

## Diagnóstico e Controle da Neosporose em Bovinos



**República Federativa do Brasil**

*Luiz Inácio Lula da Silva*  
Presidente

**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**  
*Roberto Rodrigues*  
Ministro

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

**Conselho de Administração**  
*José Amauri Dimárzio*  
Presidente

*Clayton Campanhola*  
Vice-Presidente

*Alexandre Kalil Pires*  
*Dietrich Gerhard Quast*  
*Sérgio Fausto*  
*Urbano Campos Ribeiral*  
Membros

**Diretoria-Executiva**  
*Clayton Campanhola*  
Diretor-Presidente

*Gustavo Kauark Chianca*  
*Herbert Cavalcante de Lima*  
*Mariza Marilena T. Luz Barbosa*  
Diretores-Executivos

**Embrapa Gado de Corte**  
*Kepler Euclides Filho*  
Chefe-Geral

# **Documentos** 136

## **Diagnóstico e Controle da Neosporose em Bovinos**

Renato Andreotti  
Rosangela Locatelli-Dittrich  
Vanete Thomaz Soccol  
Fernando Paiva

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Gado de Corte**

Rodovia BR 262 Km 4, CEP 79002-970 Campo Grande, MS

Caixa Postal 154

Fone: (67) 368 2064

Fax: (67) 368 2180

<http://www.cnpqg.embrapa.br>

E-mail: [sac@cnpqg.embrapa.br](mailto:sac@cnpqg.embrapa.br)

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: *Cacilda Borges do Valle*

Secretário-Executivo: *Liana Jank*

Membros: *Antonio do Nascimento Rosa, Antonio ~~Portt~~, Ecila*

*Carolina Nunes Zampieri Lima, Ezequiel Rodrigues do Valle, José*

*Raul Valério, Liana Jank, Maria Antonia Martins de Ulhôa Cintra,*

*Rosângela Maria Simeão Resende, Tênisson Waldow de Souza*

Supervisor editorial: *Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima*

Revisor de texto: *Lúcia Helena Paula do Canto*

Normalização bibliográfica: *Maria Antonia M. de Ulhôa Cintra*

Foto da capa: *Gisele Rosso*

Capa: *Paulo Roberto Duarte Paes*

Editoração eletrônica: *Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima*

**1ª edição**

1ª impressão (2003): 500 exemplares

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.

Embrapa Gado de Corte.

---

Diagnóstico e controle da neosporose em bovinos / Renato Andreotti... [et al.]. -- Campo Grande : Embrapa Gado de Corte, 2003.

51 p. ; 21 cm. -- (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1517-3747 ; 136)

ISBN 85-297-0153-4

1. Bovino - Doença. 2. *Neospora caninum*. 3. Neosporose - Diagnóstico. 4. Sanidade animal. 5. Reprodução animal. I. Andreotti, Renato. II. Locatelli-Dittrich, Rosangela. III. Soccol, Vanete Thomaz. IV. Paiva, Fernando. V. Embrapa Gado de Corte (Campo Grande, MS). VI. Título. VII. Série.

CDD 636.08981 (21. ed.)

© Embrapa 2003

# **Autores**

## **Renato Andreotti**

Médico-Veterinário, Ph.D., CRMV-MS Nº 510, Embrapa Gado de Corte, Rodovia BR 262, Km 4, Caixa Postal 154, 79002-970 Campo Grande, MS. Correio eletrônico: andreott@cnpqg.embrapa.br

## **Rosangela Locatelli-Dittrich**

Médica-Veterinária, Ph.D., CRMV-PR Nº 2241, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Departamento de Medicina Veterinária, Rua dos Funcionários, 1540 - Juvevê, 80035-050 Curitiba, PR. Correio eletrônico: roslocdi@ufpr.br

## **Vanete Thomaz Soccol**

Médica-Veterinária, Ph.D., Universidade Federal do Paraná – UFPR, Departamento de Patologia Básica, Rua dos Funcionários, 1540 - Juvevê, 80035-050 Curitiba, PR. Correio eletrônico: vasoccol@ufpr.br

## **Fernando Paiva**

Médico-Veterinário, Ph.D., Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Departamento de Patologia, Caixa Postal 649, 79070-900 Campo Grande, MS. Correio eletrônico: fernando@nin.ufms.br



# Sumário

<b>Resumo</b> .....	<b>7</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>9</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>10</b>
<b>Biologia de <i>Neospora caninum</i></b> .....	<b>11</b>
Hospedeiros .....	11
Estádios evolutivos .....	12
Taquizoítas .....	12
Bradizoítas .....	13
Oocistos .....	14
<b>Ciclo Biológico</b> .....	<b>15</b>
Transmissão vertical .....	17
Infecção lactogênica .....	18
<b>Distribuição Geográfica de <i>Neospora caninum</i></b> .....	<b>18</b>
<b>Sinais Clínicos de Neosporose e Patogênese do Aborto</b> ..	<b>21</b>
Bovinos .....	21
<b>Diagnóstico de Neosporose</b> .....	<b>25</b>
Métodos de diagnóstico sorológico .....	25
Reação de imunofluorescência indireta – IFI .....	27
Teste imunoenzimático - <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> - ELISA ..	29
Bovinos adultos e casos de aborto .....	30
Fetos bovinos e bezerros .....	32
Limitações da sorologia .....	32

Diagnóstico parasitológico .....	33
Exame a fresco .....	34
Exame histopatológico .....	35
Exame imuno-histoquímico .....	36
Exame de fezes em cães .....	37
Isolamento de <i>Neospora caninum</i> .....	37
<i>Isolamento in vitro</i> .....	38
<i>Isolamento in vivo</i> .....	40
Reação da polimerase em cadeia – PCR .....	41
<b>Diagnóstico Diferencial .....</b>	<b>43</b>
<b>Controle .....</b>	<b>44</b>
Estratégias para o controle da infecção congênita .....	45
Redução da infecção no rebanho por meio do descarte das vacas infectadas .....	45
Renovação do rebanho com fêmeas soronegativas .....	45
Estratégias para o controle da transmissão horizontal .....	46
Tratamento para neosporose .....	46
Imunização .....	46
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>48</b>

# Diagnóstico e Controle da Neosporose em Bovinos

*Renato Andreotti*

*Rosangela Locatelli-Dittrich*

*Vanete Thomaz Soccol*

*Fernando Paiva*

## Resumo

A neosporose em bovinos é uma doença causada pelo protozoário *Neospora caninum*, identificado pela primeira vez em 1988, em cães com encefalomielite, o hospedeiro definitivo. Estudos sorológicos de vários países demonstraram o parasita como a maior causa de abortos em rebanhos leiteiros. A doença está amplamente disseminada nos diferentes continentes. A importância econômica da neosporose bovina é atribuída principalmente aos custos associados ao aborto, ao valor dos fetos, à inseminação artificial ou à cobertura, à diminuição da produção de leite, ao aumento do descarte e à reposição dos animais. Em bovinos, os dois mecanismos de infecção por *N. caninum* são a transferência do parasita da mãe para o feto (transmissão vertical ou infecção congênita) e a ingestão de oocistos esporulados (transmissão horizontal ou infecção pós-natal). O diagnóstico depende de uma combinação entre o histórico do rebanho, sinais clínicos e dados de laboratório. O quadro clínico sugestivo de neosporose é a presença de sinais neurológicos e de polimiosite em bovinos jovens. A sorologia é utilizada como método diagnóstico nos estudos epidemiológicos de abortos causados por *N. caninum*. O sorodiagnóstico é melhor para avaliar a exposição e o risco de infecção por *N. caninum* de um rebanho, do que para o diagnóstico de aborto em um animal. A confirmação laboratorial é realizada pelo diagnóstico parasitológico, com os exames histopatológico e imuno-histoquímico, a reação em cadeia da polimerase – PCR –, e o isolamento dos parasitas mediante a inoculação do material suspeito em cultivo celular ou em animais de laboratório.

O controle da neosporose em bovinos envolve atividades de manejo, tratamento e imunização.

**Palavras-chave:** aborto, bovinos, cão, neosporose, *Neospora caninum*, reprodução.

# Diagnosis and Control of Bovine Neosporosis

## Abstract

*The bovine neosporosis is a disease caused by the Protozoa Neospora caninum, identified for the first time in 1988, in dogs with encefalomyelitis, its definitive host. Serological studies from various countries showed the parasite as the major cause of abortion in dairy cattle. The disease is widely distributed in the different continents. The economical importance of bovine neosporosis is principally attributed to the costs associated with: abortion, fetus value, artificial insemination or breeding, decrease milk production, increase in culling and animal replacement. In bovines the two mechanisms of infection by N. caninum are the parasite transfer from cow to fetus (vertical transmission or congenital infection) and the sporulated oocysts ingestion (horizontal transmission or post born infection). The diagnosis depends on the combination of herd history, clinical signs and laboratory data. The suggestive clinical profile of neosporosis is the presence of neurological signs and poliomyositis in young bovines. Serology is utilized as a diagnostic method in epidemiological studies of abortion due to N. caninum. The serodiagnosis is better to evaluate the exposition and the infection risk by N. caninum of a herd, than for the diagnosis of abortion of an animal. The laboratorial confirmation is done by parasitological diagnosis, with histopathological and immunohistochemical exams, polymerase chain reaction – PCR –, and parasite isolation by the inoculation of the suspected material in cell*

*culture or in laboratory animals. The neosporosis control in bovines involves management activities, treatment and immunization.*

**Keywords:** *abortion, bovines, dog, neosporosis, Neospora caninum, reproduction.*

## Introdução

A neosporose em bovinos é uma doença causada pelo protozoário *Neospora caninum*, um parasita intracelular obrigatório pertencente ao *phylum* Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Eucoccidiida e família Sarcocystidae. *Neospora caninum* tem como hospedeiro definitivo o cão, e como hospedeiros intermediários, os bovinos, ovinos, caprinos, cervos e eqüinos (Dubey & Lindsay, 1996).

O parasita foi identificado pela primeira vez em 1988, em cães com encefalomielite e em 1989, foi confirmado o primeiro caso de neosporose em bovinos. *Neospora caninum* é morfologicamente similar a outros protozoários apicomplexa de importância em medicina veterinária como *Toxoplasma gondii* e *Sarcocystis* sp. (Anderson et al., 2000; Dubey et al., 2002).

Durante a última década, a infecção por *N. caninum* despontou como a principal doença reprodutiva de bovinos, e estudos sorológicos de vários países demonstraram o parasita como a maior causa de abortos em rebanhos leiteiros. A doença está amplamente disseminada nos diferentes continentes, na Europa, África do Sul, Ásia, Austrália e nas Américas. Os levantamentos sorológicos para *N. caninum* têm demonstrado que, nos rebanhos leiteiros, a soroprevalência é muito variável, com taxas de 2% a 98% de positividade. A presença de *N. caninum* em rebanhos de corte indica um risco potencial para esse tipo de exploração de bovinos.

A importância econômica da neosporose bovina é atribuída principalmente aos custos associados ao aborto, ao valor dos fetos, à inseminação artificial ou à cobertura, à diminuição da produção de leite, ao aumento do descarte e à reposição dos animais. As infecções congênicas ocorrem nos bovinos leiteiros e de corte, com maior número de casos nos rebanhos leiteiros. As vacas leiteiras soropositivas produzem menos leite e são descartadas mais cedo, diminuindo a vida produtiva. Nos bovinos de corte soropositivos há maior risco de abortos e

natimortos, além do aumento do descarte por problemas reprodutivos.

No Brasil, *N. caninum* foi identificado pela primeira vez na Bahia (Gondim et al., 1999), e desde então tem sido notificado em diferentes Estados, indicando que a neosporose está difundida no país, como provável causa de abortos. Estudos sorológicos têm sido realizados em várias regiões do país, como Bahia, São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais (Andreotti et al., 1999; Corbelini et al., 2000; Locatelli-Dittrich et al., 2001). O parasita foi demonstrado em fetos bovinos em São Paulo e no Rio Grande do Sul, e cepas de *N. caninum* foram isoladas de cão, na Bahia e de feto bovino, no Paraná (Gondim et al., 2001; Locatelli-Dittrich, 2002).

No Brasil, são freqüentes casos de abortos em animais domésticos sem um diagnóstico definitivo, e a neosporose não é incluída como rotina nos exames laboratoriais. As principais razões são a falta de conhecimento do agente e da sua prevalência nos rebanhos brasileiros, as conseqüências da doença nos bovinos, o custo elevado dos *kits* diagnósticos e a difícil obtenção e manutenção da cepa do protozoário.

Este trabalho pretende oferecer informações relativas ao parasito e a importância do seu diagnóstico e controle em bovinos.

## **Biologia de *Neospora caninum***

Os estádios identificados do ciclo de vida de *N. caninum* são os taquizoítas (organismos proliferativos), os cistos com os bradizoítas (organismos de multiplicação lenta) e os oocistos (formas de eliminação pelas fezes do hospedeiro definitivo). Durante os dez últimos anos foi postulado que *N. caninum* tem um ciclo de vida de um coccídeo, mas somente em 1998 os oocistos foram observados nas fezes de cães, comprovando seu papel como hospedeiro definitivo do parasita (McAllister et al., 1998).

### **Hospedeiros**

Os hospedeiros intermediários naturais são os cães, bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos e cervos.

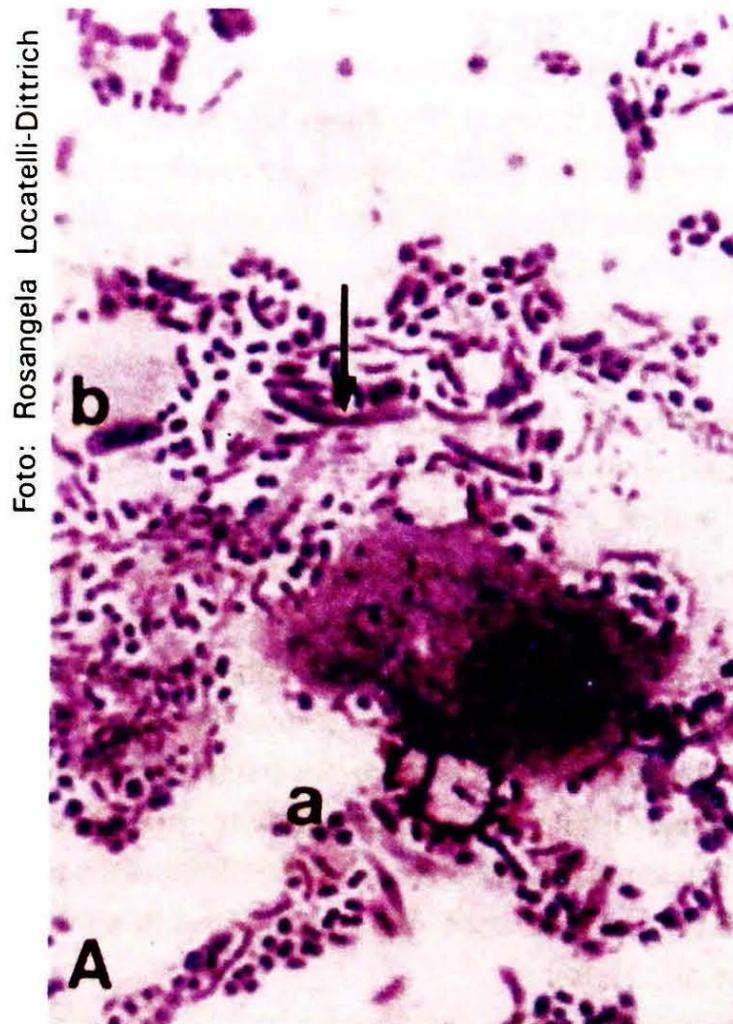
O hospedeiro definitivo natural de *N. caninum* é o cão. Os canídeos selvagens, como as raposas e os coiotes, também poderiam ser, porém, ainda não está

definitivamente comprovado o papel desses animais no ciclo do parasita.

## Estádios evolutivos

### *Taquizoítas*

Os taquizoítas são ovóides, redondos ou em forma de meia-lua, com o núcleo na posição central ou terminal, e medem de 3 a 7  $\mu\text{m}$  x 1 a 5  $\mu\text{m}$ , dependendo do estágio de crescimento e divisão, e do plano de corte nos tecidos. Na Fig. 1 pode ser observado o cultivo do parasito apresentando a forma de taquizoíta.



**Fig. 1.** Taquizoítas de *Neospora caninum*, obtidos em cultivo celular. Infecção da célula Vero por taquizoítas esféricos (a) e alongados (b), e com tamanhos diferentes. Taquizoítas unidos pela extremidade posterior (seta). Coloração de May-Grünwald-Giemsa. 1.000 X.

O estágio desse ovóide é o de multiplicação rápida, por endodiogenia, formando dois protozoários dentro de um taquizoíta. Na ausência de resposta imune do hospedeiro, os taquizoítas multiplicam-se continuamente, causando destruição progressiva das células e disseminação da infecção até a morte do hospedeiro.

Nos animais infectados, os taquizoítas encontram-se nas células nervosas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, miócitos, células epiteliais dos túbulos renais e hepatócitos.

Nos bovinos, eles podem ser encontrados no cérebro, coração, fígado e pulmões de fetos; na placenta e na medula espinhal de bezerros. Os parasitas destroem as células nervosas do sistema nervoso central e dos nervos, alterando a condutividade das células afetadas (Dubey & Lindsay, 1996).

Os taquizoítas não sobrevivem em solução de pepsina ácida, sugerindo que a maioria não sobreviveria na passagem pelo estômago, porém, existe relato de infecção em camundongos por via oral (Lindsay & Dubey, 1990).

### ***Bradizoítas***

Os bradizoítas são organismos delgados de multiplicação lenta ou de latência, medem 6-8 x 1-2  $\mu\text{m}$ , apresentam núcleo terminal a subterminal e são encontrados em grande número dentro do cisto tecidual. Os cistos representam uma infecção persistente, mantida sob controle pela resposta imune do hospedeiro.

Provavelmente com o início da resposta imune e a presença de outros fatores fisiológicos, os taquizoítas entram nas células e se diferenciam em bradizoítas, estabelecendo a infecção pela presença dos cistos. A formação dos cistos de *N. caninum* é pouco conhecida em qualquer dos hospedeiros relatados.

Os cistos de *N. caninum* geralmente são redondos ou ovais, podendo medir até 107  $\mu\text{m}$ . A espessura da parede do cisto de *N. caninum* geralmente é de 1 a 2  $\mu\text{m}$ , podendo medir até 4  $\mu\text{m}$ , provavelmente dependendo do tempo de infecção.

*Neospora caninum* encista-se no tecido nervoso (cérebro, medula espinhal, cerebelo, nervos), na retina e em músculo esquelético. Em fetos bovinos, os cistos são encontrados principalmente no cérebro. Nos bezerros com neosporose congênita, os cistos localizam-se no cérebro e na medula espinhal.

Os bradizoítas nos cistos são resistentes à solução de pepsina ácida e são infectantes por via oral para camundongos, gatos e cães, indicando que o carnivorismo é uma via de infecção de *N. caninum* (Lindsay & Dubey, 1990).

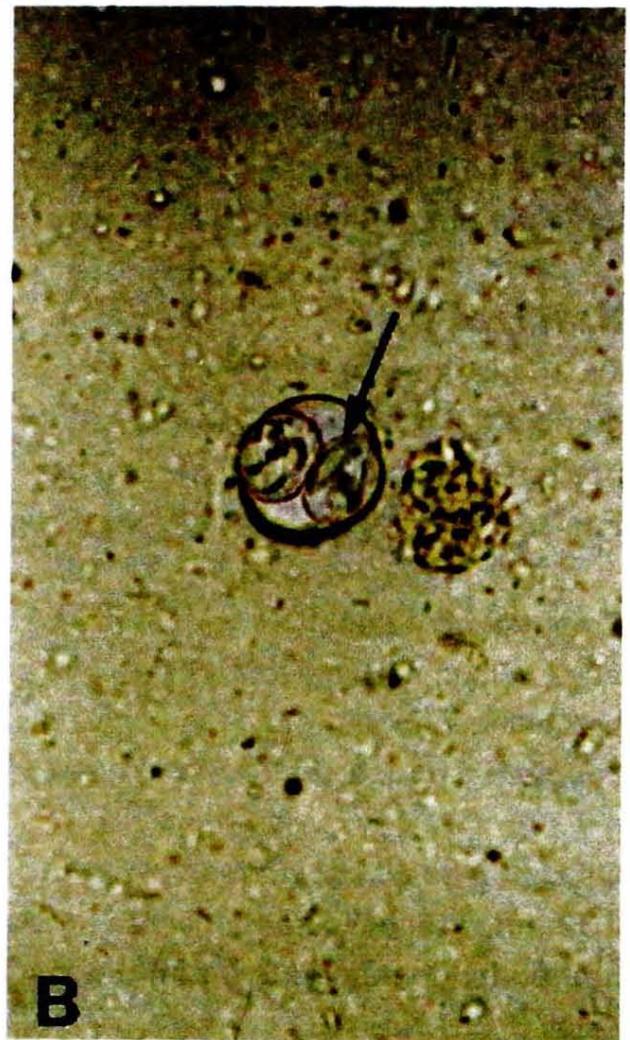
### **Oocistos**

Nas fezes recém-eliminadas de cães, os oocistos não esporulados medem 10 a 11  $\mu\text{m}$  de diâmetro, são esféricos a subsféricos, contêm um esporonte central e não são infectivos (Fig. 2). Os oocistos esporulam e tornam-se infectivos no ambiente após três dias, e contêm dois esporocistos (medindo cada um 8,4 x 6,1  $\mu\text{m}$ ), cada qual com quatro esporozoítas (7-8 x 2-3  $\mu\text{m}$ ) (Fig. 3). O núcleo dos esporozoítas apresenta localização central ou levemente posterior.

Foto: Rosangela Locatelli-Dittrich



**Fig. 2.** Oocisto de *Neospora caninum*. Oocisto não esporulado, com 11  $\mu\text{m}$  de diâmetro, contendo o esporonte, em fezes recentes de cão. Sem coloração. 400 X.



**Fig. 3.** Oocisto de *Neospora caninum*. Oocisto esporulado, com 12  $\mu\text{m}$  de diâmetro, contendo dois esporocistos (seta), cada um com quatro esporozoítas. A esporulação ocorreu após três dias. Sem coloração. 400 X.

Os oocistos foram descritos pela primeira vez em 1998, quando os cães, após a ingestão de cérebros de camundongos com cistos de *N. caninum*, eliminaram os oocistos não esporulados nas fezes. Os estádios intestinais do parasita ainda não foram descritos, sendo o cão considerado hospedeiro intermediário (com taquizoítas e cistos) e definitivo (eliminação de oocistos).

Experimentalmente, os cães não parecem ser bons hospedeiros definitivos de *N. caninum*, por causa do número reduzido de oocistos eliminados nas fezes e o período curto de tempo, sendo desconhecida a frequência de eliminação durante a vida do cão (Basso et al., 2001).

A resistência do oocisto, no meio externo, ainda não está definitivamente esclarecida, pois a maioria dos trabalhos é baseada em estudos experimentais.

## Ciclo Biológico

Em bovinos, os dois mecanismos de infecção por *N. caninum* são a transferência do parasita da mãe para o feto (transmissão vertical ou infecção congênita) e a ingestão de oocistos esporulados (transmissão horizontal ou infecção pós-natal) (Fig. 4). Até a descoberta dos oocistos nas fezes de cães, a introdução do parasita no rebanho permanecia inexplicada, e ainda o papel do oocisto na epidemiologia natural de *N. caninum* é incerto, porque o parasita é transmitido via vertical nos bovinos, por várias gerações, mantendo a infecção no rebanho.

Além dos hospedeiros intermediários de *N. caninum*, os ovinos, veados, caprinos, cervos, canídeos e outros animais silvestres apresentam sorologia positiva. e infecções experimentais foram induzidas em camundongos, ratos, cães, raposas, caprinos, gatos, ovinos, coiotes, suínos, *gerbils*, coelhos e bovinos (McAllister & Latham, 2002).

A infecção nos bovinos pode se estabelecer após a ingestão de oocistos esporulados, e quando ocorre durante a gestação, o parasita invade as células uterinas, causando o aborto. O aborto é o resultado da transferência congênita dos taquizoítas para o feto, durante a gestação. Também a reativação de infecção latente pode originar os taquizoítas. Existem evidências que, em abortos epidêmicos causados pelo parasita, a fonte de infecção seja preferencialmente externa, mais do que uma reativação da infecção crônica nas vacas. Os resultados soroepidemiológicos também sugerem uma forte associação entre os

rebanhos bovinos infectados por *N. caninum* e a presença de cães soropositivos nas fazendas. Existe uma maior soroprevalência de anticorpos de *N. caninum* em cães de fazendas de bovinos do que em cães de áreas urbanas.

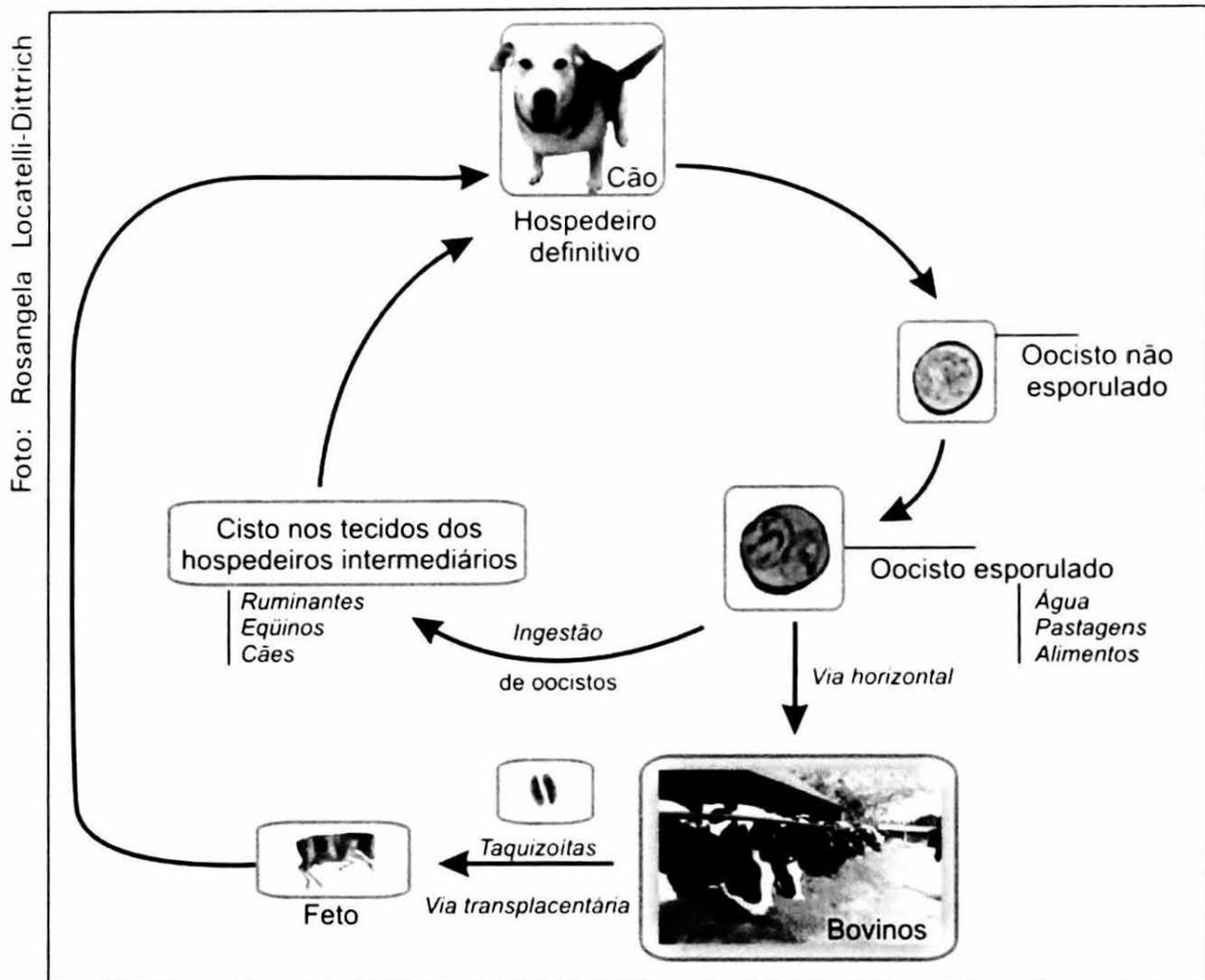


Fig. 4. Ciclo de vida parasitário de *Neospora caninum*.

Os estudos sorológicos demonstraram que as vacas que abortaram durante um surto epidêmico, provavelmente tenham adquirido a infecção após o seu nascimento, por causa da falta de associação entre a soropositividade de mães e filhas. Além disso, o modelo de surto de aborto na neosporose epidêmica sugere infecção do tipo horizontal. Ainda não existe confirmação de que vacas que abortaram, em um surto epidêmico, tenham adquirido a infecção durante a gestação.

Os cães consomem os cistos de *N. caninum* dos tecidos do hospedeiro intermediário, e eliminam os oocistos nas fezes. Os hospedeiros intermediários infectam-se consumindo os oocistos.

As fontes de infecção para os cães precisam ainda ser determinadas, mas as placentas, os fetos de bovinos e as carcaças de bezerros infectados via congênita podem conter cistos viáveis de *N. caninum* e infectar os cães.

A presença dos estádios infectivos de *N. caninum* nas placentas originou um debate sobre a placentofagia, um comportamento observado em vários mamíferos, inclusive nos ruminantes. Os experimentos com bovinos demonstraram que as vacas parturientes ingerem a sua placenta e a de outras vacas, e este comportamento poderia ser uma outra via de transmissão horizontal da neosporose entre os bovinos.

## Transmissão vertical

Além da transmissão por oocistos, *N. caninum* pode ser transmitido via transplacentária (transmissão vertical), das vacas para as suas descendências, por várias gerações. *Neospora caninum* é um patógeno primário e a infecção fetal generalizada pode ocorrer dentro de um mês após a inoculação experimental da mãe.

A transmissão transplacentária de *N. caninum* é considerada a principal via de infecção em bovinos. A eficiência desse modo de transmissão pode ser de 81% a 95%, confirmada pela presença de anticorpos pré-colostrais nos bezerros nascidos de mães soropositivas. *Neospora caninum* pode ser transmitido via congênita por gerações sucessivas, mantendo a infecção nos rebanhos. Existe a suposição que os bovinos podem permanecer infectados com *N. caninum* durante toda a sua vida, porém, nem todos os bovinos infectados transmitem o parasita à sua descendência viva. Os fatores que determinam a transmissão de *N. caninum* da mãe para o feto, durante a gestação, são desconhecidos.

O papel da transmissão congênita da neosporose foi confirmado pelas evidências de distribuição dos bovinos soropositivos dentro das famílias, por gerações sucessivas. Estudos demonstraram que 93% dos descendentes de vacas soropositivas, também, foram soropositivos, indicando que a transmissão vertical foi o principal modo de transmissão da infecção nos rebanhos avaliados.

Nos rebanhos com neosporose endêmica, a maioria dos bezerros nascidos de vacas soropositivas apresentou evidências sorológicas de infecção congênita, e a taxa de soropositividade foi similar entre os bezerros e os bovinos adultos do rebanho. As bezerras infectadas por via congênita terão uma infecção crônica persistente e poderão transmitir *N. caninum* às suas descendências, por via transplacentária.

A transmissão vertical parece ser a principal via de infecção de *Neospora* nos rebanhos bovinos de áreas endêmicas. Nos rebanhos endemicamente infectados, com acompanhamento extensivo, a sorologia demonstrou que pode ocorrer um baixo nível de infecção pós-natal, de origem desconhecida. Em um monitoramento de 456 bezerros, do nascimento até quatro anos de idade, as taxas de infecção pós-natal encontradas foram muito baixas (< 1% ao ano). Considera-se uma transmissão horizontal quando uma fêmea soropositiva, com no mínimo duas irmãs soronegativas, é descendente de uma mãe soronegativa.

A forte associação epidemiológica entre a presença de cães e a ocorrência de neosporose bovina indica que a transmissão via oocistos pode ser necessária para manter a infecção nos rebanhos.

## **Infecção lactogênica**

Recentemente, observou-se que taquizoítas de *N. caninum*, adicionados ao leite e colostro, infectaram bezerros recém-nascidos, via oral. A possibilidade de infecção lactogênica tem sido considerada, principalmente pela prática do fornecimento de *pool* de colostro aos bezerros recém-nascidos. No entanto, não está definitivamente comprovado se o colostro de bovinos com infecção natural pode infectar bezerros recém-nascidos (Hemphill et al., 2000).

## **Distribuição Geográfica de *Neospora caninum***

Os estudos da prevalência de anticorpos contra *N. caninum* indicam que, principalmente, os bovinos e cães de várias regiões geográficas foram expostos ao parasita, e que a neosporose apresenta uma ampla distribuição mundial.

Na Europa, os estudos sorológicos indicam que *N. caninum* ocorre em bovinos leiteiros da Irlanda do Norte, Inglaterra, Dinamarca, Holanda, Suíça, França, Suécia, Espanha, Itália e Bélgica.

Na Inglaterra foram avaliados 14 rebanhos leiteiros com histórico de aborto associado a *N. caninum*, sendo encontrados 17% de soropositividade em 4.295 animais. A prevalência nos rebanhos variou de 7,3% a 44,8%. Na Espanha, uma taxa de 30,6% de bovinos positivos foi observada em 889 animais de 43 rebanhos leiteiros. As estimativas da Inglaterra, da Holanda e da Espanha são de que 12,5%, 15%-20% e 38,7%, respectivamente, dos abortos em bovinos leiteiros são causados por *N. caninum*. No Oeste da França, as soroprevalências variam de 6% a 47% nos rebanhos leiteiros, e 17% a 45% dos fetos são soropositivos, indicando que o agente é uma causa importante e estabelecida de abortos no país. Na Suécia, *N. caninum* também é causa importante de abortos. Na Holanda, em 50 rebanhos leiteiros com casos de aborto epidêmico, *N. caninum* foi confirmado como causa do aborto em 77% dos 226 fetos submetidos ao diagnóstico (Dijkstra et al., 2003).

Em Moscou, na Rússia, os resultados sorológicos demonstraram a presença de anticorpos contra *N. caninum* em 10% dos bovinos avaliados.

Na Coreia, 19,5% dos abortos de bovinos foram associados a *N. caninum*, e uma soroprevalência de 20% foi observada em bovinos leiteiros. O parasita foi isolado de amostras de fetos bovinos e de bezerro. No Japão, o protozoário também foi isolado de bovino.

*Neospora caninum* também foi associado a aborto bovino na Austrália, África do Sul e Israel.

Na Nova Zelândia, 30% dos abortos bovinos ocorreram por causa de *N. caninum*, e os levantamentos sorológicos detectaram anticorpos para o parasita em 40% das vacas, após o aborto. A soroprevalência nas vacas sem histórico de aborto foi de 6% a 8,5%.

Na América do Norte existem relatos da presença do protozoário no Canadá, Estados Unidos e México.

Nos Estados Unidos, os resultados de vários levantamentos sorológicos para *N. caninum* indicaram que, nos rebanhos leiteiros, a soroprevalência é muito variável, com taxas de 2% a 98% de positividade. Na Califórnia, os estudos retrospectivos confirmaram que o parasita é endêmico desde 1984. Em Nebraska foram identificadas 82% de vacas soropositivas para *N. caninum*, em um surto

de abortos em bovinos de corte. Em Maryland, os anticorpos foram detectados em 28% dos bovinos leiteiros, em um rebanho com histórico de abortos endêmicos por esse protozoário. No Estado da Califórnia, 20% dos fetos bovinos, submetidos a diagnóstico, apresentam a infecção por *N. caninum*. A doença encontra-se disseminada no Estado, e o protozoário é considerado a principal causa de abortos nos bovinos leiteiros (McAllister & Latham, 2002).

Em Quebec, no Canadá, as soroprevalências variam de 4,3% a 61,8% em rebanhos leiteiros, com média de 21,9% de bovinos positivos por rebanho.

Na América Central, a infecção por *N. caninum* foi descrita em caprinos e bovinos da Costa Rica. Na América do Sul existem alguns relatos de casos de neosporose.

Na Argentina, o parasita foi observado por imuno-histoquímica em tecidos de bovinos e os anticorpos contra *N. caninum* foram identificados em fetos de bovinos leiteiros (24,4%) e de corte (4,5%), e em vacas leiteiras com histórico de aborto (64,5%). No Paraguai, os anticorpos contra o parasita também foram detectados em bovinos (Venturini et al., 1999).

No Brasil, os anticorpos contra *N. caninum* foram detectados em bovinos no Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia e Sergipe. As soroprevalências foram de 14% e 11,2%, na Bahia e no Rio Grande do Sul, respectivamente, para bovinos leiteiros, considerando título positivo de 1:200 no método de reação de imunofluorescência indireta – IFI. No Paraná e no Rio Grande do Sul, a soroprevalência foi maior nas vacas com histórico de aborto. No Paraná, anticorpos contra *N. caninum* foram detectados em bovinos leiteiros na região norte do Estado, em Carambeí, Witmarsum, Chopinzinho, Quatro Barras e em São José dos Pinhais, próximo a Curitiba (Locatelli-Dittrich et al., 2001). Anticorpos contra *N. caninum* também foram encontrados em bovinos de corte em Mato Grosso do Sul e em búfalos do Vale da Ribeira, São Paulo, com soroprevalência de 64%.

Em cães, anticorpos contra *N. caninum* foram identificados na Austrália, Bélgica, Canadá, Costa Rica, Dinamarca, Estados Unidos, Itália, Ilhas Falkland, Japão, Nova Zelândia, Quênia, Suécia, Tanzânia, Inglaterra, Uruguai e Brasil. As taxas de soroprevalências variaram de 1% (Suécia) até 29% (Itália). No Brasil, os resultados na Bahia e em São Paulo, respectivamente, foram de 18% e de 35%

(cães de rua). Na região norte do Paraná, os anticorpos contra esse parasita foram detectados em 21,6% dos cães de fazendas de bovinos leiteiros, e os cães soropositivos foram encontrados em 14 das 22 propriedades avaliadas (Innes et al., 2002).

## Sinais Clínicos de Neosporose e Patogênese do Aborto

### Bovinos

Em bovinos, a neosporose causa aborto, infertilidade, nascimento de bezerros natimortos ou doentes. O aborto pode ocorrer em qualquer estação do ano, tanto em novilhas quanto em vacas. O período de gestação em que ocorre o aborto é variável de três meses até a termo, mas principalmente na metade da gestação. Há vários registros relatando diferentes períodos de ocorrência de abortos, como três a sete meses, quatro a seis meses, cinco a seis meses e cinco a sete meses.

Os fetos podem morrer no útero e serem reabsorvidos, mumificados ou autolizados. Os bezerros podem nascer vivos, mas doentes, ou clinicamente normais, mas com infecção crônica.

O aborto associado à neosporose bovina segue dois modelos: o endêmico e o epidêmico. O endêmico ocorre na maioria dos rebanhos com vacas infectadas via congênita, e é caracterizado por uma elevada taxa de aborto ( $> 5\%$  ao ano), que persiste durante anos, sendo duas a três vezes maior nas vacas soropositivas do que nas soronegativas. Os abortos causados por *Neospora* nesses rebanhos variam de 0% a 60%. As estimativas das taxas anuais de aborto foram de 10,6% e 17,3%, causados por *Neospora*, em dois rebanhos leiteiros com abortos endêmicos (McAllister & Latham, 2002).

Os abortos epidêmicos são menos comuns e caracterizam-se por várias ocorrências durante um período relativamente curto de tempo (um a três meses), e geralmente 80% ou mais dos casos ocorrem em vacas soropositivas. Existem relatos de que mais de 30% das vacas em gestação abortaram por causa da neosporose. Em alguns rebanhos parece ocorrer a mistura dos dois modelos, nos quais durante um período prolongado de tempo ocorrem casos esporádicos de aborto, e em outros períodos, parecem ocorrer vários abortos em um intervalo de tempo relativamente curto.

Nos fetos, a infecção é sistêmica, com áreas de inflamação na maioria dos órgãos. A morte fetal resulta provavelmente de dois mecanismos principais. O primeiro, e mais comum, é a insuficiência cardíaca associada à miocardite e necrose do miocárdio, lesões consistentes nos fetos com infecção por *Neospora*. A evidência da insuficiência cardiovascular é o edema do feto (anasarca) e necrose hepática. O segundo mecanismo do aborto é a placentite com necrose do epitélio coriônico da placenta, e separação das vilosidades coriônicas das carúnculas do endométrio. Embora as lesões do cérebro sejam importantes, a infecção do sistema nervoso pode não ser o principal fator de morte fetal ou aborto.

As fêmeas primíparas soropositivas para *N. caninum*, que se infectaram via congênita, apresentam maior número de abortos que as soronegativas e com possível repetição dos abortos nas gestações subseqüentes.

As infecções congênitas e os abortos causados por *Neospora* ocorrem nos bovinos leiteiros e de corte, com maior número de casos nos rebanhos leiteiros. Nos bovinos de corte soropositivos há um risco maior de abortos e natimortos, além do aumento do descarte por problemas reprodutivos.

Os fatores que influenciam a patogênese do aborto por *N. caninum* são:

- O momento da parasitemia durante a gestação.
- A capacidade da resposta imune do feto.
- A eficiência da resposta imune materna.
- A quantidade de parasitas e a duração da parasitemia.

O período de gestação em que ocorre a transmissão dos parasitas ao feto tem um papel determinante na patogênese do aborto. A transmissão no início da gestação geralmente causa a morte fetal. As infecções experimentais de vacas com 70 dias de gestação, com taquizoítas via endovenosa, resultaram em morte fetal e reabsorção; e as infecções de vacas no final da gestação resultaram no nascimento de bezerros infectados, mas clinicamente normais. As vacas infectadas sete semanas antes da inseminação artificial produziram bezerros vivos e sem infecção por *Neospora* (MacAllister, 1999).

A gestação dos bovinos é de aproximadamente 280 dias e o sistema imune fetal desenvolve-se progressivamente durante esse período; assim, o bezerro é

imunologicamente competente ao nascimento. O feto é vulnerável durante o primeiro trimestre da gestação, quando o timo, baço e linfonodos periféricos estão em formação. Durante o terço médio da gestação, os tecidos linfóides começam a reconhecer e a responder aos microorganismos. Antes dos 100 dias de gestação, o feto é incapaz de reconhecer os patógenos como estranhos, e com 100–150 dias de idade começa a formar a resposta imune. Após os 150 dias, os fetos tornam-se progressivamente mais competentes em reconhecer e responder a vários patógenos.

No primeiro trimestre de gestação, o feto é muito vulnerável a *N. caninum* e provavelmente não sobreviverá à infecção. No terço médio de gestação, a resposta imunofetal é rudimentar e muitas vezes não evita a infecção, porque este é o período em que ocorre o maior número de abortos. No terço final, a resposta imunofetal é capaz de controlar o agente e levar à sobrevivência do feto. A maioria das transmissões intra-uterinas resulta no nascimento de bezerros infectados e clinicamente normais.

Os bovinos que adquirem a infecção por *N. caninum* durante a gestação, e que sobrevivem, nascem na maioria das vezes clinicamente normais, com neosporose subclínica. Uma porcentagem elevada, de 80% a 90%, dos bezerros que nascem de vacas soropositivas foi infectada via congênita, baseada no diagnóstico sorológico, e mantém a infecção no rebanho. Os animais que nascem sem sinais clínicos são portadores do parasita e reservatórios potenciais no rebanho (Lindsay & Dubey, 1990).

A infecção fetal por *N. caninum* pode causar anormalidades no sistema nervoso dos bezerros, caracterizando a neosporose clínica. Nos bezerros infectados via congênita e nascidos vivos, a doença afeta principalmente o sistema nervoso central – SNC –, e os sinais clínicos aparecem geralmente dentro de três a cinco dias, ou até duas semanas após o nascimento. Os sinais neurológicos podem ser deformações nos membros, como flexão ou hiperextensão dos membros anteriores e/ou posteriores, ataxia, diminuição dos reflexos patelares, perda da consciência próprio-receptiva dos membros, paralisia, opistótono e incoordenação, exoftalmia ou aparência assimétrica dos olhos, cegueira, deformações associadas com lesões das células nervosas embrionárias. As más-formações congênitas podem ser observadas em fetos e em bezerros, como, microencefalia, hidroencefalia, hipoplasia cerebelar, anormalidades do sistema nervoso central. A encefalomielite é a lesão predominante na neosporose clínica e a degeneração

muscular causa miosite e deformações nos membros. As anormalidades clínicas podem regredir, permanecerem estáticas ou mesmo progredir. Os bezerros podem nascer com o peso abaixo do normal, com diminuição da massa muscular, fracos, com dispnéia, e incapazes de se levantar (Lindsay & Dubey, 1990).

Existem indicações de que a exposição primária a *N. caninum* de animais adultos, provavelmente, não cause uma infecção permanente, ou que a infecção primária de vacas não gestantes resulte em uma efetiva resposta imune que previna a transmissão transplacentária em uma gestação futura.

O sistema imune durante a gestação torna a mãe mais vulnerável à neosporose. O interferon gama – IFN $\gamma$  – aumenta nas vacas infectadas com *N. caninum* e inibe de maneira efetiva a multiplicação dos taquizoítas. A citocina IL-10, porém, produzida por células trofoblásticas fetais, diminui a produção do IFN $\gamma$  e pode influenciar na recrudescência de uma infecção crônica, causando a liberação de bradizoítas dos cistos com conseqüente parasitemia.

Quando *N. caninum* invade as células uterinas, multiplica-se e causa destruição dos tecidos fetais e maternos na interface materno-fetal, iniciando uma resposta inflamatória. Do foco inicial, a lesão estende-se para as membranas placentárias fetais (corioalantóide), entre os cotilédones. Ainda é desconhecido se essa lesão é resultante diretamente da multiplicação do parasita ou por causa da resposta imunomaterna (e fetal). Durante a destruição da placenta e a resposta inflamatória materno-fetal, o parasita entra na circulação sangüínea do feto e invade os tecidos, com predileção pelo SNC.

No SNC, os protozoários localizam-se inicialmente dentro e ao redor dos vasos sangüíneos e, em fetos mais jovens, sua multiplicação rápida pode destruir as células e causar a morte, com relativamente pouca inflamação. Em fetos mais velhos, a multiplicação dos parasitas é mais restrita, e a necrose aparece confinada em pequenos focos de lesão com uma resposta inflamatória ao redor, com astrócitos reativos, monócitos e linfócitos. A destruição das células fetais e a inflamação linfóide associada também podem ocorrer no coração, músculo esquelético, pulmões e fígado (Lindsay & Dubey, 1990).

A quantidade de parasitas no momento da infecção também pode influenciar a sobrevivência do feto. Mais importante do que isso, porém, deve ser considerada a capacidade de multiplicação rápida dos taquizoítas.

A causa de neosporose é multifatorial, resultando de um desequilíbrio entre a multiplicação do parasita e a eficiência das respostas imunes da mãe e do feto.

## Diagnóstico de Neosporose

O diagnóstico depende de uma combinação entre o histórico do rebanho, sinais clínicos e dados de laboratório. O quadro clínico sugestivo de neosporose é a presença de sinais neurológicos e de polimiosite em bovinos jovens. Em bovinos adultos, a ocorrência de abortos e o nascimento de bezerros natimortos são sinais sugestivos de infecção por *N. caninum*.

Os casos assintomáticos em bovinos e os sinais inespecíficos da neosporose dificultam o diagnóstico clínico da doença. Conseqüentemente, o diagnóstico laboratorial é imprescindível para confirmar uma infecção por *N. caninum*.

A confirmação laboratorial é realizada pelo diagnóstico parasitológico, com os exames histopatológico e imuno-histoquímico, a reação em cadeia da polimerase – PCR –, e o isolamento dos parasitas mediante a inoculação do material suspeito em cultivo celular ou em animais de laboratório. A alternativa é o diagnóstico sorológico, com a pesquisa de anticorpos contra *N. caninum*.

A sorologia é utilizada como método diagnóstico nos estudos epidemiológicos de abortos por causa de *N. caninum*. O sorodiagnóstico é mais indicado para avaliar a exposição e o risco de infecção por esse parasita em um rebanho, do que para o diagnóstico de aborto em um animal.

O diagnóstico de aborto associado a *N. caninum* é feito geralmente pelos exames histopatológico e imuno-histoquímico dos tecidos fetais. A utilização de diferentes técnicas diagnósticas, como a PCR, aumenta a chance de detectar a infecção por *N. caninum* nos fetos. Nos casos de aborto também devem ser investigadas outras doenças, como rinotraqueíte infecciosa bovina – IBR –, diarreia viral bovina – BVD –, campilobacteriose, leptospirose, brucelose, clamidiose e trichomonose.

### Métodos de diagnóstico sorológico

Existem vários testes que detectam anticorpos séricos específicos para *N. caninum*, principalmente em cães e bovinos (Tabela 1). Os mais utilizados são a reação de imunofluorescência indireta – IFI – e o teste imunoenzimático – ELISA

(*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*). Os testes sorológicos de IFI e de ELISA necessitam do conjugado, o anticorpo secundário espécie-específico, para detectar os anticorpos de *N. caninum* (Atkinson et al., 2000).

**Tabela 1.** Exames sorológicos utilizados no diagnóstico de *Neospora caninum*.

Metodologia	Antígeno
IFI	Taquizoítas
<i>Imunoblot</i>	Extrato solúvel
ELISA cinético	Sonicado
ELISA	Extrato solúvel
ELISA	Extrato <i>iscom</i>
CI-ELISA	P65
r-ELISA	NCDGI-2, N54
IFAT-ELISA	Taquizoítas
MAT	Taquizoítas

IFI = reação de imunofluorescência indireta

ELISA = ensaio imunoenzimático

CI-ELISA = ELISA de competição e inibição

r-ELISA = ELISA recombinante

*Iscom* = complexo imunoestimulante

IFAT = *Indirect Fluorescent Antibody Test*

MAT = teste de aglutinação modificada

Fonte: Atkinson et al. (2000).

Os antígenos de *N. caninum* podem ser os naturais ou recombinantes, e diferem de acordo com o teste sorológico. No método da IFI, os taquizoítas inteiros são fixados nas lâminas, e nos diferentes tipos de ELISA, são utilizados: o extrato de taquizoítas; os taquizoítas inteiros; os antígenos de taquizoítas incorporados a um complexo imunoestimulante e os antígenos recombinantes.

Os taquizoítas são obtidos de cultivo *in vitro*, de cepas de *N. caninum* isoladas de bovinos e de cães, e não existem indicações sobre possíveis diferenças antigênicas entre os isolados que possam afetar a eficácia dos testes.

Existem vários antígenos imunorreativos descritos para *N. caninum*, e os imunodominantes de taquizoítas pertencem a um grupo de moléculas de massa molecular de 37, 29/30, 16/17 e 46 kDa. Nos soros com títulos baixos de anticorpos, alguns antígenos podem não ser detectados.

Os principais antígenos imunodominantes dos taquizoítas são o p37 e p29/30, com massa molecular de 37 kDa e 29/30 kDa, respectivamente. Estão localizados nos grânulos densos e no vacúolo parasitóforo, e podem ser considerados como os alvos principais nos testes sorológicos. Esses antígenos foram clonados recentemente, e as seqüências de genes obtidas revelaram homologias aos genes que codificam os antígenos de superfície de *T. gondii* (SRS-2 e SAG-1) (McAllister & Latham, 2002).

O nível de corte entre a reação positiva e negativa (*cut-off*) para os testes de IFI e de ELISA ainda não estão completamente definidos porque existem poucos dados disponíveis de estudos com infecções experimentais em bovinos.

### **Reação de imunofluorescência indireta – IFI**

O método de IFI foi o primeiro teste empregado no diagnóstico sorológico da neosporose, em 1988, sendo utilizado no diagnóstico da infecção em várias espécies animais, como: cães, raposas, gatos, bovinos, ovinos, caprinos, búfalos, eqüinos, roedores e primatas.

A reação de imunofluorescência indireta é a metodologia de referência para pesquisa de anticorpos de *N. caninum*, considerada como padrão ouro, um teste padrão para calibração e comparação com os novos testes. Na Fig. 5 pode ser visto um exemplo de um exame positivo. A presença dos anticorpos IgM é indicativa de infecção aguda, porém, a cinética de produção de IgM na neosporose ainda é pouco conhecida em bovinos. A determinação dos anticorpos da classe IgG é utilizada para o diagnóstico de neosporose em bovinos. Um aumento progressivo do título de anticorpos da classe IgG, em um período de tempo, geralmente, é indicativo de infecção aguda (Moore et al., 2002).

Foto: Renato Andreotti

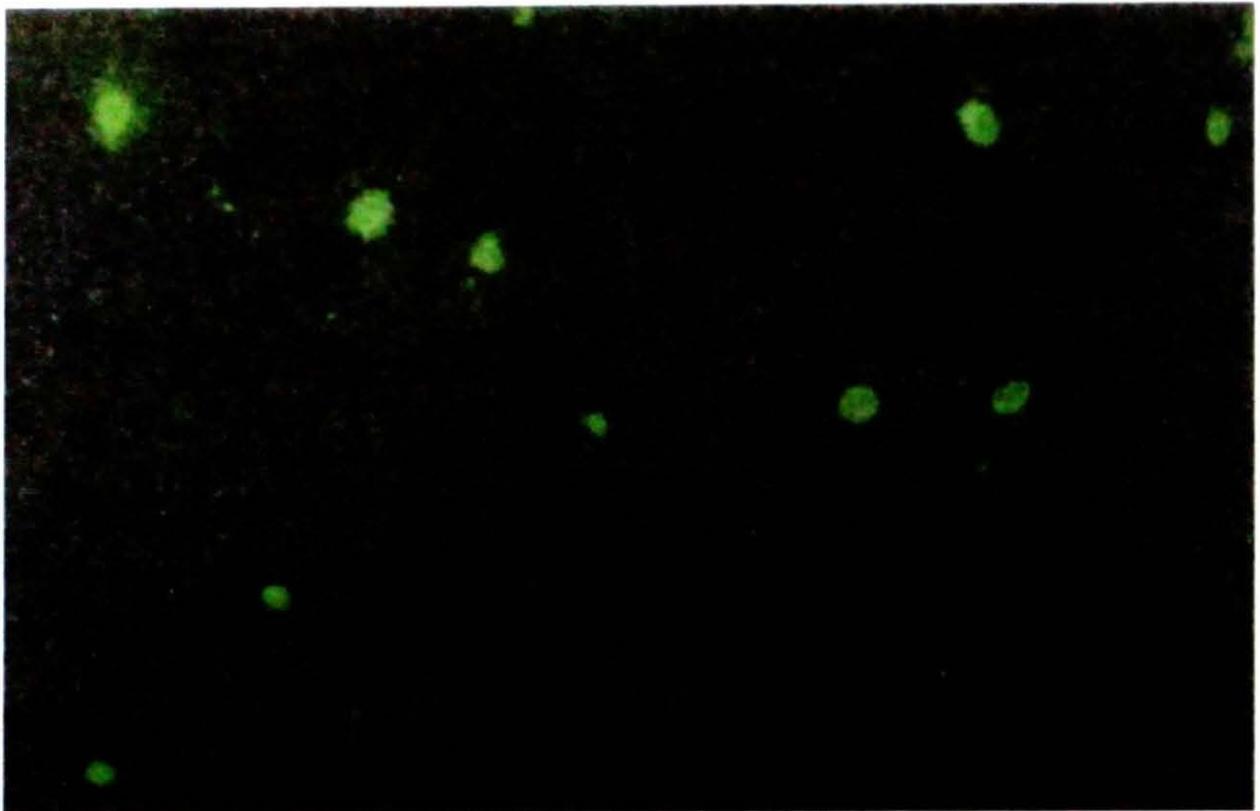


Fig. 5. Imunofluorescência indireta para *Neospora caninum* em soros de cães. Aumento 400 X.

O princípio do método da IFI é detecção de anticorpos direcionados aos antígenos da superfície celular dos taquizoítas. Nas espécies do *phylum* Apicomplexa, esses antígenos são considerados mais específicos do que os componentes intracelulares. Os antígenos podem ser obtidos de exsudatos de peritônio de camundongos ou de cultura de células.

Um resultado positivo no método da IFI é indicado pela fluorescência de todo o taquizoíta, nos soros com títulos moderados a elevados. Uma fluorescência reduzida ou apical ocorre nos soros com títulos baixos, e nas reações cruzadas não específicas causadas por infecção com espécies relacionadas, como *T. gondii*, devendo-se interpretar os resultados com cautela. Os anticorpos não específicos que produzem fluorescência reduzida, e conseqüentemente uma reação cruzada, são desconhecidos.

A reação cruzada entre os anticorpos de *N. caninum* e *T. gondii* não foi observada em soros de bovinos. Epítomos comuns foram identificados entre *Eimeria* spp., *T. gondii* e *N. caninum*, no conóide, uma estrutura do complexo apical dos parasitas. Vários antígenos de taquizoítas e de bradizoítas de *N. caninum*

demonstraram uma reação cruzada com anticorpos direcionados a *T. gondii* e vice-versa.

Os títulos de anticorpos na técnica de IFI variam entre os laboratórios, e serão discutidos para os bovinos adultos, fetos e nos casos de aborto.

### **Teste imunoenzimático – Enzyme-linked Immunosorbent Assay – ELISA**

O teste de ELISA é o principal método sorológico utilizado nas avaliações dos rebanhos de bovinos, com finalidades diagnósticas ou nas pesquisas. O teste imunoenzimático apresenta algumas vantagens em relação ao método da IFI, tais como a realização de um maior número de análises, rapidez, registro das reações realizado de maneira objetiva, e o exame pode ser automatizado (Pereira-Bueno et al., 2003).

A maioria dos testes de ELISA para *N. caninum* utiliza os lisados de taquizoítas, preparados por sonicação ou por solubilização com detergentes, resultando em uma mistura de vários antígenos de origem intracelular ou citoplasmática. Os métodos sorológicos que utilizam os antígenos da membrana celular do parasita, como a IFI, são considerados mais específicos.

O valor do *cut-off* é determinado com soros de referência, caracterizados geralmente pela IFI. Nos diferentes tipos de ELISA (solúvel, *iscom*, recombinante, e no IFAT-ELISA), o valor da absorbância situado acima do valor do *cut-off* indica um resultado positivo.

Os diferentes antígenos utilizados nos métodos da IFI, NAT – teste de aglutinação para *N. caninum* – e ELISA podem medir diferentes classes de anticorpos, resultando em uma variação nos resultados entre os testes.

As modificações para melhorar a especificidade dos testes de ELISA incluem a utilização de complexos imunoestimulantes – *iscom* –, de anticorpos monoclonais para imunoglobulinas específicas, dos antígenos da superfície dos taquizoítas, e dos antígenos do parasita clonados.

### ***Bovinos adultos e casos de aborto***

A utilização e interpretação dos exames sorológicos em bovinos devem ser feitas com cautela, principalmente no diagnóstico dos casos de aborto. O sorodiagnóstico é mais bem utilizado para avaliar a exposição e o risco de infecção por *N. caninum* de um rebanho, do que para o diagnóstico de aborto em um animal. Uma única amostra de soro de uma vaca pode não refletir precisamente o seu estado de infecção. Recentemente foi demonstrado que apenas uma avaliação sorológica de todo o rebanho, aliada aos dados de idade e de *pedigree*, é válida para interpretar o estado sorológico dos animais de maneira individual e para estudar o modo de transmissão de *N. caninum* (Boger & Hattel, 2003).

A sorologia é utilizada com freqüência como o único método diagnóstico nos estudos epidemiológicos de abortos por causa de *N. caninum* e acredita-se existir uma alta correlação entre soropositividade e a presença persistente do parasita nos animais infectados.

O título de anticorpos varia entre vacas naturalmente infectadas, podendo flutuar consideravelmente durante a gestação, e algumas vezes situar-se abaixo do valor positivo do *cut-off*, em alguns testes. Apesar das flutuações nos títulos, não existem evidências conclusivas demonstrando uma soroconversão, de um estado positivo para um negativo. Os bovinos soropositivos podem apresentar uma conversão para soronegativos, e, posteriormente, retornar ao estado de soropositividade (Atkinson et al., 2000).

As variações nos títulos podem afetar a sensibilidade do teste em diferenciar os bovinos falso-negativos dos verdadeiramente negativos.

A presença de títulos elevados de anticorpos nas vacas sugere uma infecção recente por *N. caninum*, porém, o título no método de IFI considerado padrão é desconhecido. Os títulos de 1:640 são indicativos de infecção por *N. caninum*, em vacas que abortaram; títulos de 1:160-1:640 para os bovinos adultos. O título de 1:25 indica exposição ao parasita, em vacas naturalmente infectadas e bezerros experimentalmente infectados. O título de 1:25 também é utilizado para búfalos, na IFI.

Os métodos sorológicos (IFI e ELISA) devem ser utilizados com cautela no diagnóstico de aborto por *N. caninum* e a confirmação é realizada pela demons-

tração do parasita ou do seu DNA no feto, preferencialmente em associação com a patologia característica. A maioria das vacas com infecção natural por *N. caninum* são soropositivas quando abortam, e os níveis de anticorpos são máximos ou próximos do máximo, indicando que a sensibilidade de diagnóstico da maioria dos testes é alta quando a amostra de soro é pós-aborto.

Os altos níveis de anticorpos durante a infecção aguda não protegem contra o aborto por *N. caninum*. Os testes sorológicos não devem ser utilizados para estabelecer o diagnóstico definitivo de aborto por *Neospora*, nas amostras individuais, porque as vacas clinicamente normais e sem histórico de aborto podem apresentar títulos elevados de anticorpos (IFI). Raras vezes, no entanto, as vacas que abortaram um feto infectado por *N. caninum* não apresentaram título significativamente elevado no aborto.

A ausência de anticorpos contra *N. caninum* em vacas que abortaram poderia excluir a neosporose como a causa do aborto, no entanto, em fetos de mães soronegativas foi encontrado resultado positivo para *N. caninum*, por PCR e exames histopatológicos. A razão para uma soronegatividade persistente desses animais ainda não está definida. O fato de alguns indivíduos não serem capazes de sintetizar anticorpos detectáveis contra o parasita, por causa da imunotolerância inata ou adquirida, poderia explicar os resultados.

O nível de anticorpos pode estar relacionado com a exposição do antígeno (inóculo de *N. caninum*), e a maior exposição coincidir com o aborto.

As vacas soropositivas para *N. caninum* também podem apresentar anticorpos para outros agentes abortivos, como *Leptospira* spp., *Chlamydia* sp. e/ou BVDV. A causa do aborto em vacas soropositivas para *N. caninum* pode não ser o parasita. Vacas soropositivas podem abortar fetos negativos (PCR), para neosporose.

O reconhecimento seguro da neosporose, como um problema de aborto em um rebanho bovino, depende dos métodos de diagnóstico, e somente a sorologia não é suficiente para tal.

Independente do teste sorológico utilizado, os laboratórios devem estabelecer os títulos, com os soros de referência, positivo e negativo. A validação de um teste geralmente é realizada pela comparação entre os títulos de vacas que abortaram e

as que não abortaram, ou pela IFI, como padrão ouro. O ideal é a comparação dos soros de bovinos com infecção confirmada, pelo isolamento dos parasitas nos fetos, ou nos bezerros infectados via congênita.

### ***Fetos bovinos e bezerros***

Nas amostras de soros de fetos, de bezerros natimortos ou fracos, a sorologia pode ser utilizada como complemento ou como método alternativo do exame histopatológico e imuno-histoquímico. A presença de anticorpos específicos de *N. caninum* no soro fetal ou soro pré-colostro de bezerro indica infecção congênita, porque não existe transferência de anticorpos maternos nos ruminantes durante a gestação (Sager et al., 2001).

No diagnóstico de aborto por *Neospora*, vários critérios devem ser considerados em relação ao feto, como a idade gestacional, as condições *post mortem* de autólise, a presença de inflamação disseminada, a observação de parasitas por imuno-histoquímica, a evidência sorológica de infecção e a ausência de outro agente patogênico associado ao aborto.

O método de IFI é específico para detectar anticorpos contra *N. caninum* em fetos (líquidos fetais ou soro), e o título de 1:16 pode ser utilizado para melhorar os resultados da sorologia fetal. Um resultado negativo na IFI não descarta a possibilidade de infecção por *Neospora*, considerando-se os fatores como imaturidade fetal (soronegativos: fetos com dois a quatro meses); título de 1:64 ou o intervalo entre a infecção e o aborto não foi suficiente para a formação dos anticorpos. A destruição das imunoglobulinas por autólise, a morte do feto na fase aguda da infecção e a detecção de IgG ao invés de IgM também podem contribuir para o insucesso da sorologia fetal. O desenvolvimento da resposta imune nos fetos bovinos ocorre entre quatro e cinco meses de gestação, assim, o sorodiagnóstico deve ser utilizado principalmente nos fetos bovinos com seis meses ou mais de idade gestacional.

As amostras de soro de mães soropositivas e de seus bezerros recém-nascidos, que não consumiram colostro, podem ser utilizadas nas estimativas de transmissão vertical.

### ***Limitações da sorologia***

Os testes sorológicos são úteis para identificar os soros com níveis moderados a elevados de anticorpos contra *Neospora*, como os soros de vacas infectadas e

com títulos de recrudescência da infecção durante a gestação; soros de vacas que abortaram por causa de *N. caninum* e soros de vacas e de bezerros no período pós-parto. A análise sorológica apresenta limitações nos casos de títulos baixos de anticorpos, nas vacas com flutuação ou queda de anticorpos após o parto ou aborto, nas vacas que soro converteram recentemente e nos bezerros alguns meses após o parto.

A instabilidade temporária da concentração de anticorpos de *N. caninum*, em bovinos adultos, limita a utilização da sorologia no diagnóstico, principalmente nos casos dos animais soronegativos. O resultado sorológico negativo da mãe não exclui a possibilidade de aborto por *Neospora*.

Os exames sorológicos são imprescindíveis à confirmação do exame clínico, e indispensáveis nos estudos epidemiológicos, porém, a sua utilização requer o conhecimento da patogênese e da epidemiologia da doença. Os aspectos como a dificuldade em comparar os títulos ou valores de absorvância de diferentes laboratórios, a diversidade de antígenos, a urgência em caracterizar os soros dos animais infectados e dos animais não infectados e a necessidade de um laboratório internacional de referência no diagnóstico de *Neospora* devem ser considerados na realização dos exames sorológicos.

## Diagnóstico parasitológico

Os métodos diretos utilizados no diagnóstico e pesquisa de *N. caninum* são os exames histopatológico, imuno-histoquímico, o isolamento *in vitro* e *in vivo*, a detecção do ácido desoxirribonucléico – DNA – do parasita por PCR e a observação dos cistos nos tecidos a fresco (sem coloração). Em propriedades onde são detectados casos de neosporose, com problemas de aborto, o exame coparassitológico para pesquisa de oocistos é realizado para a confirmação do papel do cão na transmissão do parasita.

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

### Exame a fresco

A detecção dos cistos de *N. caninum* pode ser realizada no exame microscópico direto. As amostras do cérebro suspeito são comprimidas em lâminas de vidro, com uma laminula, e examinadas sem coloração. O tamanho das amostras é de aproximadamente 2-3 mm<sup>3</sup>. Na Fig. 6 observa-se um cérebro de feto onde foi isolado *N. caninum* por meio de cultivo *in vitro*.

Foto: Rosangela Locatelli-Dittrich

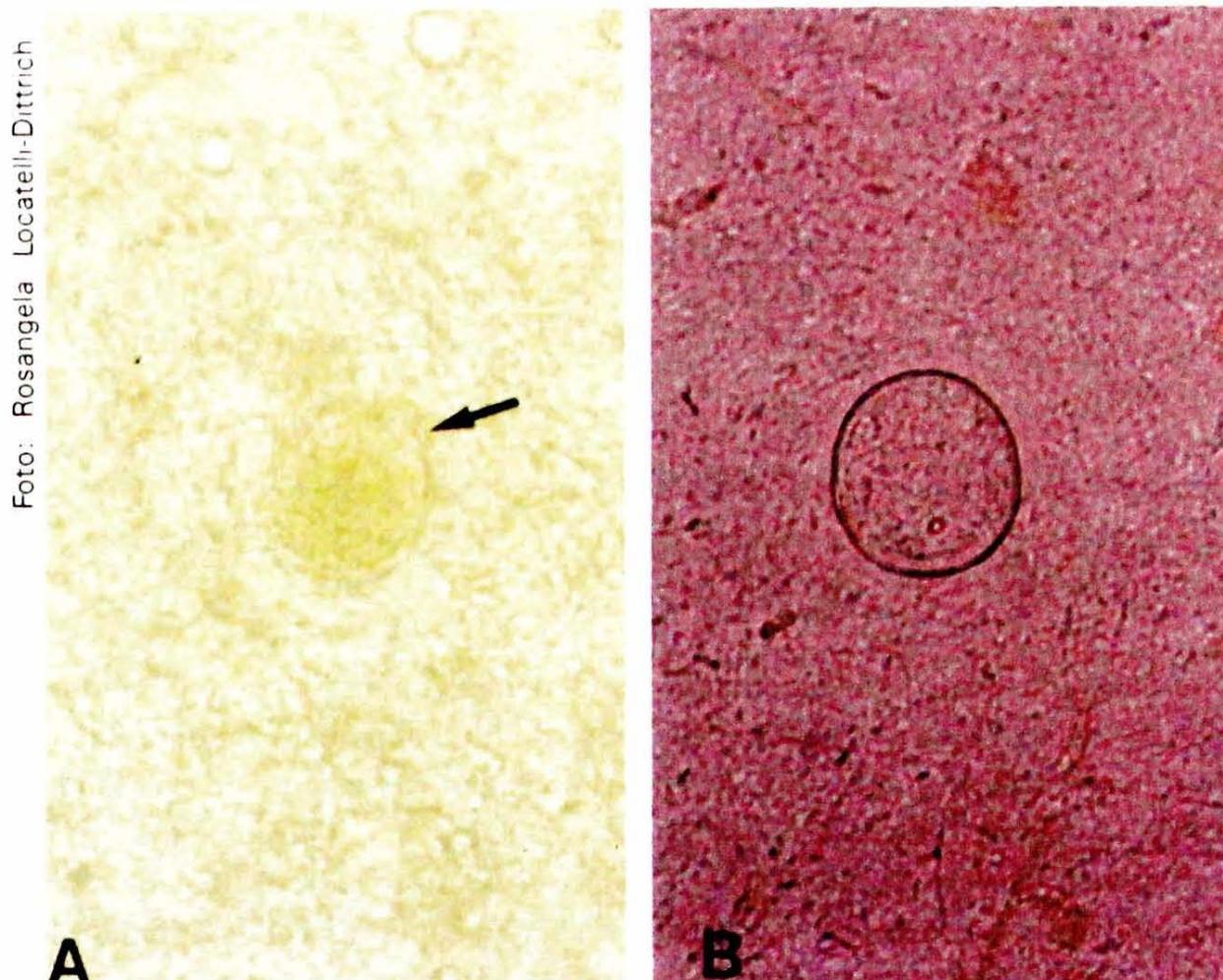


**Fig. 6.** Cérebro de feto bovino onde cepa de *Neospora caninum* foi isolada. Cérebro com aspecto e consistência normais (seta).

O número de cistos varia, desde poucos até 20, em uma amostra de 3 mm<sup>3</sup>. Na Fig. 7 pode ser observado em **A**: cisto de parede espessa em cérebro de camundongo que recebeu uma inoculação de amostra de cérebro de bezerro suspeito e, em **B**: em cérebro de *gerbil*. Sem coloração. 1000 X.

A pesquisa de cistos em bovinos, principalmente fetos, é realizada pelo exame histopatológico, em amostras de cérebro e medula espinhal.

Os cistos geralmente são pequenos ( $\sim 25 \mu\text{m}$ ), e com parede delgada ( $\leq 1 \mu\text{m}$ ). A parede espessa ( $\geq 1 \mu\text{m}$ ) dos cistos foi descrita em cães, camundongos, *gerbils* e em bezerros (Gondim et al., 2001).



**Fig. 7.** Cistos de *Neospora caninum*. **A** - Cisto de parede espessa (seta) com 31  $\mu\text{m}$  de diâmetro, no cérebro de camundongo inoculado com amostras de cérebro de bezerro. **B** - Cisto de parede espessa com 33  $\mu\text{m}$  de diâmetro, no cérebro de *gerbil* inoculado com amostras de cérebro de bezerro com neosporose. Sem coloração. 1.000 X.

### **Exame histopatológico**

No diagnóstico de infecção por *N. caninum* utiliza-se o exame histopatológico, porém, na maioria dos casos, os protozoários estão em número muito pequeno no cérebro, e raramente são observados nos cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina – HE.

O exame histopatológico é realizado a partir de amostras de cérebro e medula espinhal de bovinos e o número de cistos observado é pequeno, principalmente em fetos. Os cistos geralmente são pequenos ( $\sim 25 \mu\text{m}$ ) e com parede delgada ( $\leq 1 \mu\text{m}$ ). Um diagnóstico presuntivo de infecção por protozoário pode ser realizado

considerando-se as lesões histológicas, e requer a presença dos resultados histopatológicos compatíveis com neosporose.

No cérebro as lesões podem estar ausentes, não serem observadas ou consideradas não específicas por causa da escassez de lesões inflamatórias e de cistos. A ausência de cistos pode ser explicada pela eliminação dos parasitas pelo sistema imunoativo ou pela resposta inflamatória dos fetos no terceiro trimestre de gestação.

Um diagnóstico presuntivo de infecção por protozoário pode ser realizado considerando-se as lesões histológicas, e requer a presença dos resultados histopatológicos compatíveis com neosporose.

As lesões sugestivas de neosporose (encefalite não supurativa, com diferentes graus de degeneração dos neurônios e gliose multifocal) podem ser detectadas sem a observação dos parasitas. As lesões consideradas diagnósticas estão no cérebro e consistem em focos de infiltrados celulares mononucleares (não supurativos), com ocasionais focos de necrose. As outras lesões são epicardite e/ou miocardite não supurativas, miosite focal não supurativa e hepatite portal não supurativa, freqüentemente com necrose hepática focal e pneumonia intersticial não supurativa focal.

O exame histopatológico do feto é utilizado no diagnóstico de aborto por *N. caninum*. No entanto, mesmo que as lesões no cérebro, coração e fígado sejam sugestivas de neosporose, é necessária a detecção por imuno-histoquímica do parasita.

### **Exame imuno-histoquímico**

O método imuno-histoquímico identifica cistos e taquizoítas de *N. caninum* em tecidos fetais e fetos mumificados. O estado de autólise dos fetos mumificados, porém, diminui a eficiência do diagnóstico. Os anticorpos específicos de *N. caninum* são utilizados principalmente nos cortes de cérebro, embora os parasitas também sejam encontrados com freqüência no pulmão, rins e músculos esqueléticos.

O método imuno-histoquímico deve ser minucioso, e é necessária a coloração de vários cortes histológicos do sistema nervoso central, para encontrar alguns parasitas. As lesões histológicas e os parasitas podem não ser detectados nas

amostras de cérebro de bovinos, porém, o parasita ser isolado em cultivo celular.

Na microscopia ótica, os bradizoítas de *N. caninum* podem ser diferenciados dos taquizoítas pelo método imuno-histoquímico. Os cistos de *N. caninum* foram identificados no músculo esquelético de cães e bezerros com infecção natural, com dois anti-soros de coelho, sendo um desenvolvido contra taquizoítas da cepa NC-1, que identifica taquizoítas e bradizoítas de *N. caninum*, e o outro desenvolvido contra uma proteína de *T. gondii*, a BAG-5, que apresenta uma forte reação cruzada com os bradizoítas de *N. caninum*, mas não com os taquizoítas.

Como a espécie-especificidade do anti-soro BAG-5 parece ser baixa, devem-se excluir as possibilidades de co-infecção com outros parasitas Apicomplexa, descartando *T. gondii* (sorologia e imuno-histoquímica), mas não *Sarcocystis* sp. (bovinos) e *Hammondia* sp. (cães).

### **Exame de fezes em cães**

No exame de fezes para pesquisa dos oocistos de *N. caninum* utiliza-se o método de centrífugo-flutuação, com uma solução saturada de açúcar.

Os oocistos não esporulados de *N. caninum* são esféricos a subesféricos, medem 10 a 11  $\mu\text{m}$  de diâmetro e contêm um esporonte central. A esporulação ocorre em três dias, e os oocistos esporulados contêm dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítas. Os oocistos de *N. caninum* são semelhantes aos oocistos de *T. gondii*, *Hammondia hammondi* e *H. heydorni*.

Os oocistos nunca foram observados em cães com infecção ativa sistêmica por *N. caninum*, indicando que provavelmente o exame de fezes apresenta pouco valor na detecção da doença.

### **Isolamento de Neospora caninum**

No isolamento de *N. caninum*, os tecidos infectados são inoculados em cultivo celular e/ou em camundongos, imunodeprimidos ou imunodeficientes.

O isolamento e cultivo de *N. caninum* permite a identificação do parasita, a produção de taquizoítas para testes sorológicos, a avaliação dos taquizoítas às diferentes drogas, as pesquisas do ciclo de vida e biologia do parasita, as infecções experimentais, nos estudos de adesão e invasão das células hospedei-

ras e as pesquisas de manipulação genética do parasita. As diferentes cepas isoladas também permitem os estudos de diversidade genética do parasita.

### *Isolamento in vitro*

O cérebro e a medula espinhal de bovinos, dos fetos e bezerros, são as principais amostras utilizadas para o isolamento de *N. caninum* em cultivo celular. As amostras de tecidos são removidas para frascos estéreis, sendo processadas e inoculadas em frascos de Roux, contendo uma monocamada estabelecida de células. Após a inoculação das amostras, os frascos de cultivo são incubados em estufa de CO<sub>2</sub>, na temperatura de 37°C, durante 12 horas. A manutenção dos cultivos é feita pela substituição do meio.

As técnicas descritas para o isolamento, cultivo e congelamento de *T. gondii* podem ser empregadas no isolamento de *N. caninum*, com algumas modificações, como maior tempo de tripsinização do inóculo, a incubação *overnight* do homogeneizado de cérebro na monocamada de células, e a utilização de células da linhagem 87-3 de bovinos.

Os frascos devem ser examinados diariamente em microscópio invertido para monitorar o isolamento. Na leitura dos frascos, a monocamada de células deve ser observada quanto a sua integridade, a presença de efeitos citopáticos, como orifícios e destruição das células hospedeiras infectadas, e o aparecimento dos parasitas dentro das células ou livres no meio de cultivo. Os taquizoítas são observados em pares ou em grupos, nas células hospedeiras próximas às áreas de rompimento da monocamada. Os protozoários localizam-se no citoplasma e, após romperem as células, aparecem em grupos de quatro a oito parasitas, ligados pela porção posterior.

A reprodução de *N. caninum* em cultivo celular ocorre por divisão binária e somente *Neospora* e *Toxoplasma* são mantidos continuamente em cultivo celular, com passagens seriadas realizadas por inoculações dos taquizoítas em novas células não infectadas. Após a visualização dos efeitos citopáticos na monocamada e a observação dos protozoários, os cultivos devem ser mantidos com a substituição periódica do meio e as transferências dos parasitas para novos frascos de cultivo. As passagens são realizadas de acordo com a multiplicação dos protozoários e a infecção da monocamada de células.

Cepas de *N. caninum* foram isoladas de fetos e de bezerros. O isolamento do

parasita a partir de amostras de feto foi descrito no Brasil (cepas BNC/PR2 e BNC/PR3), nos Estados Unidos (cepas BPA1 e BPA2) e na Coréia (KBA-2). Outras cepas de *Neospora* foram isoladas de bezerros, como: BNC/PR1, de bezerro com cegueira congênita, no Brasil; BPA3 e BPA4, nos Estados Unidos; JPA1, isolada de um bezerro com infecção congênita e clinicamente normal, no Japão; NC-SweB1, de um bezerro natimorto, na Suécia; NC-LivB1, no Reino Unido; NC-PV1, de um bezerro de 45 dias com sinais neurológicos, na Itália e a cepa KBA1, de um bezerro recém-nascido, na Coréia (Atkinson et al., 2000).

O isolamento de *N. caninum* de vaca adulta ocorreu no Japão, onde a cepa BT-3 foi isolada do cérebro de uma vaca de dois anos, com histórico de abortos causados por *N. caninum*. O cérebro foi inoculado em camundongos *nude*, que desenvolveram paralisia 46 dias depois, quando foram necropsiados. Os cérebros dos camundongos foram inoculados em células Vero e os taquizoítas do parasita observados 39 dias depois. Na Fig. 8 pode ser observada a cultura dos taquizoítas em células Vero.

Foto: Rosângela Locatelli-Dittrich



**Fig. 8.** Monocamada de células Vero infectada com *Neospora caninum*. **A** - Área de infecção do tapete celular, com protozoários extracelulares em grupo (seta), isolados e em duplas. 125 X.

Após a inoculação das amostras de bovinos, os primeiros taquizoítas podem ser observados em diferentes períodos, como após 15 dias; entre 29 a 34 dias; de 40 a 49 dias e 56 a 60 dias.

Além do maior tempo de isolamento, as cepas de *N. caninum* isoladas de bovinos apresentam crescimento lento, durante e após o estabelecimento dos cultivos. As hipóteses como as diferenças na virulência dos parasitas, ou na adaptação ao cultivo celular, precisam ser determinadas.

O isolamento de *N. caninum* em camundongos ou cultivo celular é mais difícil do que o isolamento de *T. gondii*, e o crescimento de *N. caninum* também é mais lento do que o de *T. gondii* em cultivo celular.

A taxa de proliferação parece variar entre as diferentes cepas de *Neospora*, e alguns isolados multiplicam-se mais rapidamente do que os outros. A multiplicação das cepas isoladas de cães é mais rápida do que as de bovinos. Provavelmente, a cepa de cão adapta-se mais facilmente ao crescimento em cultivo celular, mas a razão é desconhecida.

No cultivo *in vitro* de *N. caninum*, somente os taquizoítas foram observados, contudo, foi demonstrada a expressão de um antígeno específico de bradizoítas de *N. caninum*, em cultivos do parasita, submetidos a condições de estresse.

### *Isolamento in vivo*

No isolamento de *N. caninum* em camundongos, os do tipo BALB/c são melhores do que os Swiss-Webster, principalmente quando o material não pode ser cultivado em células, por causa da contaminação microbiana (Sawada et al., 2000).

A inoculação de cérebro de feto suspeito de infecção por *N. caninum*, em camundongos imunodeprimidos, e subsequente inoculação do cérebro do camundongo em cultivo celular aumentam as chances de obtenção do parasita. Esse método é utilizado para isolamento de cepas do parasita de amostras de bovino.

As cepas de *N. caninum* de cães foram isoladas inoculando-se as amostras em cultivo celular e em vários tipos de camundongos, imunodeficientes e imunodeprimidos com prednisolona.

No isolamento de *N. caninum* em camundongos, entre os tipos *outbred* tratados com corticóides, BALB/c e KO, os mais susceptíveis são o KO ( $\gamma$  *interferon knockout*). Os camundongos KO, inoculados via subcutânea – SC – e intraperitonal – IP – com cérebro de cão, morreram com neosporose sistêmica, e os taquizoítas foram observados no exudato peritonal.

*Neospora caninum* não é patogênico para os camundongos Swiss Webster e raramente produz infecção. O tratamento dos animais com 2,5 mg de acetato de metilprednisolona – MPA –, no dia do inóculo e 21 dias depois, pode aumentar as chances de os animais desenvolverem sinais clínicos e cistos.

Os *gerbils* imunocompetentes podem ser utilizados para o isolamento de *N. caninum*, a partir de amostras infectadas. Primeiramente, as amostras de cérebro podem ser inoculadas nos *gerbils*, e após três a quatro meses, seus cérebros, obtidos na eutanásia, são processados e inoculados em cultivo celular (Yamane et al., 1997).

### **Reação da polimerase em cadeia – PCR**

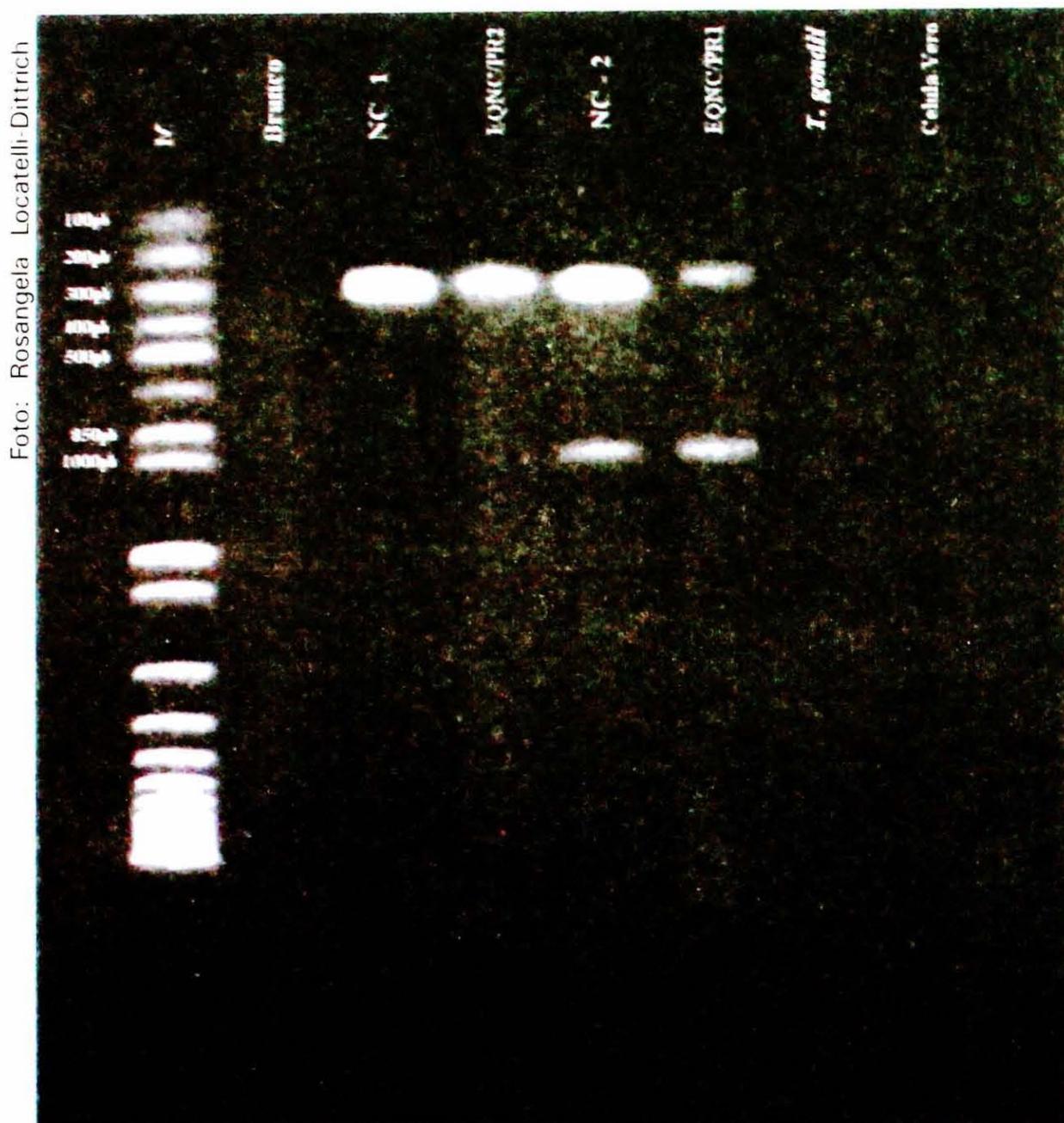
A reação da polimerase em cadeia – PCR – é uma das técnicas mais importantes da biologia molecular e representa um grande avanço no diagnóstico de várias doenças, pela amplificação de segmentos específicos do DNA. O método é utilizado para detectar o DNA de diversos patógenos, e durante os últimos anos vem se destacando como metodologia para pesquisa e diagnóstico de protozoários como *Toxoplasma* e *Neospora* (Pitel et al., 2001).

A caracterização molecular de *N. caninum* visou, inicialmente, à taxonomia, e atualmente a PCR pode ser usada como método diagnóstico de neosporose (Fig. 9) (Locatelli-Dittrich, 2002).

Por causa das dificuldades de diagnóstico da neosporose, tais como a falta dos sinais clínicos e o reduzido número de parasitas, as técnicas de PCR estão sendo desenvolvidas e utilizadas aliadas aos exames histopatológico e imuno-histoquímico para aumentar a probabilidade de diagnóstico da doença.

A PCR, com a detecção do DNA de *N. caninum* em tecidos de fetos, bezerros, bovinos adultos e em placentas, pode ser um método diagnóstico, contudo, a técnica não é rotina por causa do seu custo elevado e dos problemas técnicos associados com a detecção do DNA em cérebros de fetos autolisados. As outras

desvantagens da PCR são o tempo, equipamentos e experiências necessárias na realização das técnicas.



**Fig. 9.** Produtos da PCR obtidos com diferentes cepas de *Neospora caninum*, usando primers Np21 e Np6. Marcador molecular de 1 kb. NC-1 e NC-2 = cepas de referência de *N. caninum*; EQNC/PR e EQNC/PR2 = cepas de *N. caninum* isoladas de equínos; RH = cepa de referência de *Toxoplasma gondii*; célula Vero.

As pesquisas demonstram uma boa correlação entre os resultados positivos da PCR, em fetos bovinos, e a presença de anticorpos de *N. caninum* nas mães (Pitel et al., 2001).

*Neospora caninum* poderia induzir o aborto sem invadir o feto, contudo, os exames por PCR, de placentas e os respectivos fetos abortados, demonstraram DNA deste parasita somente nas placentas dos fetos que também resultaram positivos.

Apesar dos progressos da PCR na detecção de *Neospora*, existem poucas avaliações da sua aplicação no diagnóstico da infecção em bovinos, e atualmente a PCR ainda é utilizada em poucos laboratórios como método diagnóstico e de pesquisa. Existe uma tendência para que o método aumente de maneira significativa a detecção segura e a identificação espécie-específica do parasita ou do seu DNA, respectivamente, nas amostras de cérebro ou placenta. O emprego da PCR está aumentando nos laboratórios de diagnóstico da neosporose e principalmente associado aos resultados histopatológicos, porém, pode ocorrer uma baixa concordância entre a PCR e o exame histopatológico, por causa das diferenças na obtenção das amostras (origem e tamanho) para os exames, o pequeno número e a distribuição dos parasitas, e a metodologia.

A definição do método diagnóstico de neosporose necessita de estudos adicionais para quantificar as características operacionais dos testes e para padronizar a metodologia das amostragens.

## Diagnóstico Diferencial

A confirmação de infecção por *N. caninum* é necessária pelos métodos imunohistoquímico ou por PCR, para diferenciar de *Sarcocystis* sp. e de *Toxoplasma gondii*, que podem causar lesões similares em fetos.

Nos casos de aborto e morte perinatal, além da neosporose, as doenças como brucelose, campilobacteriose, tricomoniase, leptospirose, IBR, BVD e clamidiose devem ser pesquisadas.

## Controle

Não existem ainda métodos efetivos para o controle da neosporose bovina. As práticas de manejo do rebanho são utilizadas para tentar eliminar ou reduzir a infecção e os prejuízos causados por *Neospora caninum*.

A estimativa de prevalência da infecção no rebanho é o passo inicial para selecionar as estratégias de controle do aborto por neosporose. O descarte, por exemplo, pode ser feito se a prevalência da doença for baixa, mas não é economicamente viável nos rebanhos com prevalência elevada. Uma estimativa da prevalência pode ser obtida com o exame sorológico de um grupo de 30 a 50 vacas em lactação, selecionadas ao acaso, dependendo do tamanho do rebanho.

A presença de *N. caninum* em um feto pode indicar a prevalência da infecção no rebanho, e não necessariamente a causa do aborto. O exame sorológico de vacas com e sem histórico de aborto pode ser usado para avaliar se os abortos em um rebanho podem ser atribuídos à neosporose. Se o parasita contribui para os abortos, a proporção de vacas soropositivas e com histórico de abortos será significativamente maior que a de vacas soropositivas sem aborto. Se a taxa de soropositividade não for significativamente maior para as vacas com aborto, não existem evidências para a infecção por *Neospora* no rebanho. O exame sorológico pode evitar que o produtor compre problemas, impedindo a introdução de animais contaminados.

O exame sorológico também pode estimar a extensão da infecção congênita, com as amostras pré-colostrais.

A presença de *N. caninum* nos rebanhos de bovinos implica em adotar medidas de controle da doença. A recomendação para animais soropositivos é o descarte de modo gradativo, evitando prejuízos econômicos na produção. Os animais soropositivos e os seus descendentes não devem ser mantidos na reprodução, para evitar a transmissão vertical do parasita no rebanho. Dependendo da prevalência da doença no rebanho, essa prática pode ser economicamente inviável.

A utilização de animais soronegativos para reposição do rebanho também é uma medida importante para controlar a neosporose. Uma medida indicada para evitar a transmissão vertical de *N. caninum* em bovinos é a transferência de embriões

em vacas soronegativas, utilizando as técnicas da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (Baillargeon et al., 2001).

O risco de transmissão horizontal de *N. caninum* deve ser reduzido quando for utilizado o descarte seletivo (Dubey, 1999), mas, na prática, tal medida é difícil de ser adotada. O descarte seletivo de animais infectados e a prevenção do acesso dos cães aos fetos, placentas e carne crua são as medidas mais citadas para o controle da neosporose, por causa da ausência de uma vacina efetiva (Reichel, 2000).

O cão foi identificado como o hospedeiro definitivo de *N. caninum*, porém outros hospedeiros também podem estar envolvidos. Além disso, mesmo que se erradiquem os cães de uma fazenda, ainda há o risco do aparecimento de cães da vizinhança na propriedade.

## **Estratégias para o controle da infecção congênita**

### ***Redução da infecção no rebanho por meio do descarte das vacas infectadas***

A maioria das vacas infectadas produz bezerros infectados e a infecção congênita parece permanecer no rebanho por muito tempo. Se a sorologia inicial de uma amostragem de vacas indicar uma baixa prevalência para justificar o descarte, as fêmeas remanescentes do rebanho devem ser avaliadas e as vacas positivas descartadas. Uma opção mais gradativa de controle seria realizar os exames sorológicos das mães e filhas de vacas que abortaram. O estado sorológico de uma vaca pode ser associado a outros critérios para justificar o descarte, como diminuição de produção, outras doenças, como mastites, problemas de casco, entre outros.

### ***Renovação do rebanho com fêmeas soronegativas***

A infecção congênita também pode ser reduzida utilizando somente fêmeas soronegativas na reposição, que poderia incluir novilhas nascidas de mães infectadas, porém com sorologia negativa.

Os rebanhos que realizam transferência de embrião deveriam utilizar somente receptoras soronegativas, e uma novilha procedente de transferência de embrião não deve ser adquirida se a receptora for soropositiva. Comparada ao descarte, a reposição do rebanho com animais soronegativos representa uma alternativa de menor custo para a eliminação da infecção em médio prazo (Baillargeon et al., 2001).

## Estratégias para o controle da transmissão horizontal

Prevenir a contaminação de cães, pela remoção de tecidos infectados, como placentas, fetos e carcassas de bezerros, que serviriam de fonte de infecção para os cães, e evitar o acesso dos cães à carne crua constituem estratégias importantes para o controle da transmissão horizontal.

É preciso também evitar a contaminação de bovinos por oocistos eliminados pelos cães, reduzindo as possibilidades de contato dos bovinos com as fezes de cães. Isto é possível diminuindo o número de cães convivendo no rebanho, protegendo locais de armazenamento de alimento e de água, removendo as fezes dos cães de locais como os cochos e bebedouros.

Deve-se também evitar o contato das vacas com fetos e placentas, para impedir a placentofagia. Em rebanhos leiteiros isto poderia ser feito com a separação dos animais no momento do parto.

## Tratamento para neosporose

Não existem ainda medicamentos antineospora efetivos para o tratamento em bovinos. Várias drogas, como decoquinato, depudecin, toltrazulril, ponazuril, artemisinina e os extratos de ervas têm sido utilizados *in vitro* (cultivo celular) ou *in vivo* (camundongos), porém, em bovinos não há ainda a comprovação da eficiência e de sua aplicação a campo.

O tratamento químico apresenta algumas limitações, como o desenvolvimento de resistência do parasita às drogas, os riscos para a saúde humana no consumo de carne ou de leite com resíduos químicos e a possibilidade de contaminação ambiental.

O tratamento por quatro semanas com trimetoprim + sulfadiazina (15 mg/kg 2 x dia) e pirimetamina (1 mg/kg 1 x dia) tem sido utilizado em cães com sintomatologia nervosa, porém os resultados são inconsistentes.

## Imunização

Considerando as limitações das medidas citadas anteriormente, uma estratégia de controle da neosporose é a imunização dos animais do rebanho (positivos e negativos) por meio da vacinação. As vacas infectadas por *N. caninum* podem desenvolver uma imunidade protetora que pode evitar a transmissão congênita e o aborto, portanto, em um futuro próximo a imunoprofilaxia poderá ser uma

ferramenta viável de controle da doença. Esta tem como principal objetivo reduzir os abortos causados por *N. caninum*. Embora a prevenção do aborto represente uma meta importante para justificar a vacinação, o objetivo principal para o controle da doença é prevenir a transmissão vertical do parasita.

Recentemente foi lançada nos EUA e Nova Zelândia, a vacina *Bovilis Neoguard*; a primeira e única aprovada pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos – USDA – como auxiliar na redução dos abortos causados por *N. caninum*. Essa vacina é composta de protozoários inativados, sendo, portanto, segura para utilização em vacas sadias, prenhes, e apresenta reação local mínima.

Inúmeros trabalhos de campo (EUA, Costa Rica, México, Brasil e Nova Zelândia) têm mostrado sua segurança e eficácia, comprovando ser a única alternativa viável para o controle da neosporose, e que está ao alcance de técnicos e produtores.

Os resultados da vacinação em um ensaio de campo realizado em uma fazenda em Minnesota, EUA, com alto desafio, com um rebanho de 120 vacas em lactação, com 48% de animais soropositivos e com abortos entre quatro e sete meses de gestação, mostraram uma redução de 16,7% de aborto para 1,9% após o primeiro ano de vacinação.

Trinta e seis vacas prenhes foram observadas em um experimento com vacinação nos Estados Unidos mostrando uma proteção significativa com relação a abortos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Resultado do desafio experimental com vacina contra *Neospora caninum* em novilhas prenhes nos Estados Unidos.

	<i>Neoguard</i>	Controle
N <sup>o</sup> novilhas prenhes	18	18
N <sup>o</sup> de abortos	0	4 <sup>(1)</sup>
Taxa de aborto (%)	0	22
N <sup>o</sup> de natimortos e bezerros mortos até 24 horas pós-nascimento	0	3
N <sup>o</sup> de bezerros saudáveis	18	11

<sup>(1)</sup> P < 0,05

A vacina deve ser aplicada em duas doses, com intervalo de três a quatro semanas, a partir da confirmação da prenhez, devendo ser realizada o mais cedo possível. A revacinação com duas doses nas gestações subseqüentes é recomendada para se obter a máxima proteção.

Os títulos vacinais e de infecção não permitem a diferenciação entre animais vacinados e contaminados. Assim, a imunização não é compatível com a estratégia do exame e descarte dos animais soropositivos.

## Referências Bibliográficas

ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60/61, p. 417-431, 2000.

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

ATKINSON, R.; HARPER, P. A. W.; REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. **Parasitology Today**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 110-113, 2000.

BAILLARGEON, P.; FECTEAU, G.; PARÉ, J.; LAMOTHE, P.; SAUVÉ, 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. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 218, n. 11, p. 1803-1806, 2001.

BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M. C.; HILL, D. E., KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; DUBEY, J. P. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 87, n. 3, p. 612-618, 2001.

BOGER, L.; HATTEL, A. L. Additional evaluation of undiagnosed bovine abortion cases may reveal fetal neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 113, n. 1, p. 1-6, 2003.

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. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 103, n. 3, p. 195-202, 2002.

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H. W.; EYSKER, M.; BEIBOER, M. L.; WOUDA, W.; Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 110, n. 3-4, p. 161- 169, 2003.

DUBEY, J. P. Neosporosis – the first decade of research. **Internacional Journal for Parasitology**, Oxford, v. 2, p. 1485-1488, 1999.

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

DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERKAS, I.; BJÖRKMAN, C.; BLAGBURN, B. L.; BOWMAN, D. D.; BUXTON, D.; ELLIS, J. T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D. E.; HOWE, D. K.; JENKINS, M. C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A. E.; MATTSSON, J. G.; McALLISTER, M. M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L. D.; SPEER, C. A.; TREES, A. J.; UGGLA, A.; UPTON, S. J.; WILLIAMS, D. J. L.; LINDSAY, D. S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 32, p. 929-946, 2002.

GONDIM, L. F. P.; SARTOR, I. F.; MONTEIRO JÚNIOR, L. A.; HARITANI, M. *Neospora caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 47, n. 1, p. 35, 1999.

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

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B.; CONRATHS, F. J.; MEERSCHMAN, F. de; ELLIS, J. T.; INNES, E. A.; McALLISTER, M. M.; ORTEGA-MORA, L. M.; TENTER, A. J.; TREES, A. J.; UGGLA, A.; WILLIAMS, D. J. L.; WOUDA, W. A. European perspective on *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, n. 8, p. 877-924, 2000.

INNES, E.; ANDRIANARIVO, A. G.; BJÖRKMAN, C.; WILLIAMS, D. J. L.; CONRAD, P. A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 11, p. 497-504, 2002.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 76, n. 3, p. 410-413, 1990.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V. T.; RICHARTZ, R. R. T. B.; GASINO-JOINEAU, M. E.; VINNE, R.; PINCKNEY, R. D. Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in Southern Brazil. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 87, n. 6, p. 1493-1494, 2001.

LOCATELLI-DITTRICH, R. **Diagnóstico sorológico, isolamento, cultivo e caracterização molecular de *Neospora caninum* em bovinos leiteiros e em eqüinos no Estado do Paraná, Brasil**. 2002. 184 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos, Agro-Indústria) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

McALLISTER, M. M. Uncovering the biology and epidemiology of *Neospora caninum*. **Parasitology Today**, Oxford, v. 15, n. 6, p. 216-217, 1999.

McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILL, R. A.; McGUIRRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 28, n.9. p. 1473-1478, 1998.

McALLISTER, D.; LATHAM, S. *Neospora* 2001. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 4-5, 2002.

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. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 107, n. 4, p. 303-316, 2002.

PEREIRA-BUENO, J.; QUINTANILLA-GOZALO, A.; PÉREZ-PÉREZ, V.; ESPI-FELGUEROSO, A.; ÁLVAREZ-GARCIA, G.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; ORTEGA-MORA, L. M. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 111, n. 2-3, p. 143-152, 2003.

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

REICHEL, M. P. *Neospora caninum* infections in Australia and New Zealand. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 78, n. 4, p. 258-261, 2000.

SAGER, H.; FISCHER, I.; FURRER, K.; STRASSER, M.; WALDVOGEL, A.; BOERLIN, P.; AUDIGÉ, L.; GOTTSTEIN, B. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 102, n.1-2, p. 1-15, 2001.

SAWADA, M.; KONDO, H.; TOMIOKA, Y.; PARK, C.; MORITA, T.; SHIMADA, A.; UMEMURA, T. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 90, p. 247-252, 2000.

VENTURINI, M. C.; VENTURINI, D.; BACIGALUPE, D.; MACHUCA, M.; ECHAIDE, I.; BASSO, W.; UNZAGA, J. M.; DI LORENZO, C.; GUGLIELMONE, A.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. *Neospora caninum* infections in bovine foetuses and dairy cows with abortions in Argentina. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 10, p. 1705-1708, 1999.

YAMANE, I.; KOKUHO, T.; SHIMURA, K.; ETO, M.; SHIBAHARA, T.; HARITANI, M.; OUCHI, Y.; SVERLOW, K.; CONRAD, P. A. *In vitro* isolation and characterization of a bovine *Neospora* species in Japan. **Research in Veterinary Science**, London, v. 63, n. 1, p. 77-80, 1997.





## Onde há pesquisa há vida.

Para nós, da Intervet, pesquisar novas soluções e tecnologias para a saúde animal é mais que uma obrigação. É a nossa razão de ser.

Nossa missão é colocar à disposição de técnicos e produtores as melhores e mais completas soluções para prevenção e tratamento de doenças que acometem os animais. É assim que acreditamos estar fazendo a nossa parte para a construção de um mundo melhor.

**intervet**

A pesquisa é o nosso campo.



**SAC 0800 70 70 512**

Horário de atendimento 2ª a 5ª - 8h às 17h30  
6ª - 8h às 15h  
sac.br@intervet.com

Av. Alfredo Egidio de Souza Aranha, 177  
2º andar - CEP 04726-170 - São Paulo - SP

**Embrapa**

---

*Gado de Corte*

**Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento**

**Governo  
Federal**

ISBN 85-297-0153-4

