginianus</i>)	EUA	400	NAT	40.5	DUBEY et al. (1999b)	

Fonte: **The Korean Journal Parasitology**. vol.41, nº1, 2003.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Desde julho de 1999, um trabalho sobre infecção por *N. caninum* em fetos bovinos abortados vem sendo desenvolvido no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CORBELLINI et al., 2000). Adicionalmente, *N. caninum* foi considerado um importante agente causador de abortos em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, apresentando uma prevalência de 39,1% (CORBELLINI et al., 2002). Diante disso, proprietários de estabelecimentos leiteiros e médicos veterinários de campo que trabalham em diversas regiões do Rio Grande do Sul foram incentivados a enviar fetos bovinos abortados para o Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, dando continuidade a um trabalho previamente estabelecido. O diagnóstico foi realizado mediante a análise histológica de fragmentos de tecidos fetais e imunoistoquímica.

3.1- Procedimentos de Necropsia

Os 237 fetos enviados ao Setor de Patologia Veterinária da UFRGS no período de julho de 1999 a maio de 2004, tiveram a idade estimada segundo o comprimento da nuca até a inserção da cauda ou através de registros de cobertura. A estimativa da idade através do comprimento da nuca até a cauda foi a seguinte (BARR et al., 1990): 13-21cm = 3 meses; 21-31cm = 4 meses; 32-43cm = 5 meses; 44-57cm = 6 meses; 59-67cm = 7 meses; 68-85cm = 8 meses e mais de 86cm = 9 meses.

Durante a realização da necropsia, fragmentos de pulmão, coração, fígado, rim, músculo esquelético e todo o SNC foram coletados e fixados em formalina tamponada a 10% (MORALES et al., 2001), por aproximadamente 24-72 horas. Dados referentes à consistência do cérebro, graus de autólise e forma de acondicionamento do material foram devidamente registrados.

3.2- Análise histológica e seleção de casos

Cortes histológicos dos fetos bovinos abortados enviados foram corados por hematoxilina e eosina (HE). Casos que apresentavam lesões necrosantes e infiltrados inflamatórios não-supurativos sugestivos de infecção por protozoário no cérebro, pulmão, coração, fígado, rim e/ou músculo esquelético foram selecionados e analisados minuciosamente.

3.3- Imunoistoquímica

O exame imunoistoquímico foi realizado em cortes de cérebro, pulmão, fígado, coração e músculo esquelético de todos os 72 fetos selecionados. Cada lâmina continha apenas um corte de cada tecido. O exame foi realizado em apenas um corte por órgão de cada caso. A técnica de imunoistoquímica foi realizada empregando-se um Kit comercial (Dako, Carpinteria, CA) contendo um anticorpo secundário biotinalado e um complexo de avidina conjugada com peroxidase. O anticorpo primário policlonal anti-*N.caninum* (VMRD, USA) foi diluído em uma solução tampão fosfato (LINDSAY & Dubey, 1989) chegando a uma concentração de 1:1000.

Após desparafinar as lâminas em xilol, hidratar em álcool e lavar em água destilada foi aplicado uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 10 minutos para a realização do bloqueio da peroxidase endógena. Digestão com solução de tripsina 0,1% por 15 minutos a 37°C seguindo de irradiação por microondas foram os métodos utilizados para a realização da recuperação antigênica. As marcações inespecíficas (background) eram reduzidas a partir da aplicação de leite desnatado a 5% por 15 minutos. O anticorpo primário foi aplicado durante 45 minutos a uma temperatura de 37°C, seguido do anticorpo secundário biotinalado e solução de avidina conjugada com peroxidase aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. A revelação da marcação foi obtida através da utilização do cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB-Dako, Carpinteria, CA), por 5-10 minutos. Antes de aplicar nos cortes, 0.6ml de DAB era misturado com 0.4ml de solução de PBS, pH 7.0 (PROPHET et al., 1992) e 25µl de peróxido de hidrogênio. Solução de hematoxilina (PROPHET et al., 1992) foi empregada como contra-corante, por aproximadamente 1 minuto. As lâminas eram lavadas com solução de TBS (tris buffer saline) pH 7.0 após cada passo da técnica. Lâminas controle positivas provenientes de um caso de infecção natural por *N. caninum* em um caprino (CORBELLINI et al., 2001) foram inseridas junto com as lâminas a serem testadas.

3.4- Análise Estatística

Dados relacionados com a idade dos fetos, autólise, incluindo consistência do SNC (líquida/normal-pastosa), lesões histológicas compatíveis com infecção por protozoário nos diversos órgãos foram registrados e categorizados para a realização da análise estatística.

A associação entre o resultado da imunoistoquímica (positivo/negativo) por caso analisado e fatores observados durante a análise macro e microscópica dos fetos necropsiados (variáveis independentes) foi verificada através da regressão logística multivariada utilizando um programa SAS para Windows. A regressão logística foi realizada em dois passos: análise individual das variáveis, utilizando a idade como variável fixa, e seleção das variáveis com $P \leq 0.25$ para a análise multivariada. O modelo final baseou-se na retirada e inclusão das variáveis de acordo com o valor da razão entre a deviance do modelo e graus de liberdade ('goodness-of-fit'). Apenas variáveis com $P < 0.05$ permaneceram no modelo. As variáveis presentes no modelo final foram testadas em um modelo linear para verificação da colinearidade.

4. RESULTADOS

4.1- Achados macroscópicos

Entre junho de 1999 a maio de 2004, 237 fetos bovinos abortados foram enviados ao Setor de Patologia Veterinária (SPV) da UFRGS. Destes 237 fetos, 72 (30,3%) apresentaram lesões microscópicas sugestivas de infecção por protozoário. Essas lesões foram caracterizadas pela presença de infiltrados inflamatórios, de intensidade variada, compostos basicamente por células inflamatórias mononucleares associados ou não a presença de focos de necrose em diversos órgãos.

A idade dos fetos com lesões sugestivas de protozoário (n=72) variou de 3 a 8 meses (média $4,47 \pm 1,09$). Graus variados de autólise (Figura 4) foram observados em 77,7% (56/72) dos fetos analisados, sendo caracterizados pela presença de embebição por hemoglobina e enfisema cadavérico. Lesões macroscópicas significativas não foram observadas na maioria dos 72 fetos. Entretanto, edema do tecido subcutâneo e presença de líquido nas cavidades torácica e abdominal foram achados freqüentemente observados. Pontos esbranquiçados medindo aproximadamente 0,5-1mm de diâmetro foram encontrados no parênquima pulmonar em dois casos. O cérebro apresentava consistência líquida ou semi-líquida (Figura 5) em 44/72 (61,1%) dos fetos, dificultando a obtenção de tecido para a análise histológica e imunoistoquímica.

4.2- ACHADOS MICROSCÓPICOS

As lesões microscópicas sugestivas de infecção por protozoário foram observadas principalmente no músculo esquelético, coração, pulmão e cérebro (Tabela 10).

Tabela 10. Freqüência de lesões sugestivas de infecção por protozoário encontradas em cada órgão analisado dos fetos bovinos abortados enviados ao SPV da UFRGS.

Resultado histopatológico	Presença	Ausência	Total (%)
Músculo esquelético	66 (94,2)	4	70
Coração	53 (76,8)	16	69
Pulmão	48 (70,5)	20	68
Sistema nervoso central	45 (67,1)	22	67
Fígado	17 (25,7)	49	66
Rim	4 (6,0)	62	66

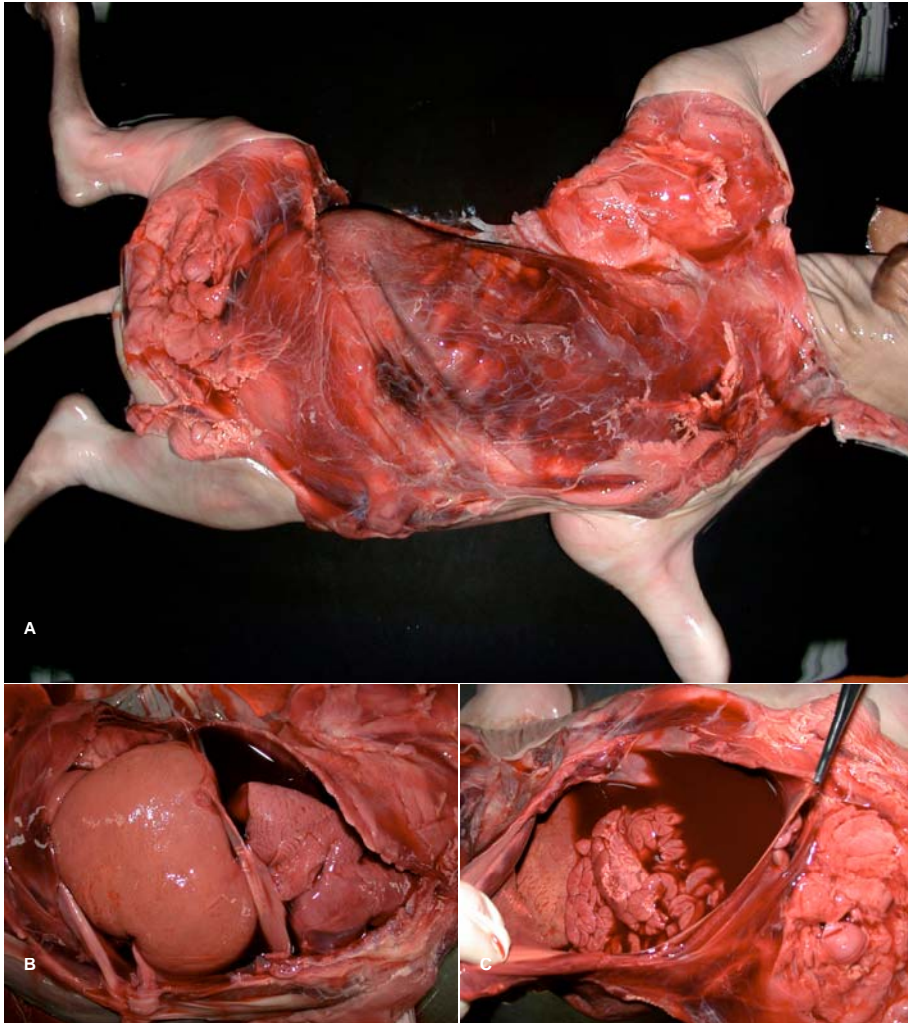


Figura 4. (A) Feto bovino abortado, macho, 6 meses de idade gestacional apresentando alterações autolíticas caracterizadas por edema de tecido subcutâneo e embebição pela hemoglobina. As alterações macroscópicas mais significativas observadas foram líquido serosanguinolento na cavidade torácica e abdominal (B,C).



Figura 5. Cérebro de feto bovino abortado apresentando consistência líquida (A), semi-líquida (B,C). Fragmentos de cérebro em processo de fixação em formalina tamponada a 10% para análise histopatológica (D).

As lesões histológicas observadas (Tabela 11) localizavam-se na grande maioria dos casos (94,2%), no músculo esquelético sendo caracterizadas por infiltrado inflamatório composto basicamente por células mononucleares, de intensidade variada apresentando na maioria das vezes, um padrão de distribuição multifocal (Figura 6).

Tabela 11. Análise histológica de cortes de tecidos corados pela HE em 72 fetos bovinos abortados com lesões sugestivas de protozoário.

Órgão	Frequência (%)	Histopatologia
Músculo esquelético	66/70 (94,2)	Miosite não-supurativa, multifocal.
Coração	53/69 (76,8)	Miocardite e pericardite não-supurativa, multifocal.
Pulmão	48/68 (70,5)	Pneumonia intersticial mononuclear associada a focos de necrose; pneumonia intersticial mononuclear e focos de necrose multifocal.
Cérebro	45/67 (67,1)	Gliose, encefalite multifocal não-supurativa e encefalite necrosante não supurativa.
Fígado	17/66 (25,7)	Hepatite periportal não-supurativa associada ou não a necrose individual de hepatócitos.
Rim	4/66 (6,0)	Nefrite intersticial não-supurativa, multifocal.

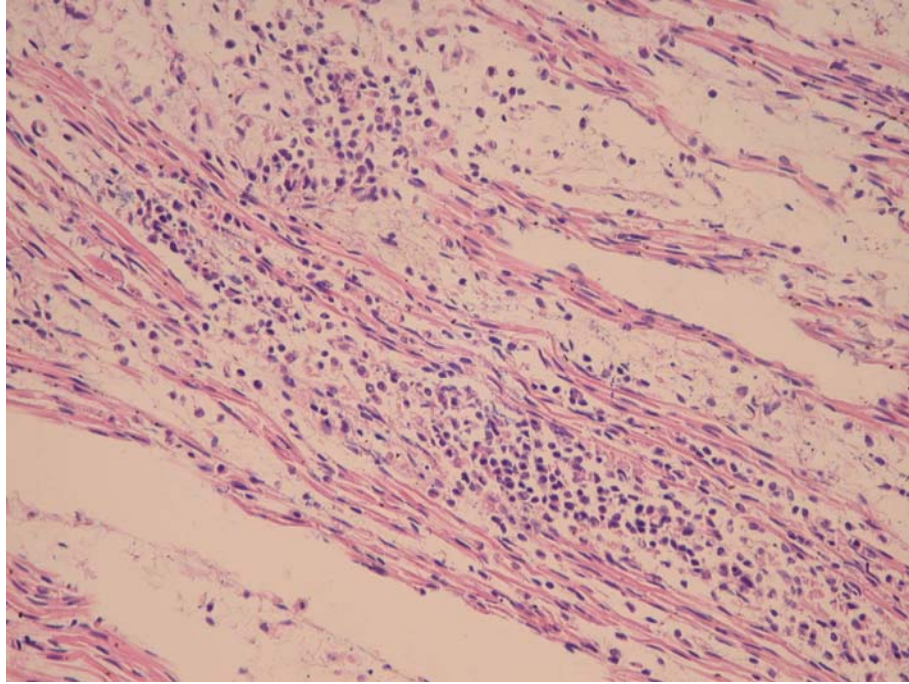


Figura 6. Infecção por *Neospora caninum*. Feto bovino abortado. Músculo esquelético. Miosite não-supurativa multifocal. HE, obj.20.

No coração, infiltrados inflamatórios não supurativos foram encontrados ao longo de epicárdio e miocárdio (Figura 7). Estes infiltrados multifocais estendiam-se ao logo do epicárdio em casos mais severos (Figura 8).

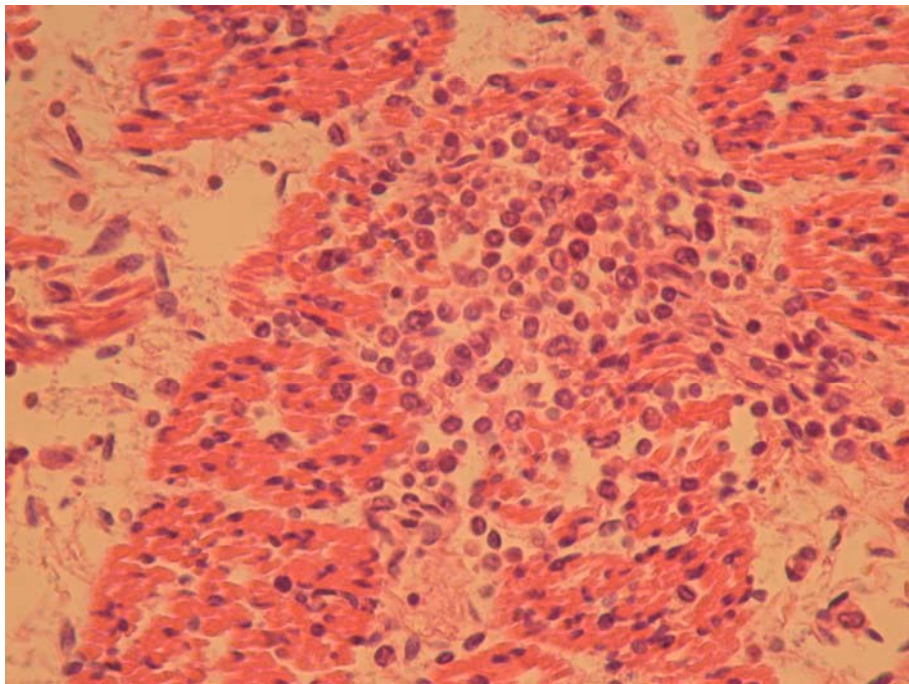


Figura 7. Infecção por *Neospora caninum*. Feto bovino abortado. Coração. Miocardite não-supurativa focal. HE, obj 40.

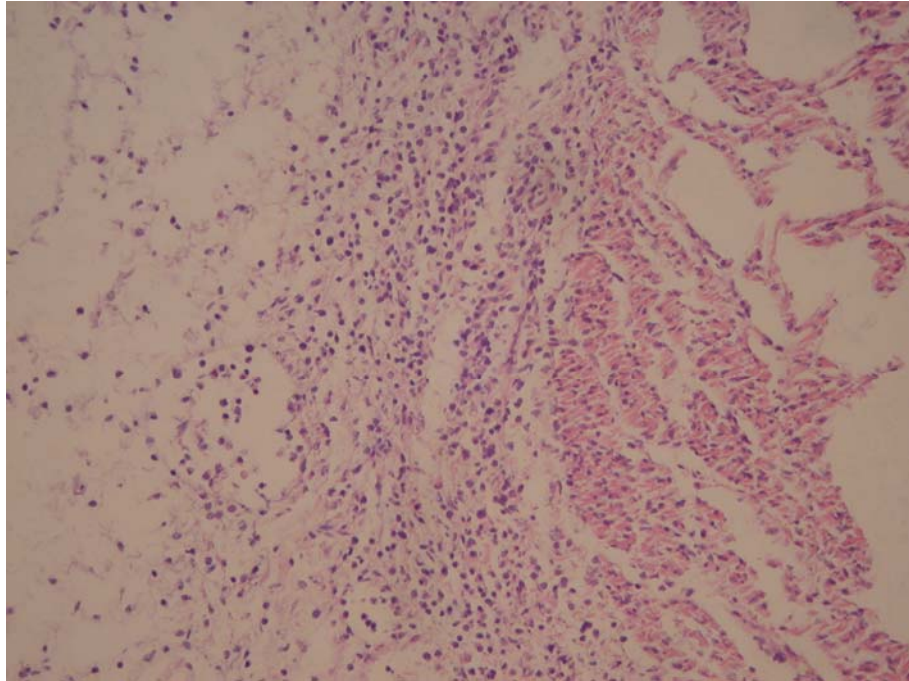


Figura 8. Infecção por *Neospora caninum*. Feto bovino abortado. Pericárdio. Pericardite não-supurativa difusa acentuada. HE, obj 10.

No pulmão (Figura 9) as lesões foram observadas no interstício e caracterizavam-se pela presença de células inflamatórias mononucleares, distribuídas ao longo dos lóbulos pulmonares com a presença de focos de necrose de coagulação. Dos 48 fetos que apresentavam lesões no pulmão, 31 (64,5%) apresentavam pneumonia intersticial mononuclear associada a focos de necrose de coagulação, 13 (27%) apresentavam somente pneumonia intersticial mononuclear de intensidade leve a moderada e 4 fetos (8,3%) possuíam apenas lesões caracterizadas pela presença de focos de necrose de coagulação.

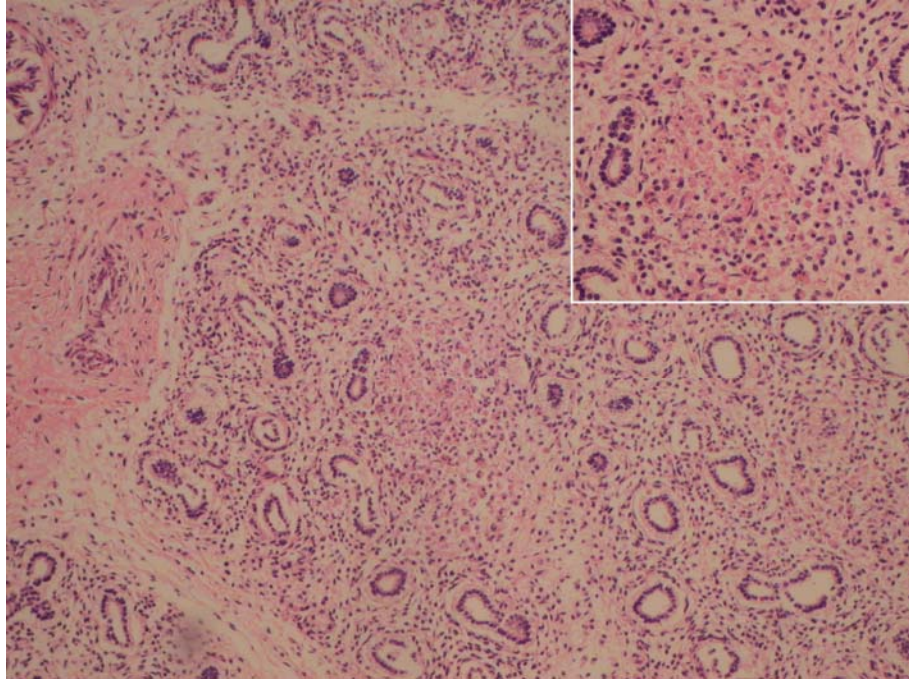


Figura 9. Infecção por *Neospora caninum*. Feto bovino abortado. Pulmão. Pneumonia intersticial mononuclear e foco de necrose (detalhe). HE, obj. 20

No cérebro as lesões histológicas observadas caracterizavam-se por encefalite multifocal, de intensidade variada, composta por infiltrados inflamatórios mononucleares e células da glia (Figura 10). Em casos mais severos, frequentemente, eram observados numerosos focos de necrose circundados por células inflamatórias mononucleares. *Neospora caninum* foi observado em fragmentos de SNC corados pela hematoxilina e eosina em apenas dois casos. Em casos mais severos, frequentemente foram observados numerosos focos de necrose circundados por células inflamatórias mononucleares, sendo considerados de fácil visualização.

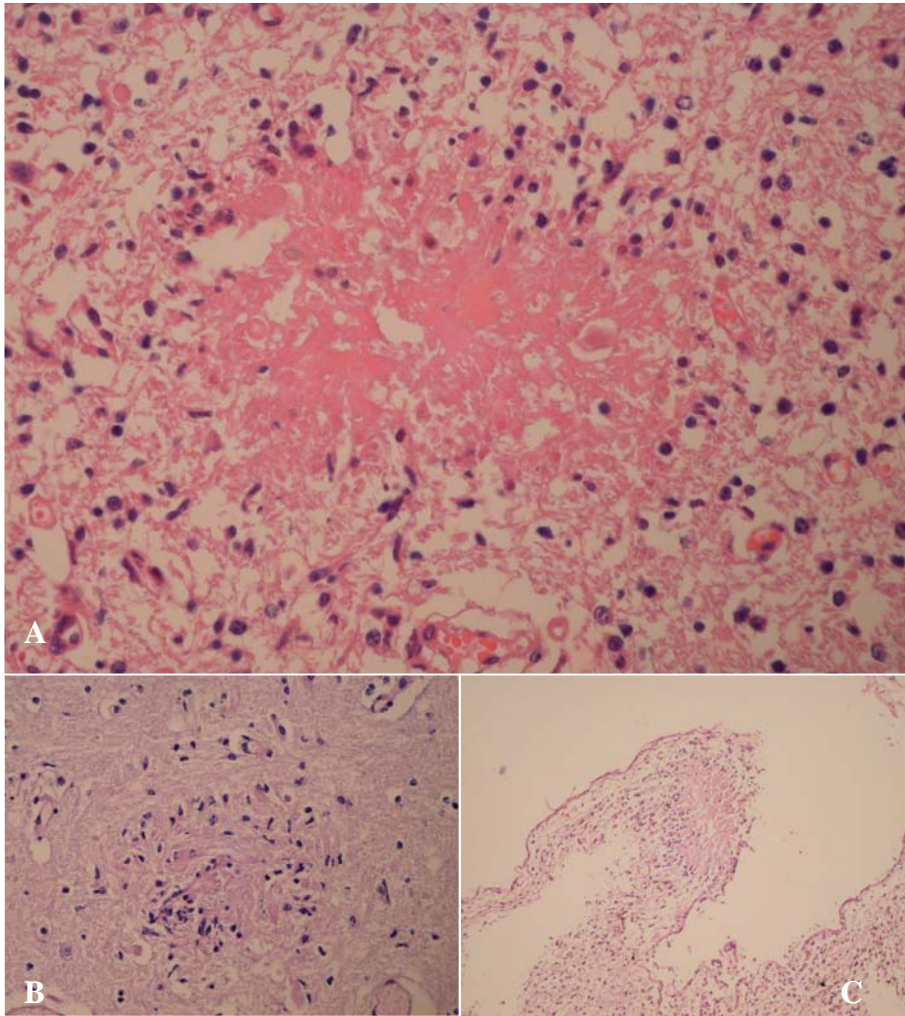


Figura 10. Lesões sugestivas de *Neospora caninum* no cérebro de fetos bovinos abortados (A,B,C). Em A, observa-se à presença de encefalite necrosante não-supurativa acentuada, de fácil visualização. HE, obj. 40. Em alguns casos, pequenos focos inflamatórios eram compostos basicamente por células mononucleares e células da glia (B). HE, obj. 20. Em C, observa-se encefalite necrosante não-supurativa focal leve. HE, obj.20.

Lesões inflamatórias não-supurativas foram também observadas no fígado, principalmente ao redor dos espaços porta, algumas vezes, apresentando necrose hepatocelular nas adjacências. Nefrite intersticial não-supurativa multifocal foi observada em apenas 6,0% dos casos.

Lesões necrosantes distintas foram observadas no SNC e pulmão. No pulmão a presença de focos de necrose de coagulação associados à pneumonia intersticial colaborou positivamente no estabelecimento do diagnóstico devido à facilidade de visualização destas lesões no microscópio óptico. Adicionalmente, lesões histológicas

foram observadas no músculo esquelético, pulmão e cérebro, ao mesmo tempo em 29/72 (40,2%) fetos suspeitos de infecção por protozoário.

4.3- Achados imunoistoquímicos

Dos 72 fetos bovinos abortados que apresentavam lesões histológicas sugestivas de infecção por protozoário, 47 (65,2%) apresentaram resultado positivo na imunoistoquímica para *N. caninum*. Destes 47, 37 (78,7%) apresentaram marcação positiva somente SNC. O resultado positivo na imunoistoquímica sob o total de órgãos analisados encontram-se na Tabela 12. Dos 47 fetos que foram positivos na imunoistoquímica, 33 (70,2%) apresentaram lesões no SNC caracterizada por encefalite não-supurativa multifocal (Tabela 13).

Tabela 12. Frequência de *Neospora caninum* observados por órgão através do teste imunoistoquímico realizado nos 72 fetos que apresentavam lesões sugestivas de protozoário^a

Órgãos	IHQ		Total
	+	-	
SNC	37 (55,2)	30 (44,7)	67
Fígado	6 (9,0)	60 (90,9)	66
Rim	6 (9,0)	60 (90,9)	66
Músculo esquelético	3 (8,5)	64 (91,4)	70
Pulmão	3 (4,4)	64 (91,4)	68
Coração	3 (4,3)	66 (95,6)	69

^aA imunoistoquímica foi realizada em todos os órgãos dos fetos que apresentavam lesões sugestivas de protozoário independentemente da presença de lesão.

Tabela 13. Frequência das lesões encontradas nos órgãos positivos na imunoistoquímica para *Neospora caninum*.

Órgãos	Nº afetado	IHQ positiva	(%)	Lesão
Músculo esquelético	43	47	91,4	Miosite não-supurativa, multifocal.
Pulmão	34	47	72,3	Pneumonia intersticial mononuclear, associada ou não com focos de necrose
Coração	34	47	72,3	Miocardite e pericardite-não supurativa
Cérebro	33	47	70,2	Encefalite não-supurativa
Fígado	15	47	31,9	Hepatite não-supurativa associada ou não a focos de necrose
Rim	3	47	6,3	Nefrite não-supurativa multifocal

Taquizoítos foram encontrados na maior parte nos cortes de cérebro dos fetos, enquanto que cistos foram observados em apenas três casos, sendo um deles um cisto jovem. Os cistos, presentes em pequeno número, apresentavam forma redonda a oval e com exceção do cisto jovem, continham parede delgada. A marcação positiva no fígado era caracterizada pela presença de taquizoítos associados a focos de necrose hepatocelular (Figura 11). Adicionalmente, em um caso, um grupo de taquizoítos foi observado no interior de uma célula gigante.

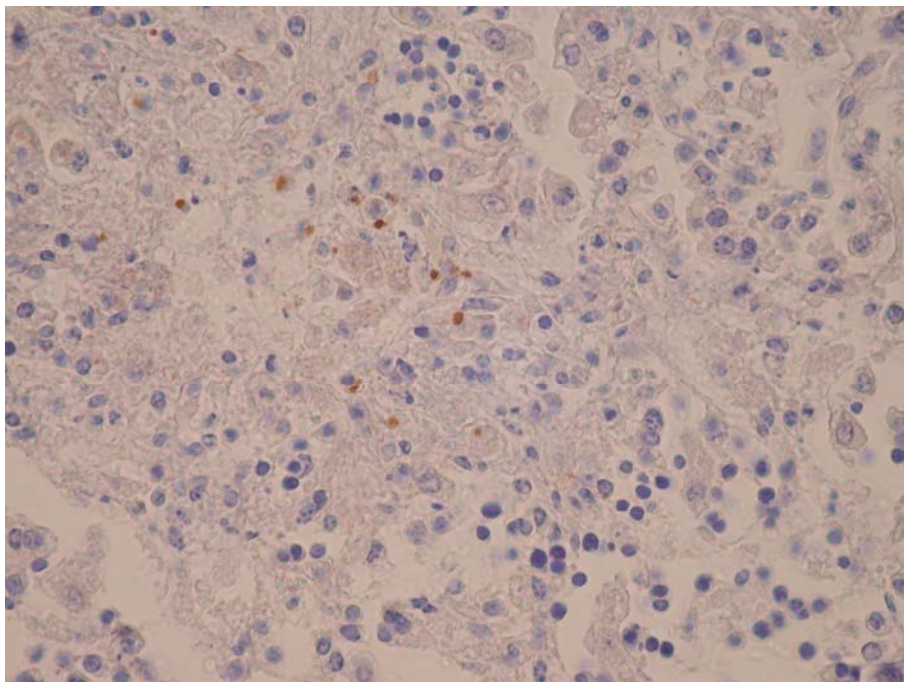


Figura 11. Infecção por *Neospora caninum*. Fígado de feto bovino abortado. Imunoistoquímica. Presença de taquizoítos de coloração amarronzada no interior de foco de necrose. Avidina-biotina, obj.40.

No rim grupos de taquizoítos foram evidenciados no interior do glomérulo renal e citoplasma de células epiteliais. Grupos de taquizoítos foram também observados no músculo esquelético (Figura 12), pulmão e coração.

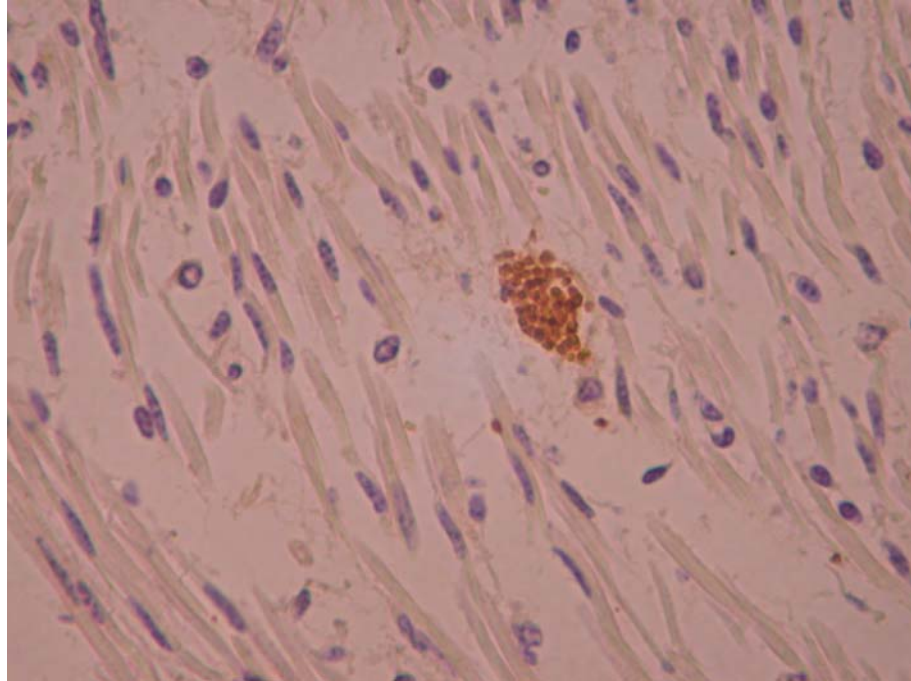


Figura 12. Infecção por *Neospora caninum*. Músculo esquelético de feto bovino abortado. Imunoistoquímica. Observa-se grupo de taquizoítos corados em marrom entre as fibras musculares esqueléticas. Avidina biotina, obj 40.

Taquizoítos presentes no SNC foram observados principalmente no centro de focos de necrose, e em 14 casos, pequenos grupos de taquizoítos foram encontrados sem reação inflamatória ao redor (Figura 13). Muitos casos destes continham vários focos de necrose, porém pouco destes focos apresentavam taquizoítos no seu interior. Adicionalmente, grupos de taquizoítos foram também visualizados no interior de lesões inflamatórias caracterizadas por gliose e encefalite não-supurativa multifocal.

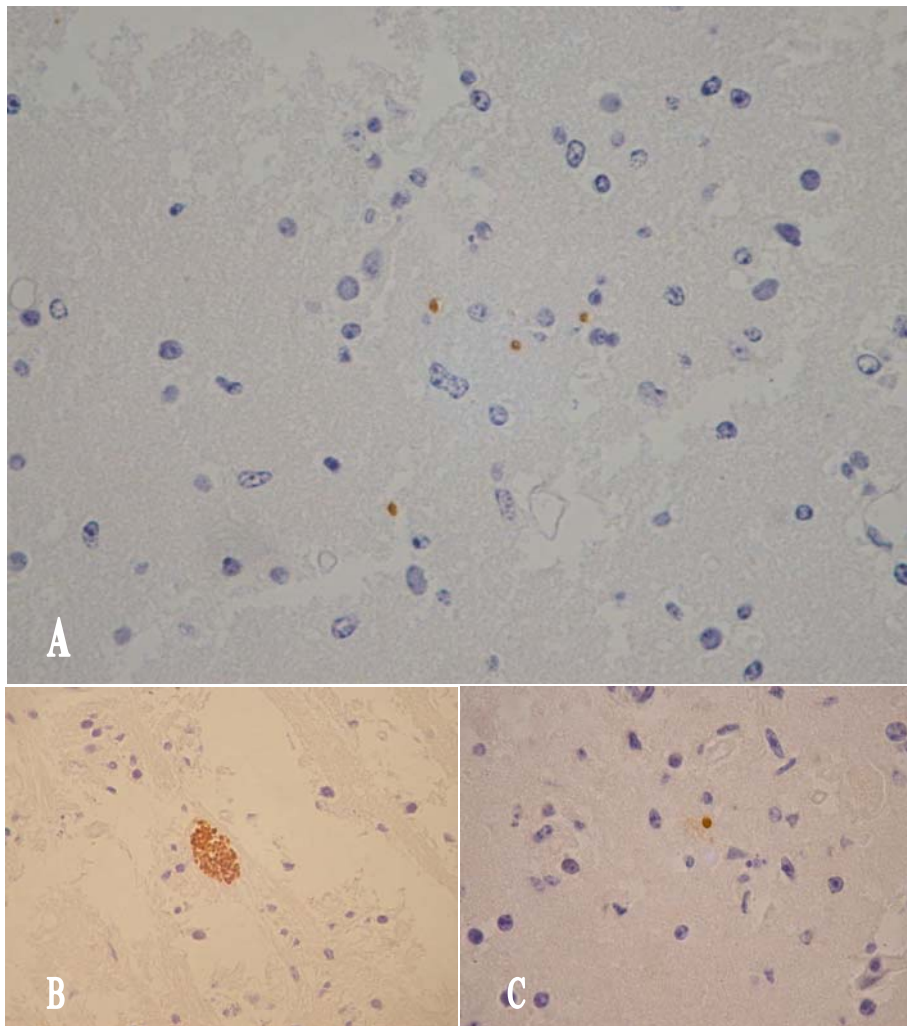


Figura 13. Infecção por *Neospora caninum*. Cérebro de fetos bovinos abortados. Imunoistoquímica. Tachizoítos marcados positivamente pelo anticorpo policlonal anti-*N. caninum* (A,B,C) podem ser observados. Em A, observam-se tachizoítos ao redor de pouca reação inflamatória, obj. 20. Em B, grupo de tachizoítos estão presentes sem reação inflamatória, obj. 20 e em C, há somente um tachizoíto no interior do foco de gliose, obj. 40. Avidina biotina.

Os fetos que foram considerados positivos na imunoistoquímica para *N. caninum* apresentaram uma idade entre 3 e 8 meses (média 4.47 ± 1.09). Pela análise estatística, os fetos mais jovens apresentaram maior número de casos positivos (Figura 14).

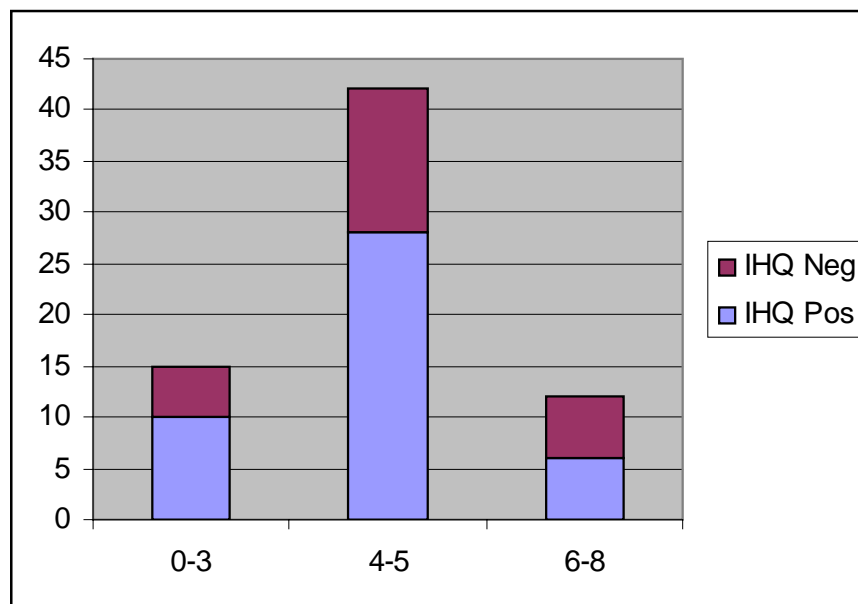


Figura 14 Relação número de fetos positivos e negativos na imunoistoquímica para *Neospora caninum* em relação à idade.

4.4- Análise Estatística

As variáveis significativas na análise individual (Tabela 14) foram: consistência do cérebro (líquida/normal-pastosa), lesão no cérebro, lesão no fígado e soma das lesões. (Esse último item era caracterizado pelo somatório de lesão microscópica em um ou mais órgãos durante a análise histológica).

Tabela 14. Resultados da análise individual das variáveis.

Variável	Estimativa	OR	OR 95% IC	P
Consistência do cérebro ^a	1,45	4,30	1,221-15,167	0,023
Lesão no cérebro	1,34	3,84	1,164-12,728	0,027
Lesão no fígado	1,63	5,10	1,033-25,242	0,045
Soma de lesões ^b	0,56	1,75	1,106-2,793	0,01

a. 0=líquida, 1=normal

b. 1=lesão em um órgão, 2=lesão em dois órgãos, 3=lesão três órgãos, 4=lesão em quatro órgãos.

No modelo final da análise multivariada (Tabela 15), três variáveis estiveram associadas significativamente com o resultado positivo na imunistoquímica nos fetos abortados: consistência do cérebro, lesão no cérebro e idade. Foram analisados 58 fetos sem perda de informação de um total de 72 com lesões sugestivas de infecção por protozoário. As chances (odds) de obter-se um resultado positivo na imunistoquímica de *N. caninum* foram 4,35 vezes maior quando o cérebro tinha consistência considerada normal e 4,95 vezes maior na presença de lesão sugestiva de protozoário, caracterizada por encefalite multifocal de intensidade variada. A probabilidade de resultado positivo na IHQ foi inversa à idade fetal, onde cada mês adicional de gestação diminuiu as chances de um feto ter resultado positivo na imunistoquímica por 0,41.

Tabela 15. Resultado da regressão logística multivariada para variáveis associadas com resultado positivo na imunistoquímica para *Neospora caninum* em 58 fetos bovinos apresentando lesões sugestivas de infecção por protozoário.

Variáveis	Frequência ^c	Estimativa	OR	OR 95% IC ^a	P
Cérebro consistência ^b	31	1,47	4,35	0,1320-2,8116	0,031
Lesão cérebro	45	1,59	4,94	0,1646-3,0313	0,028
Idade	-	-0,87	0,41	-1,5982-0,1436	0,018

a. Intercept=2,78, P=0,046; Valor deviance=63,65, d.f=1,17; valor deviance/d.f.=1,17

b. 0=líquida; 1=normal

c. Somatório de 1

5. DISCUSSÃO

Os resultados apontados no presente estudo indicam que a infecção por *N. caninum* em fetos bovinos abortados no Rio Grande do Sul é alta 19,8% (47/237) sugerindo que a neosporose é uma importante causa de abortos em rebanhos bovinos desse Estado, como previamente demonstrando em outros trabalhos realizados no Brasil (CORBELLINI et al., 2000, 2002) e em outros países (ANDERSON et al., 1991, 2000., DUBEY, 2003., CANADA et al., 2004).

Dos 237 fetos bovinos enviados ao Setor de Patatologia Veterinária da UFRGS, 72 (30,3%) apresentaram lesões microscópicas sugestivas e infecção por protozoário, similares às observadas em outros trabalhos (ANDERSON et al., 1991., BARR et al., 1990., NIETFELD et al., 1992., WOUDA et al., 1997a). Lesões microscópicas caracterizadas por infiltrados inflamatórios não-supurativos no SNC associados ou não a focos de necrose são as lesões mais significativas observadas em casos de neosporose em fetos bovinos abortados. Outras lesões, como pericardite e miocardite não-supurativa focal, hepatite portal não-supurativa, nefrite intersticial não-supurativa e pneumonia intersticial mononuclear associada ou não a focos de necrose também têm sido descritas em fetos infectados por esse protozoário (THILSTED et al., 1989., BARR et al., 1994), sendo no presente estudo, os achados constantemente observados. O cérebro é o órgão mais afetado e qualquer parte dele pode ser utilizada na análise histológica (DUBEY & LINDSAY, 1996a), sendo o órgão mais freqüentemente afetado (DUBEY, 2003).

Para que o diagnóstico de neosporose bovina seja estabelecido, vários critérios como idade do feto, estado de autólise fetal, presença de lesões inflamatórias compatíveis nos órgãos analisados e a detecção do parasita em tecidos fetais por imunoistoquímica devem ser cuidadosamente avaliados (ANDERSON et al., 2000).

No presente estudo, variáveis como estado de conservação do cérebro fetal, presença de lesões de SNC e idade do feto estavam associadas significativamente com o resultado positivo imunoistoquímico (Tabela 15). Dos 72 fetos analisados, 44 (61,1%) apresentavam consistência líquida ou semi-líquida do SNC, dificultando a obtenção de tecido para a análise histológica e imunoistoquímica confirmando as suspeitas observadas em um trabalho anteriormente realizado por Corbellini et al. (2000). Uma vez não havendo fragmentos de tecido suficientes, a detecção de *N. caninum* em associação com as lesões histológicas torna-se problemática, devido à distribuição

esporádica e focal deste protozoário em órgãos dos fetos bovinos abortados (NIETFELD et al., 1992., OTTER et al., 1997b., DUBEY & LINDSAY, 1989).

No presente estudo, 70,2% (33/47) dos fetos com resultado positivo na imunistoquímica, apresentaram lesões no SNC, que são caracterizadas por infiltrados inflamatórios não-supurativos de intensidade variada. Isso indica que este tipo de lesão é sugestiva de infecção pelo protozoário *N. caninum*, como observado por Anderson et al. (1991). Lesões histológicas associadas à reação positiva na IHC em 72,3% (34/47) dos cortes de pulmão e coração e 91,4% (43/47) dos cortes de músculo esquelético, apesar de não significativa, também sugerem neosporose. Vários órgãos que apresentaram lesões histológicas sugestivas de infecção por protozoário submetidos ao teste de IHC obtiveram resultado negativo (Tabela 15), o que indica um diagnóstico falso-negativo. Dessa maneira, haverá uma tendência inversa de resultados negativos na IHC em órgãos de maior frequência de lesão histológica, como observado no pulmão, coração e músculo esquelético. Segundo Van Maanen et al. (2004), a IHC é um exame altamente específico, porém pouco sensível. A ausência de taquizoítos ou cistos de *N. caninum* em tecidos com lesões características deste protozoário, não descarta a possibilidade do aborto ter sido causado por esse agente, devido a sua distribuição esporádica e esparsa nos tecidos muitas vezes analisados (THILSTED et al., 1989). Adicionalmente, mesmo em casos positivos um baixo número deste parasita é muitas vezes observado, indicando que a presença de lesões inflamatórias ou autólise também podem ser nocivos ao protozoário, afetando a sua morfologia e antigenicidade (HATTEL et al., 1998).

N. caninum foi identificado no cérebro em 55,2% (37/67) de fetos bovinos abortados, indicando ser esse o órgão de escolha para a realização do teste de IHC. As causas que estabelecem o fato do cérebro fetal ser considerado o órgão de escolha para a realização do teste IHC ainda não foram esclarecidas. Mas Segundo Wouda et al. (1997a) taquizoítos de *N. caninum* são mais facilmente identificados em lesões focais do cérebro, sugerindo, que o cérebro fetal possa ser o último órgão a ser afetado pelo protozoário, facilitando o diagnóstico. Adicionalmente, uma menor celularidade é observada neste órgão, fazendo com que a presença de taquizoítos ou cistos desse protozoário sejam mais facilmente visualizados.

Neste estudo a média das idades dos abortos com lesões sugestivas de protozoário foi de 4,47 ($\pm 1,09$). Aborto ocasionado pelo protozoário *N. caninum* geralmente ocorre entre 4-6 meses de gestação (THILSTED et al., 1989., BARR et al.,

1990., ANDERSON et al., 1991., NIETFIELD et al., 1992., DUBEY & LINDSAY, 1996a, HATTEL et al., 1998). Segundo Anderson et al. (2000), surtos de aborto nessa faixa etária podem ser indicativo de neosporose e estão associadas a capacidade do feto montar ou não uma resposta imunológica frente ao parasita, que possa protegê-lo contra a infecção. No presente estudo, observou-se uma associação significativa entre fetos jovens e positividade na IHC. Segundo Barr et al. (1990), fetos mais jovens apresentam uma probabilidade maior de conter protozoários visíveis e lesões menos severas, provavelmente devido ao incompleto desenvolvimento do sistema imune, causando assim, destruição do neurópilo com pouca reação inflamatória. A imunidade fetal desenvolve-se progressivamente (BUXTON et al., 2002). Antes dos 100 dias de gestação, o feto bovino é incapaz de reconhecer e responder contra patógenos, capacitando o *N. caninum* a produzir uma infecção fatal em bovinos (MALEY et al., 2003). Fetos em idade gestacional mais avançada apresentam uma capacidade melhor de responder contra o parasita, sendo a sua multiplicação mais restrita o que justifica o fato de poucos taquizoítos serem observados no interior de focos de necrose em fetos a partir de 5 meses de gestação.

Em nenhum momento, durante a análise histológica e IHC, foi observada a presença de organismos no endotélio de vasos, o que poderia levar a suspeita de uma infecção por *Sarcocystis* sp, um protozoário que causa lesões semelhantes às de *N. caninum* e que já foi descrito em fetos bovinos abortados (HONG et al., 1982). Adicionalmente a incidência de aborto por *Sarcocystis* sp, é rara e geralmente está associada à presença de sinais clínicos como febre, tremor muscular, hipersalivação, anorexia e perda de peso (BARR et al., 1990., THILSTED et al., 1989). Esses sinais não foram observados no presente estudo. Outro protozoário (*T. gondii*), pertencente ao filo Apicomplexa, semelhante ao *N. caninum* tem sido implicado como agente causador de abortos em caprinos e ovinos (DUBEY, 1981., DUBEY et al., 1986). Em bovinos, entretanto, não há evidências de casos de abortos confirmados ocasionados pelo *T. gondii* (DUBEY et al., 1988), sugerindo que bovinos talvez sejam resistentes à toxoplasmose (DUBEY et al., 1986., BARR et al., 1990).

Portanto, o resultado histopatológico observado no SNC dos fetos abortados no presente estudo, são compatíveis com a infecção causada pelo protozoário *N. caninum* e, devido a baixa sensibilidade do teste IHC, a associação entre lesão histológica em outros órgãos e neosporose fica prejudicada. Adicionalmente, sendo o cérebro fetal o melhor órgão para a realização do teste de imunoistoquímica, como confirmados no

presente estudo, esforços para a coleta de cérebro devem ser estimulados por patologistas e médicos veterinários de campo, para aumentar o sucesso do diagnóstico definitivo.

6. CONCLUSÕES

- 1- Infecção por *N. caninum* em fetos bovinos abortados no Estado do Rio Grande do Sul é alta (19,8%).
- 2- Abortos entre 4-6 meses podem ser um indicativo de neosporose.
- 3- O cérebro fetal é considerado o melhor órgão para a realização do teste de imunistoquímica.
- 4- A consistência líquida ou semi-líquida do SNC dificulta a obtenção de fragmentos de cérebro para análise histológica e imunistoquímica podendo comprometer o diagnóstico de neosporose em fetos bovinos abortados através da imunistoquímica.
- 5- Fetos mais jovens provavelmente apresentam maior quantidade de parasitos nos tecidos devido ao incompleto desenvolvimento do sistema imune fetal, podendo resultar em maior probabilidade de resultado positivo no exame imunistoquímico.
- 6- A presença de lesões no SNC caracterizadas por encefalite não supurativa necrosante é um forte indicativo de neosporose em fetos bovinos abortados.
- 7- Fatores como consistência do cérebro, presença de lesão no SNC e idade do feto estiveram relacionados com o resultado positivo para *N. caninum* na imunistoquímica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMÉRIA, S., FERRER, D., PADÓN, M., CASTELL, J., MAAS, S. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. **Vet Parasitol.**, v.107, p. 287-294, 2002.
- ALMÉRIA, S., MAREZ, T., DAWSON, H., ARAUJO, R., DUBEY, J.P., GASBARRE, L.C. Cytokine gene expression in dams and foetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. **Parasite Immunology.**, v.25, p.383-392, 2003.
- ANDERSON, M.L., ANDRIANARIVO, A.G., CONRAD, P.A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science.**, 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, p.241-244, 1991.
- ANDERSON, M.L., BLANCHARD, P.C., BARR, B.C., HOFFMAN, R.L. A survey of causes of bovine abortion occurring in the San Joaquin Valley, California. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.2, p.283-287, 1990.
- ANDERSON, M.L., PALMER, C.W., THURMOND, M.C., PICASO, J.P., BLANCHARD, P.C., BREITMEYER, R.E., LAYTON, A.W., McALLISTER, M., DAFT, B., KINDE, H., READ, D.H., DUBEY, J.P., CONRAD, P.A. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.207, p.1206-1210, 1995.
- ANDREOTTI, R., PINCKNEY, R., GOMES, A. Diagnóstico sorológico de *Neospora caninum* em rebanho de bovino de corte do Mato Grosso do Sul. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11, SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 2, SIMPÓSIO DE CONTROLE INTEGRADO DE PARASITOS DE BOVINOS, 1, 1999, Salvador. **Anais...Bahia: CBPV**, 1999, p.226.
- BAILLARGEON, P., FECTEAU, G., PARE, J., LAMOTHE, P., SAUVE, R. Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the international Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.218, p.1803-1806, 2001.
- BARBER, J.S., GASSER, R.B., ELLIS, J., REICHEL, M.P., McMILLAN, D., TREES, A.J. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. **J. Parasitol.**, v.83, p.1056-1058, 1997.
- BARBER, J.S., HOLMDAHL, O.J.M., OWEN, M.R., GUY, F., UGGLA, A., TREES, A.J. Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum*. **Parasitology.**, v.111, p.563-568, 1995.
- BARBER, J.S., PAYNE-JOHNSON, C.E., TREES, A.J. Distribution of *Neospora caninum* within the central nervous system and other tissues of six dogs with clinical neosporosis. **J. Small. Anim. Pract.**, v.37, p. 568-574, 1996.
- BARLING, K.S., McNEILL, J.W., THOMPSON, J.A., PASCHAL, J.C., TED McCOLLUM III, F., CRAIG, T.M., GARRY ADAMS, L. Association of serology status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass

- measurements in beef calves. **Journal American Veterinary Association.**, v. 217, p.1356-1360, 2000.
- BARR, B.C., ANDERSON, M.L., SVERLOW, K.W., CONRAD, P.A. Diagnosis of bovine fetal *Neospora caninum* infection with an indirect fluorescent antibody test. **Vet Rec.**, v.137, p. 611-613, 1995.
- BARR, B.C., ANDERSON, M.L., WOODS, L.W., DUBEY, J.P., CONRAD, P.A. Neospora-like protozoal infections associated with abortion in goats. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.4, p.365-367, 1992.
- 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, p.39-46, 1991.
- BARR, B.C., CONRAD, P.A., BREITMEYER, R., SVERLOW, K., ANDERSON, M.L., REYNOLDS, 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, p.113-117, 1993.
- BARR, B.C., ROWE, J.D., SVERLOW, K.W., BONDURANT, R.H., ARDANS, A.A., OLIVER, M.N., CONRAD, P.A. Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. **J Vet Diagn Invest.**, v.6, p. 207-215, 1994.
- BARR, C.B., ANDERSON, M.L., BLANCHARD, P.C., DAFT, B.M., KINDE, H., CONRAD, P.A. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. **Vet Pathol.**, v.27, p.354-361, 1990.
- BARTELS, C.J.M., WOUDA, W., SCHUKKEN, Y.H. Risk factors for *Neospora caninum* associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997). **Theriogenology.**, v.52, p.247-257, 1999.
- BASSO, W., VENTURINI, L., VENTURINI, M.C et al. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of naturally infected dog. **J. Parasitol.**, v. 87, p.612-618, 2001a.
- BASSO, W., VENTURINI, L., VENTURINI, M.C, et al. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. **J.Parasitol.**, v.87, p.906-907, 2001b.
- BASZLER TV, LONG MT, MCELWAIN TF, MATHISON BA. Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. **Int J Parasitol.**, v.29, p.1635-1646, 1999.
- BASZLER, T.V., KNOWLES, D.P., DUBEY, J.P., GAY, J.M., MATHISON, B.A., MCELWAIN, T.F. Serological Diagnosis of Bovine Neosporosis by *Neospora caninum* Monoclonal Antibody-Based Competitive Inhibition Enzyme- Linked Immunosorbent Assay. **Journal of Clinical Microbiology.**, v.34, n.6, p.1423-1428, 1996.
- BIELANSKI, A., ROBINSON, J., PHIPPS-TODD, B. Effect of *Neospora caninum* on in vitro development of preimplantation stage bovine embryos and adherence of preimplantation stage bovine embryos and adherence to the zona pellucida. **Vet Rec.**, v.150, p.316-318, 2002.

- BJERKAS, I., MOHN, S.F., PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Z. Parasitenkd.**, v.70, p. 271-274, 1984.
- BJORKMAN, C., HOLMDAHL, O.J., UGGLA, A. An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. **Vet Parasitol.**, v.68, p.251-260, 1997.
- BJÖRKMAN, C., JOHANSSON, O., STENLUND, S. Neospora species infection in a herd of dairy cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.208, p.1441-1444, 1996.
- BJÖRKMAN, C., LUNDÉN, A., HOLMDAHL, O.J.M., BARBER, J., TREES, A.J., UGGLA, A. *Neospora caninum* in dogs: detecção of antibodies by ELISA using na iscom antigen. **Parasite Immunol.**, v.16, p. 643-648, 1994.
- BOGER, L.A., HATTEL, A.L. Additional evaluation of undiagnosed bovine abortion cases may reveal fetal neosporosis. **Vet. Parasitol.**, v.113, p.1-6, 2003.
- BOULTON, J.G., GILL, P.A.COOK, R.W., FRASER, G.C., HARPER, P.A.W., DUBEY, J.P. Bovine *Neospora* abortion in north-eastern New South Wales. **Aust. Vet. J.**, v.72, p.119-120, 1995.
- BRYAN, L.A., GAJADHAR, A.A., DUBEY, J.P., HAINES, D.M. Bovine neonatal encephalomyelitis associated with a *Neospora* sp. protozoan. **Can. Vet. J.**, v. 35, p.111-113, 1994.
- BUXTON, D., MALEY, S.W., PASTORET, P.P., BROCHIER. B., INNES, E.A. Examination of red foxes (*Vulpes vulpes*) from Belgium for antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Vet Rec.**, v.141, p.308-309, 1997a.
- BUXTON, D., MALEY, S.W., THOMSON, K.M., TREES, A.J., INNES, E.A. Experimental infection of non-pregnant and pregant sheep with *Neospora caninum*. **J. Comp. Pathol.**, v.117, p.1-16, 1997b.
- BUXTON, D., McALLISTER, M.M., DUBEY, J.P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends Parasitol.**, v. 18, p.546-552, 2002.
- CANADA, N., CARVALHEIRA, J., MEIRELES, C.S., da COSTA, J.M.C., ROCHA, A. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cows and its consequences for reproductive management. **Theriogenology.**, v.62,p.1229-1235, 2004.
- CANADA, N., MEIRELES, C.S., ROCHA, A, et al. First Portuguese isolate of *Neospora caninum* from a aborted fetus from a dairy herd with endemic neosporosis. **Vet Parsitol.**, v.110, p.11-15, 2002.
- CHADLE, M.A., LINDSAY, D.S., ROWE, S, et al. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horse from Alabama and characterisation of an isolate recovered from a naturally infected horse. **Int. J. Parasitol.**, v.29, p.1537-1543, 1999.
- CHEADLE, M.A., SPENCER, J.A., BLACBURN, B.L. Seroprevalences of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in nondomestic felids from southern Africa. **J. Zoo Willife Med.**, v.30., p.248-251, 1999.
- CONRAD, P.A., BARR, B.C., SVERLOW, K.W., ANDERSON, M., DAFT, B., KINDE, H., DUBEY, J.P., MUNDSON, L., ARDANS, A. *In vitro* isolation and characterization of a *Neospora* sp from aborted bovine foetuses. **Parasitol.**, v.106, p.239-249, 1993a.

- CORBELLINI, L.G., COLODEL, E.M., DRIEMEIER, D. Granulomatous encephalitis in a neurologically impaired goat kid associated with degeneration of *Neospora caninum* tissue cysts. **J. Vet Diagn. Inv.**, 2001.
- CORBELLINI, L.G., DRIEMEIER, D., CRUZ, C., DIAS, M.M. Aborto bovino por *Neospora caninum* no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural.**, v.30, n.5, p.863-868, 2000.
- 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, p. 195-202, 2002.
- CORBELLINI, L.G., PESCADOR, C., CATTANI, C., FRANTZ, F., WUNDER, E., CORREA, A., SCHMITZ, M., DRIEMEIER, D. Infecção por *N. Caninum*: Aspectos metodológicos no Diagnóstico Histológico e Imunoistoquímico em Fetos Bovinos Abortados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 12, 2002, Rio de Janeiro. Anais...RJ:CBPV, 2002, resumo n°112 (área 3).
- CRINGOLI, G., RINALDI, E., CAPUANO, F., BALDI, L., VENEZIANO, V., CAPELLI, G. Sorological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dogs. **Vet Parasitol.**, v.106, p. 307-313, 2002.
- CUDDON, P., DAH-SHENG, L., BOWMAN, D.D., LINDSAY, D.S., MILLER, D.D., DUNCAN, I.D., DELAHUNTA, A., CUMMINGS, J., SUTER, M., COOPER, B., KING, J.M., DUBEY, J.P. *Neospora caninum* infection in English springer spaniel littermates. **J. Vet.Int. Med.**, v.6, p.325-332, 1992.
- CURRENT, W.L., UPTON, S.J., LONG, P.L. Taxonomy and life cycles. In: LONG, P.L. Coccidiosis of man and domestic animals. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 1-16, 1990.
- CUSKUN, S.Z., AYDYN, L., BAUER, C. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in domestic dogs in Turkey. **Vet Rec.**, v.146, p.649-649, 2000.
- DAFT, B.M., BARR, B.C., COLLINS, N., NVERLOW, K. *Neospora* encephalomyelitis and polyradiculoneuritis in an aged mare with Cushing's disease. **Equine Vet. J.**, v.28, p.240-243, 1996.
- DAVISON, H.C., FRENCH, N., TREES, A.J. Herd-specific and age-specific seroprevalence of *Neospora caninum* in 14 British dairy herds. **Vet Rec.**, v.144, p. 547-550, 1999a.
- DAVISON, H.C., GUY, C.S., MCGARRY, J.W., GUY, F., WILLIAMS, D.J.L., TREES, A.J. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. **Res. Vet. Sci.**, v.70, p.163-168, 2001.
- DAVISON, H.C., OTTER, A., TREES, A.J. Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle. **Int. J. Parasitol.**, v.29, p.1189-1194, 1999b.
- De SOUZA, S.L.P., GUIMARES, 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, p.408-409, 2002.
- DIJKSTRA, T., EYSKER, M., SCHARES, G., CONRATHS, F.J., WOUDE, W., BARKEMA, H.W. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. **Int. J. Parasitol.**, v.31, p.747-752, 2001.

- DUBEY, J.P. A Review of toxoplasmosis in cattle. **Vet. Parasitol.**, v.22,p.177-202,1986.
- DUBEY, J.P. Epizootic toxoplasmosis associated with abortion in dairy goats in Montana. **J.Am.Vet. Med. Assoc.**, v.178, n.7, p.661-670,1981.
- DUBEY, J.P. Recent advances in Neospora and neosporosis. **Vet. Parasitol.**, v.84, p. 349- 367, 1999a.
- DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology.**, v.41, n° 1, p. 1-16, 2003.
- DUBEY, J.P., ACLAND, H.M., HAMIR, A.N. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in a stillborn goat. **J. Parasitol.**, v.78, n.3, p.532-534, 1992.
- DUBEY, J.P., BARR, B.C., BARTA, J.R, et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **Int. J. Parasitol.**, v.32, p.929-946, 2002b.
- 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, p. 1269-1285, 1988a.
- DUBEY, J.P., DOROUGH, K.R., JENKINS, M.C., et al. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, tratament and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. **Int. J. Parasitol.**, v.28, p.1293-1304, 1998a.
- DUBEY, J.P., HARTLEY, W.J., LINDSAY, D.S., TOPPER, M.J. Fatal congenital Neospora caninum infection in a lamb. **J. Parasitol.**, v.76, p.127-130, 1990b.
- DUBEY, J.P., HATTEL, A.L., LINDSAY, D.S., TOPPER, M.J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of cause the causative agente and experimental transmission. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.193, n.10, p.1259-1263, 1988b.
- DUBEY, J.P., HOLLIS, K., ROMAND, S., et al. High prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Int. J. Prasilol.**, v.29, p. 1709-1711, 1999b.
- DUBEY, J.P., KERBER, C.E., GRANSTROM, D.E. Sorologic prevalence os *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in horse in Brazil. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.215, p.970-972, 1999d.
- DUBEY, J.P., LIDDELL, S., MATTSON, D., SPEER, C.A., HOWE, D.K., JENKINS, M.C. Characterizacion of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. **J. Parasitol.**, v.87, p.345-353, 2001.
- DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Vet. Parasitol.**, v. 67, p.1-59, 1996a.
- DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocyst. **Parasitol. Res.**, v. 86, p. 165-168, 2000.
- DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.2, p.230-233, 1990c.
- DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. Neosporosis. **Parasitol. Today.**, v.9, p.452-458, 1993.

- DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., ADAMS, D.S., GAY, J.M., BASZLER, T.V., BLAGBURN, B.L., THULLIEZ, P. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. **Am. J. Vet. Res.**, v.57, n.3, p.329-335, 1996b.
- DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., SPEER, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.11, n.2, p.267-299, 1998b.
- DUBEY, J.P., MILLER, S., LINDSAY, D.S., TOPPER, M.J. *Neospora caninum*-associated myocarditis and encephalitis in a aborted calf. **J. vet. Diagn. Invest.**, v.2, p.66-69, 1990d.
- DUBEY, J.P., MORALES, J.A., VILLALOBOS, P., LINDSAY, D.S., BLAGBURN, B.L., TOPPER, M.J. Neosporosis-associated abortion in a dairy goat. **J. Am. Vet. Assoc.**, v.208, p.263-265, 1996c.
- DUBEY, J.P., PORTERFIELD, M.L. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. **J. Parasitol.**, v.76, p.732-734, 1990a.
- DUBEY, J.P., ROMAND, S., HILALI, M., KWOK, °C.H., THULLIEZ, P. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in water buffaloes (*bubalus bubalis*) from Egypt. **Int. J. Parasitol.**, v.28, p.527-529, 1998b.
- DUBEY, J.P., VENTURINI, L., MCKINNEY, J., PECORARO, M. Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in horse from Argentina. **Vet. Parasitol.**, v.86, p.59-62, 1999c.
- DUBEY, JP, HILL DE, LINDSAY DS, JENKINS MC, UGGLA A, SPEER CA. *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* are separate species. **Trends Parasitol.**, v.18, p.66-69, 2002a.
- DUBEY., J.P., ROMAND, S., THULLIEZ, P., KWOK, °C.H., SHEN, S.K., GAMBLE, H.R. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horse in North America. **J. Parasitol.**, v.85, p.968-969, 1999e.
- ELLIS, J.T. Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Parasitol.**, v. 28, p.1053-1060, 1998.
- ELLIS, J.T., LUTON, K., BAVERSTOCK, P.R., BRINDLEY, P.J., NIMMO, K.A., JOHNSON, A.M. The phylogeny of *Neospora caninum*. **Mol Biochem Parasitol.**, v.64, p.303-311, 1994.
- FERNANDES, C.G. Doenças da Reprodução. In: RIET-CORREA, F., SCHILD, A.L., MÉNDEZ, M.D.C. Doença de ruminantes e eqüinos. Ed. Universitária/UFPel, 1998. 651p.
- FIORETTI, D.P., ROSIGNOLI, L., RICCI, G., MORETTI, A., PASQUALI, P., POLIDORI, G.A. *Neospora caninum* infection in a clinically healthy calf: parasitological study and sorological follow-up. **J. Vet. Med. B.**, v.47, p. 47-53, 2000.
- FRENKEL JK, DUBEY JP. The taxonomic importance of obligate heteroxeny: distinction of *Hammondia hammondi* from *Toxoplasma gondii*--another opinion. **Parasitol Res.**, v. 10, p. 783-786, 2000.
- FRENKEL, J.K., MEHLHORN, H., HEYDORN, A.O. Beyond the oocyst: over the molehills and moutains of coccidialand. **Parasitol. Today.**, v.3, p. 250-252, 1987.

- FUJII, T.U., KASAI, N., NISHI, S.M., DUBEY, J.P., GENNARI, S.M. Seroprevalence of *Neospora caninum* in female water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the southeastern region of Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.99, p.331-334, 2001.
- GONDIM, L.F., SARTOR, I.F., HASEGAWA, M., YAMANE, I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.86, p.71-75, 1999a.
- GONDIM, L.F., SARTOR, I.F., MONTEIRO JR. L.A., HARITANI, M. *Neospora caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil. **New. Zealand Vet. J.**, v. 47, p.35, 1999b.
- GONDIM, L.F.P., GAO, L., McALLISTER, M.M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. **J. Parasitol.**, v.88, p.1159-1163, 2002.
- GONDIM, L.F.P., McALLISTER, M.M., WILLIAM, C.P., DORIS, E.Z. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int. J. Parasitol.**, v.34, p.159-161, 2004.
- GONDIM, L.F.P., PINHEIRO, A.M., SANTOS, P.O.M., et al. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of naturally infected dog and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Vet Parasitol.**, v.101, p.1-7, 2001.
- GONDIM, L.F.P., SOUZA, R.M., GUIMARÃES, J.E., ALMEIDA, M.A.O. Frequência de anticorpos contra *Neospora caninum* em búfalos criados no estado da Bahia. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, SALVADOR, Brazil, 1999c, vol.11, p.227.
- GOTTSTEIN, B., HENTRICH, B., WYSS, R., THÜR, B., BUSATO, A., STÄRK, K.D., MÜLLER, N. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. **Int. Parasitol.**, v.28, p. 679-691, 1998.
- GRAY, M.L., HARMON, B.G., SALES, L., DUBEY, J.P. Visceral neosporosis in a 10-year-old horse. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.8, p.130-133, 1996.
- GUARINO, A., FUSCO, G., SAVINI, G., Di FRANCESCO, G., CRIONGOLI, G. Neosporosis in water buffalo (*bubalus bubalis*) in southern Italy. **Vet. Parasitol.**, v.91, p.15-21, 2000.
- GUIMARAES JS JR, SOUZA SL, BERGAMASCHI DP, GENNARI SM. 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, p. 1-2, 2004.
- GUO, Z.G., JOHNSON, A.M. Genetic comparasion of *Neospora caninum* with *Toxoplasma* and *Sarcocystis* by random amplified polymorphic DNA-polimerase chain reaction. **Parasitol. Res.**, v.81,p.365-370, 1995.
- GUPTA, G.D., LAKRITZ, J., KIM, J.H., KIM, D.Y., KIM, J,K, MARSH, A.E. Seroprevalence of *Neospora*, *Toxoplasma gondii*, and *Sarcocystis neurona* antibodies in horse from Jeju island, South Korea. **Vet Parasitol.**, v.106, p.193-201, 2002.
- HAMIR, A.N., TORNQUIST, S.J., GERROS, T.C., TOPPER, M.J., DUBEY, J.P. *Neospora caninum*- associated equine protozoal myeloencephalitis. **Vet. Parasitol.**, v.79, p.269-274, 1998.

- HATTEL, A.L., CASTRO,M.D.,GUMMO,J.D., WEINSTOCK,D., REED,J.A., DUBEY,J.P. Neosporosis-associated bovine abortion in Pennsylvania. **Vet. Parasitol.**, v.74, p.307-313,1998.
- HAY, W.H., SHELL, L.G., LINDSAY, D.S., DUBEY, J.P. Diagnosis and treatment of *Neospora caninum* infection in a dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.197, p.87-89, 1990.
- HELMAN, R.G., STAIR, E.L., LEHENBAUER, T.W., RODGERS, S., SALIKI, T. Neosporal abortion in Oklahoma cattle with emphasis on the distribution of brain lesions in aborted fetuses. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.10, p.292-295, 1998.
- HELMICK, B., OTTER, A., McGARRY, J., BUXTON, D. Serological investigation of aborted sheep and pigs for infection by *Neospora caninum*. **Res. Vet. Sci.**, v.73, p.187, 2002.
- HERNANDEZ, J., RISCO, C., DONOVAN, A. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.219, p.632-635, 2001.
- HILL DE, LIDDELL S, JENKINS MC, DUBEY JP. Specific detection of *Neospora caninum* oocysts in fecal samples from experimentally-infected dogs using the polymerase chain reaction. **J Parasitol.**, v.87, p. 395-398, 2001.
- HO, M.S.Y., BARR, B.C., MARSH, A.E., ANDERSON, M.L., ROWE, J.D., TARANTAL, A.F., HENDRICKX, A.G., SVERLOW, K., DUBEY, J.P., CONRAD, P.A. Identification of bovine *Neospora* parasites by PVCR amplification and specific small-subunit rRNA sequence probe hybridization. **J. Clin. Microbiol.**, v.34, n.5, p.1203-1208, 1996.
- HOLMDAHL, O.J.M., MATTSON, J. Rapid and sensitive identification of *Neospora caninum* by in vitro amplification of the internal transcribed spacer 1. **Parasitol.**, v.112, p-177-182, 1996.
- HONG, C.B., GILES, JR. C. NEWMAN, L.E., FAYER, R. Sarcocystosis in na aborted bovine fetus. **J.Am.Vet. Med. Assoc.**, v. 181, p.585-588, 1982.
- HUBBERT, W.T.; DENNIS, S.M.; ADAMS, C.J et al., Recommendations for Standardizing Bovine Reproductive Terms. p.217-237, 1971.
- HUONG, L.T.T., LJUNGSTROM, 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, p.53-57, 1998.
- INNES, E.A., PANTON, W.R., MARKS, J., TREES, A.J., HOLMDAHL, J., BUXTON, D. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H Uracil. **J. Comp. Path.**, v.113, p.95-100, 1995.
- INNES, E.A., ANDRIANARIVO, A.C., BJÖRKMAN, C., WILLIAMS, D.J.L., CONRAD, P.A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trens Parasitol.**, v.18, p.497-504, 2002.
- INNES, E.A., BUXTON, D., MALEY, S., WRIGHT, S., MARKS, J., ESTEBAN, I., RAE, A., SCHOCK, A., WASTLING, J. Neosporosis. Aspects of epidemiology and host immune response. **Ann N Y Acad Sci.**, v.916.,p. 93-101, 2000.

- INNES, E.A., ESTEBAN-REDONDO, I., SWALES, C et al. Local and systemic immune responses in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. **COST 820 annual workshop**, 1999, Interlaken, Switzerland.
- INNES, E.A., LUNDEN, A., ESTEBAN, I., et al. A previous infection with *Toxoplasma gondii* does not protect against a challenge with *Neospora caninum* in pregnant sheep. **Parasite immunol.**, v.23., p.121-132, 2001a.
- INNES, E.A., WRIGHT,S.E., MALEY, S et al. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. **Int. J. Parasitol.**, v.31, p.1523-1534, 2001b.
- JAKUBEK, E.B., BRÖJER, C., REGNERSEN, C., UGGLA, A., SCHARES, G., BJORKMAN, C. Seroprevalences of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Swedish red foxes (*Vulpes vulpes*). **Vet Parasitol.**, v.102, p.167-172, 2001.
- JARDINE, J.E. The ultrastructure of bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. **Vet Parasitol.**, v.62, p.231-240, 1996.
- JENKINS, M., BASZLER, T., BJORKMAN, C., SCHARES, G., WILLIAMS, D. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **Int J Parasitol.**, v. 32, p. 631-636, 2002.
- JOLLEY, W.R., McALLISTER, M.M., McGUIRE, A.M., WILLS, R.A. Repetitive abortion in *Neospora*- infected ewes. **Vet. Parasitol.**, v.82., p.251-257, 1999.
- KASHIWAZAKI, Y., GIANNEECHINI, R.E., LUST, M., GIL, J. Seroepidemiology of neosporosis in dairy cattle in Uruguay. **Vet . Parasitol.**, v.120, p.139-144, 2004.
- KHAN, I.A., SCHWARTZMAN, J.D., FONSEKA, S., KASPER, L.H. *Neospora caninum*: Role for Immune Cytokines is Host Immunity. **Experimental Parasitology.**, v.85, p.24-24, 1997.
- KIRKBRIDE, C.A. Etiologic agents detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.4, p. 175-180, 1992.
- KIRKBRIDE, C.A. **Laboratory diagnosis of livestock abortion**. 3ed. Iowa State University Press, 1990, 260p.
- KOBAYASHI, Y., YAMADA, M., OMATA, Y, et al. Naturally occurring *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses. **J. Parasitol.**, v.87, p.434-436, 2001.
- KOYAMA, T., KOBAYASHI, Y., OMATA, Y., et al. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a pregnant sheep. **J. Parasitol.**, v.87, p.1486-1488, 2001.
- LALLY, N.C., JENKIAS, M.C., DUBEY, J.P. Development of a polymerase chain reaction assay for the diagnosis of neosporosis using the *Neospora caninum* 14-3-3 gene. **Mol. Biochem. Parasitol**, v.75, p.169-178, 1996.
- LANDMANN J.K., JILLELLA, D., O'DONOGHUE, P.J., McGOWAN, M.R. Confirmation of the prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle by the use os embryo transfer. **Aust. Vet. J.**, v.80, p.502-503, 2002.
- LINDSAY, D.S., DUBEY, J.P. Canine neosporosis. **J. Vet Parasitol.**, v.14, p.1-11, 2000.
- LINDSAY, D.S., DUBEY, J.P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **Am. J. Vet. Res.**, v.50, p.1981-1983, 1989a.

- LINDSAY, D.S., DUBEY, J.P., DUNCAN, R.B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Vet. Parasitol.**, v.82, p. 327-333, 1999c.
- LINDSAY, D.S., DUBEY, J.P., McALLISTER, M.M *Neospora caninum* and potencial for parasite transmission. **Compendium**, v.21, p.317-321, 1999a.
- LINDSAY, D.S., KELLY, E.J., McKOWN, R.D., STEIN, F.J., PLOZER, J., HERMAN, J., BLAGBURN, B.L., DUBEY, J.P. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) experimental infections of coyotes with *Neospora caninum*. **J. Parasitol.**, v.82, p.657-659, 1996a.
- LINDSAY, D.S., RIPPEY, N.S., POWE, T.A., SARTIN, E.A., DUBEY, J.P., BLAGBURN, B.L. Abortion, fetal death, and stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. **Am. J. Vet. Res.**, v.56., p.1176-1180, 1995.
- LINDSAY, D.S., SPENCER, J., RUPPRECHT, C.E., BLAGBURN, B.L. Prevalence of agglutinating antibodies to *Neospora caninum* rancoons, *Procyon lotor*. **J. Parasitol.**, v.87, p.1197-1198, 2001b.
- LINDSAY, D.S., STEINBERG, H., DUBIELZIG, R.R, et al. Central nervous system neosporosis in a foal. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.8, p.507-510, 1996b.
- LINDSAY, D.S., UPTON, S.J., DUBEY, J.P. A strutral study of the *Neospora caninum* oocyst. **Int. J. Parsitol.**, v.29, p.1521-1523, 1999b.
- LINDSAY, D.S., WESTON, J.L., LITTLE, S.E. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in gray foxes (*Urocyon cinereorgenteus*) from South Carolina. **Vet. Parasitol.**, v.97, p.159-164, 2001a.
- LINDSAY, D.S., DUBEY, J.P. Evaluation of anti-coccidial drug's inhibition of *Neospora caninum* development in cell cultures. **J. Parasitol.**, v.75, p.990-992, 1989b.
- MACALDOWIE C, MALEY SW, WRIGHT S, BARTLEY P, ESTEBAN-REDONDO I, BUXTON D, INNES EA. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. **J Comp Pathol.**, v. 131, p. 142-156, 2004.
- MAGNINO, S., VIGO, P.G., FABBI, M. Isolation of bovine *Neospora* from a newborn calf in Italy. **Vet Rec.**, v. 144, p. 415-417, 1999.
- MALEY, S.W., BUXTON, D., ERA, A.G., WRIGHT, S.E., SCHOCK, A., BARTLEY, P.M., ESTEBAN-REDONDO, I., SWALES, C., HAMILTON, C.M., SALES, J., INNES, E.A. The Pathogenesis of Neosporosis in Pregant Cattle: Inoculation at Mid-gestation. **J. Comp. Path.**, v.129, p. 186-195, 2003.
- MARSH, A.E., BARR, B.C., MADIGAN, J., LAKRITZ, J., NORDHAUSEN, R., CONRAD, P.A. Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.209, p.1907-1913, 1996.
- 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, p. 983-991, 1998.
- MARSH, A.E., BARR, B.C., SVERLOW, K., HO, M., DUBEY, J.P., CONRAD, P.A. Sequence analysis and comparison of ribossomal DNA from bovine *Neospora caninum* to similar coccidial parasites. **J. Parasitol.**, v. 81, p. 530-535, 1995.

- McALLISTER, M.M. Uncovering the biology and epidemiology of *Neospora caninum*. **Parasitol. Today.**, v.15, p.216-217, 1999.
- McALLISTER, M.M., DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., JOLLEY, W.R., WILLS, R.A., McGUIRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int. J. Parasitol.**, v.28, p.1473-1478, 1998.
- McALLISTER, M.M., McGUIRE, A.M., JOLLEY, W.R., LINDSAY, D.S., TREES, A.J., STOBART, R.H. Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. **Vet. Parasitol.**, v.33, p.647-655, 1996.
- McDOLE, M.G., GAY, J.M. Seroprevalence of antibodies against *Neospora caninum* in diagnostic equine serum samples and their possible association with fetal loss. **Vet. Parasitol.**, v.105, p.257-260, 2002.
- McNAMEE, P.T., TREES, A.J., GUY, F., MOFFETT, D., KILPATRICK, D. The diagnosis and prevalence of neosporosis in Northern Ireland cattle. **Vet Rec.**, v.138, p.419-420, 1996.
- MEHLHORN, H., HEYDORN, A.O. *Neospora caninum*: is it really different from *Hammondia heydorni* or is it a strain of *Toxoplasma gondii*? An opinion. **Parasitol Res.**, v. 86, p. 169-178, 2000.
- MINEO, T.W.P., SILVA, D.A.O. COSTA, G.H.N., et al. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in veterinary hospital from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.98, p. 239-245, 2001.
- MOORE, D.P., CAMPERO, C.M., ODEÓN, A.C., POSSO, M.A., CANO, D., LEUNDA, M.R., BASSO, W., VENTURINI, M.C., SPÄTH, E. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. **Vet Parasitol.**, v.107, p.303-316, 2002.
- MORALES, E., TRIGO, F.J., PUENTE, E., SANTACRUZ, M. Neosporosis in Mexican dairy herds: Lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. **J. Com. Pathol.**, v.125, p.58-63, 2001.
- MUGRIDGE NB, MORRISON DA, JAKEL T, HECKEROTH AR, TENTER AM, JOHNSON AM. Effects of sequence alignment and structural domains of ribosomal DNA on phylogeny reconstruction for the protozoan family sarcocystidae. **Mol Biol Evol.**, v.17, p.1842-1853, 2001.
- MUGRIDGE, N.B., MORRISON, D.A., HECKEROTH, A.R., JOHNSON, A.M., TENTER, A.M. Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more close related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p.1545-1556, 1999.
- NIETFIELD, J.C., DUBEY, J.P., ANDERSON, M.L., LIBAL, M.C., YAEGER, M.J., NEIGER, R.D. Neospora-like protozoan infection as a cause of abortion in dairy cattle. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.4, p.223-226, 1992.
- O'HANDLEY, R., LIDDELL, S., PARKER, C., JENKINS, M., DUBEY, J.P. Experimental infection of sheep with *Neospora caninum* oocysts. **J. Parasitol.**, v.88, p.1120-1123, 2002.
- OOI, H.K., HUANG, C.C., YANG, C.H., LEE, S.H. Serological survey and first finding of *Neospora caninum* in Taiwan, and detection of its antibodies in various body fluids of cattle. **Vet. Parasitol.**, v.90, p.47-55, 2000.

- ORDEIX, L., LLORET, A., FONDEVILA, D., DUBEY, J.P., FERRER, L., FONDATI, A. Cutaneous neosporosis during treatment of pemphigus foliaceus in a dog. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v.38, p.415-419, 2002.
- 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, p.602-606, 1995.
- OTTER, A., JEFFREY, M., SCHOLLES, S.F., HELMICK, B., WILESMITH, J.W., TREES, A.J. Comparison of histology with maternal and fetal serology for the diagnosis of abortion due to bovine neosporosis. **Vet Rec.**, v.79, p.19-34, 1997a.
- OTTER, A., WILSON, B.W., SCHOLLES, S.F.E., JEFFREY, M., MELMICK, B., TREES, A.J. Results of a survey to determine whether *Neospora* is a significant cause of ovine abortion in England and Wales. **Vet Rec.**, v.140, p.175-177, 1997b.
- PARÉ, J., FECTEAU, G., FORTIN, M., MARSOLAIS, G. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.213, p. 1595-1598, 1998.
- PARÉ, J., HIETALA, S.K., THURMOND, M.C. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. Infection in cattle. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.7, p.325-359, 1995a.
- PARÉ, J., HIETALA, S.K., THURMOND, M.C. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.7, p.273-275, 1995b.
- PARE, J., THURMOND, M.C., HIETALA, S.K. Congenital *Neospora* infection in dairy cattle. **Vet. Rec.**, v.134, p.531-532, 1994.
- PATITUCCI, A.N., PHIL, M., PÉREZ, M.J., ROZAS, M.A., ISRAEL, K.F. *Neosporosis canina*: presencia de anticuerpos séricos en poblaciones caninas rurales y urbanas de Chile. **Arch Med Vet.**, v.33, p.227-232, 2001.
- PAYNE, S., ELLIS, J. Detection of *Neospora caninum* DNA by the polymerase chain reaction. **Int. J. Parasitol.**, v.26, n°4, p.347-351, 1996.
- PERLÉ, K.M.D., DEL PIERO, F., CARR, R.F., HARRIS, C., STROMBERG, P.C. Cutaneous neosporosis in two adult dogs on chronic immunosuppressive therapy. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.13, p.252-255, 2001.
- PETERS M., WOHLSEIN, P., KNIERIEM, A., SCHARES, G. *Neospora caninum* infection associated with stillbirths in captive antelopes (*Tragelaphus imberbis*). **Vet Parasitol.**, v.97, p.153-157, 2001b.
- PETERS, M., LUTKEFELS, E., HECKEROTH, A.R., SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **Int. J. Parasitol.**, v.31, p.1144-1148, 2001a.
- PETERS, M., WAGNER, F., SCHARES, G. Canine neosporosis: clinical and pathological findings and first isolation of *Neospora caninum* in Germany. **Parasitol. Res.**, v.86, p.1-7, 2000.
- PIPANO, E., SHKAP, V., FISH, L., SAVITSKY, I., PERL, S., ORGAD, U. Susceptibility of *Psammomys obesus* and *Meriones tristrami* to tachyzoites of *Neospora caninum*. **J. Parasitol.**, v.88, p.314-319, 2002.

- PITEL., P.H., PRONOST, S., ROMAND, S., THULLIEZ, P., FORTIER, G., BALLEZ, J.J. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horse in France. **Equine Vet. J.**, v.33, p.205-207, 2001.
- PROPHET, E.H., MILLS, B., ARRINGTON, J.B., SOBIN, L.H. **Laboratory methods in histotechnology.** Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology, Washington, 1992, 279p.
- QUINN, H.E., ELLIS, J.T., SMITH, N.C. *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? **Trends Parasitol.**, v. 18, p.391-394, 2002.
- REICHEL, M.P., THORTON, R.N., MORGAN, P.L., MILLS, R.J.M., SCHARES, G. Neosporosis in a pup. **N.Z. Vet. J.**, v.46, p106-110, 1998.
- ROMAND, S., THULLIEZ, P., DUBEY, J.P. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infections. **Parasitol. Res.**, v.60, p.50-53, 1998.
- ROMERO, J.J., PÉREZ, E., FRANKENA, K. Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rica dairy cows under field conditions. **Vet. Parasitol.**, v.123, p.149-159, 2004.
- RUEHLMANN, D., PODELL, M., OGLESBEE, M., DUBEY, J.P. Canine neosporosis: A case report and literature review. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v.31, p.174-183, 1995.
- SAGER, H., FISCHER, I., FURRER, K., et al. A swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. **Vet Parasitol.**, v.102, p.1-15, 2001.
- SCHARES, G., HEYDORN, A.O., CUPPERS, A., CONRATHS, F.J., MEHLHORN, H. *Hammondia heydorni*-like oocysts shed by a naturally infected dog and *Neospora caninum* NC-1 cannot be distinguished. **Parasitol Res.**, v.87, p.808-816, 2001.
- SCHARES, G., PETERS, M., WURM, R., BARWALD, A., CONRATHS, F.J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analyzed by serological techniques. **Vet. Parasitol.**, v.80, p.87-98, 1998.
- SIMPSON, V.R., MONIES, R.J., RILEY, P., CROMEY, D.S. Foxes and neosporosis. **Vet Rec.**, v.141, p.503, 1997.
- SLAPETA JR, KOUDELA B, VOTYPKA J, MODRY D, HOREJS R, LUKES J. Coprodiagnosis of *Hammondia heydorni* in dogs by PCR based amplification of ITS 1 rRNA: differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*. **Vet J.**, v.163, p.147-154, 2002.
- SLOTVED, H.C., JENSEN, L., LIND, P. Comparison of the IFAT and Iscom-ELISA response in bovine foetuses with *Neospora caninum* infection. **Int. J. Parasitol.**, v.29, p.1165-1174, 1999.
- SÖNDGEN, P., PETERNS, M., BÄRWALD, A., WURM, R., HOLLING, F., CONRATHS, F.J., SCHARES, G. Bovine neosporosis: immunoblot improves foetal serology. **Vet. Parasitol.**, v.109, p.157-167, 2001.
- SPEER, C.A., DUBEY, J.P., McALLISTER, M.M., BLIXST, J.A. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p.1509-1519, 1999.

- SPENCER JA, WITHEROW AK, BLAGBURN BL. A random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction technique that differentiates between *Neospora* species. **J Parasitol.**, v.86, p.1366-1368, 2000.
- STRAFUSS, A.C. **Necropsy: Procedures and Basic Diagnostic Methods for Practicing Veterinarians.** Charles C. Thomas, 1988, 244p.
- TARANTINO, C., ROSSI, G., KRAMER, L.H., PERRUCCI, S., CRINGOLI, G., MACCHIONI, G. *Leishmania infantum* and *Neospora caninum* simultaneous skin infection in a young dog in Italy. **Vet. Parasitol.**, v.102, p.77-83, 2001.
- THILSTED, J.P., DUBEY, J.P. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.1, p.205-209, 1989.
- THORNTON, R.N., THOMPSON, E.J., DUBEY, J.P. *Neospora* abortion in New Zealand cattle. **N.Z. Vet. J.**, v. 39, p.129-133, 1991.
- THURMOND, M., HIETALA, S., BLANCHARD, P., DEBEY, S. 1995b Congenital transmission of *Neospora caninum* in herds experiencing endemic or epidemic abortion. **Abstract. Proc.38th Am.Meet. Am.Assoc. Vet. Lab. Diagn.**, Sparks, Nevada, p.97.
- THURMOND, M.C., ANDERSON, M.L., BLANCHARD, P.C. Secular and seasonal trends of *Neospora* abortion in California dairy cows. **J. Parasitol.**, v.81, p.364-367, 1995a.
- THURMOND, M.C., HIETALA, S.K. 1999. *Neospora caninum* infection and abortion in cattle. In: Smith, H., Current Veterinary Therapy 4: Food Animal Practice. Saunders, Philadelphia, PA, pp. 425-431.
- THURMOND, M.C., HIETALA, S.K. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortion in dairy cattle. **J. Am.Vet. Res.**, v.58, p.1381-1385, 1997a.
- THURMOND, M.C., HIETALA, S.K., BLANCHARD, P.C. Herd-based diagnosis of *Neospora caninum*-induced abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.9,p.44-49, 1997b.
- THURMOND, M.C., PICANSO, J.P., JAMERSON, C.M. Considerations for use of descriptive epidemiology to investigate fetal loss in dairy cows. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.197, p.1305-1312, 1990.
- 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, p.405-407, 1994.
- VÁCLAVEK, P., KOUDELA, B., MODRÝ, D., SEDLÁK, K. Seroprevalence of *Neospora caninum* in aborting dairy cattle in the Czech Republic. **Vet. Parasitol.**, v.115, p.239-245, 2003.
- VAN MAANEN, C., WOUDA, W., SCHARES, G., VON BLUMRÖDER, D., CONRATHS, F.J., NORTON, R., WILLIAMS, D.J.L., ESTEBAN-REDONDO, I., INNES, E.A, MATTSSON, J.G., BJÖRKMAN, C., FERNÁNDEZ-GARCÍA, A., ORTEGA-MORA, L.M., MÜLLER, N., SAGER, H., HEMPHILL, A. Na interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine fetal tissues. **Vet. Parasitol.**, v.126, p.351-364, 2004.

- VANDELEON, D., MARSH, A.E., THORNE, J.G., LOCH, W., YOUNG, R., JOHNSON, P.J. Prevalence of *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horse from various geographical locations. **Vet. Pathol.**, v.95, p.273-282, 2001.
- WILLIAMS DJ, GUY CS, MCGARRY JW, GUY F, TASKER L, SMITH RF, MACEACHERN K, CRIPPS PJ, KELLY DF, TREES AJ. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. **Parasitology.**, v.121, p. 347-358, 2000.
- WILLIAMS, J.H., ESPIE, I., van WILPE, E., MATTHEE, A. Neosporosis in a white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) calf. **Tydskr. S. Afr. Vet. Ver.**, v.73, p. 38-43, 2002.
- WOLFE, A., HOGAN, S., MAGUIRE, D., et al. Red foxes (*Vulpes vulpes*) in Ireland as hosts for parasites of potential zoonotic and veterinary significance. **Vet Rec.**, v.149, p.759-763, 2001.
- WOODS, L.W., ANDERSON, M.L., PAMELA, K.S., SVERLOW, K.W. Systemic neosporosis in a California black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.6, p.508-510, 1994.
- WOUDA , W., VAN DEN INGH, T.S., VAN KNAPEN, F., SLUYTER, F.J., KOEMAN, J.P., DUBEY, J.P. Neospora abortion in cattle in The Netherlands. **Tijdschr Diergeneeskd.**, v.117, p. 599-602, 1992.
- WOUDA, W., DUBEY, J.P., JENKINS, M.C. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. **J. Parasitol.**, v.83, p.545-547, 1997b.
- WOUDA, W., MOEN, A.R., DAMSMA, A, et al. Bovine neosporosis: 1. Lesions and parasites in aborted fetuses. 2. Repeated transplacental transmission. **Proc Meet Eur Soc Vet Pathol**, v. 12, p.29, 1994.
- WOUDA, W., MOEN, A.R., SCHUKKEN, Y.H. Abortion risk in progeny of cows after a neospora caninum epidemic. **Theriogenology.**, v.49, p.1311-1316, 1998.
- WOUDA, W., MOEN, A.R., VISSER, I.J.R., VAN KNAPEN, F. Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 9, p. 180-185, 1997a.
- YAMANE, I., KITANI, H., KOKUHO, T., SHIBAHARA, T., HARITANI, M., HAMAOKA, T., SHIMIZU, S., KOIWA, M., SHIMURA, K., YOKOMIZO, Y. The inhibitory effect of Interferon Gamma and Tumor Necrosis Factor Alpha on Intracellular Multiplication of *Neospora caninum* in Primary Bovine Brain Cells. **Parasitology.**, v. 62, p.347-351, 2000.
- YAMANE, I., KOKUHO, T., SHIMURA, K., ETO, M., SHIBAHARA, T., I, M., OUCHI, Y., SVERLOW, K., CONRAD, P.A. In vitro isolation and characterization of a bovine *Neospora* species in Japan. **Res. Vet. Sci.**, v. 63, p. 77-80, 1997.