

TERESA DE JESUS OVIEDO SOCARRÁS

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE OVELHAS DESLANADAS COM
*Neospora caninum***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de "*Magister Scientiae*"

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

A Deus, por ter me trazido a uma terra na emana leite e mel.

À memória do meu pai, Leonel, pelo exemplo de vida.

A minha mãe, Elisa pelo amor.

A meu esposo Misael, pelo amor e dedicação de sempre.

Aos meus filhos, Sebastian e Sarai, lhes amo muito.

Aos meus irmãos Elias, Daira e Mônica.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Nacional de Córdoba e à Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade oferecida para a realização do curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária.

À minha professora, orientadora e amiga, Marlene Isabel Vargas Vilorio, pela orientação e dedicação na realização do curso. Que Deus a abençoe sempre com a sabedoria que a caracteriza.

Ao Professor Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo, pelo aconselhamento, amizade e compreensão oferecida em todo momento.

Ao meu esposo Misael, pelo apoio oferecido em todas as etapas do curso, pelo amor e compreensão naqueles momentos nos quais faltou minha presença em nosso lar.

A minha irmã Daira, pela ajuda permanente desde a Colômbia e suporte nos momentos de saudade.

Ao professor Milton McAllister, por ceder a cepa de *N. caninum* para o experimento e pelas orientações.

A Cristiano Melo da UFMG por ceder a cepa de Neospora que com dificuldade trouxe dos Estados Unidos e a Alexandre Pinheiro da UFBA pelos ensinamentos em cultura do parasita.

Ao professor José Domingo Guimarães pela realização das ultrasonografias.

Ao professor Jorge Visbal Saumet, “*In memoriam*” quem sempre ofereceu apoio para nossa superação acadêmica.

Ao professor Alberto Mestra Pineda, pela velha amizade e apoio incondicional para a realização deste curso.

Ao professor César Ballut Baquero, por me encaminhar no amor pela patologia e pela amizade.

Às secretarias do DVT Eloísa, Rose e Clélia, pelos serviços prestados, pelo agradável convívio e pela amizade.

Aos funcionários do DVT-UFV José Carlos, Cauzinho, Cláudio, Adão, Luis Marcio, Aline, Lucinda e José de Oliveira, pelos serviços prestados durante a realização do trabalho e pela amizade a qual valorizo e agradeço não só a eles como também à maioria dos funcionários do departamento.

A Marcio Mendes, “Marcinho”, por me ensinar a ter paciência quando as coisas não saem bem, pelos ensinamentos e ajuda no laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e, antes de tudo, pela amizade sincera.

A Rafael, estudante de Veterinária da UFV, pela ajuda para terminar o experimento e pela amizade.

A todos os meus companheiros de mestrado, e muito especialmente a Carla e Waneska pela amizade e suporte em momentos de saudade, saudade que com certeza sentirei por todos vocês no futuro.

Aos meus colegas de trabalho e amigos Juan Carlos, Leonardo e Alba pela amizade e apoio em todos os momentos difíceis durante a realização do curso.

Ao abençoado Pastor Elben Lenz Cezar, da Igreja Presbiteriana de Viçosa, pelo apoio no meu crescimento espiritual, graças a suas interessantes aulas na escola dominical e pela amizade sincera, assim como a todos os amigos da Igreja, especialmente ao Sr. Edson.

À Maria do Carmo e Isabel, pela amizade e dedicação aos meus filhos.

À dona Diana pela amizade e colaboração durante minha permanência em Viçosa

A todos meus amigos colombianos em Viçosa, pelos encontros permanentes que faziam mais fácil a permanência longe do meu querido país.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Histórico	3
2.2. Biologia	5
2.2.1. Taquizoítos	5
2.3.2. Cistos	6
2.3.3. Oocistos	6
2.3.4. Ciclo Biológico	6
2.3. Hospedeiros e fontes de infecção	8
2.4. Sinais clínicos e lesões	9
2.4.1. Caninos	9
2.4.2. Bovinos	10
2.4.3. Ovinos	11

2.4.4. Eqüinos	Página 12
2.5. Epidemiologia	13
2.6. Diagnóstico	14
2.7. Importância econômica	15
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo geral	17
3.2. Objetivos específicos	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Parasita	18
4.2. Cultivo de <i>Neospora caninum</i>	18
4.3. Animais	19
4.4. Inoculação	19
4.5. Coleta de amostras	20
4.5.1. Amostras de sangue	20
4.5.2. Amostras de tecidos e processamento histológico das amostras	21
4.6. Produção de anti-soros	21
4.6.1. Produção de imunoglobulina G (IgG) de coelho anti- IgG de ovelha	21
4.6.2. Produção de IgG de coelho anti – <i>N. caninum</i> .	22
4.6.3. Purificação de IgG	23
4.6.4. Conjugação da IgG com isotiocianato de fluoresceína (FITC)	23
4.7. Produção de antígenos para imunofluorescência	24
4.7.1 Purificação do antígeno	24
4.7.2 Sensibilização de lâminas para IFI	24

	Página
4.8. Técnicas imunológicas	25
4.8.1. Imunofluorescência indireta para detectar anticorpos contra <i>N. caninum</i>	25
4.8.2. Técnica de Peroxidase anti-peroxidase	25
5. Resultados	27
5.1. Culturas “ <i>in vitro</i> ”	27
5.2. Produção de IgG de coelho anti-IgG de ovelha	27
5.3. Produção IgG de coelho anti- <i>N. caninum</i> .	27
5.4. IFI para detectar título de anticorpos	29
5.6. Sinais clínicos	29
5.7. Histopatologia	32
6. DISCUSSÃO	44
7. RESUMO E CONCLUSÕES	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
APÊNDICE	63

RESUMO

SOCARRÁS, Teresa de Jesús Oviedo, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Dezembro de 2001. **Infecção experimental de ovelhas deslanadas com *Neospora caninum***. Orientadora: Marlene Isabel Vargas Vilória. Conselheiros: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo e João Carlos Pereira da Silva.

Ovelhas deslanadas em diferentes estágios reprodutivos foram inoculadas com taquizoítos de *N. caninum* amostra “NC-beef” com o intuito de estudar a patofisiologia da doença nestes animais e verificar a possibilidade de serem usadas como um modelo experimental de neosporose bovina. Utilizaram-se cinco ovelhas gestantes (uma com 15 dias, duas com 30 dias, duas com 90 dias), três não gestantes e duas com 10 dias após o parto. Os animais eram sorologicamente negativos para *N.caninum* e *T. gondii*. Duas ovelhas gestantes, não inoculadas, foram utilizadas como controle negativo. Todas as ovelhas inoculadas apresentaram anticorpos contra o parasita a partir da quarta semana pós-inoculação. Igualmente, todos os cordeiros nascidos de ovelhas inoculadas apresentaram anticorpos anti-*N. caninum*. Nenhuma das ovelhas gestantes apresentou aborto, porém, nas inoculadas com 30 dias de gestação, constatou-se reabsorção fetal. A ovelha inoculada com 15 dias teve um cordeiro aparentemente normal e aquelas inoculadas com 90 dias de gestação tiveram o nascimento a termo de um cordeiro morto e outro fraco com dificuldade de se locomover. Os cordeiros necropsiados, nascidos de ovelhas inoculadas antes ou durante a gestação, apresentaram alterações

histopatológicas em diferentes tecidos, sendo as mais severas observadas no sistema nervoso central, caracterizadas pela presença de formas císticas do parasita, associadas com infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, áreas de necrose e em alguns casos presença de calcificação. Os cordeiros nascidos de ovelhas inoculadas 10 dias após o parto não apresentaram sinais clínicos da doença nem anticorpos contra o parasita. O cordeiro necropsiado não apresentou lesões em nenhum dos tecidos analisados. Um cordeiro nascido de ovelha não inoculada, não apresentou alterações microscópicas em nenhum dos tecidos analisados. Pelas lesões observadas nos cordeiros nascidos de animais inoculados pode-se concluir que ovelhas deslanadas podem ser usadas como modelo experimental de neosporose bovina.

ABSTRACT

SOCARRÁS, Teresa of Jesús Oviedo, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Dezembro 2001. **Experimental infection of sheep out of wool with *Neospora caninum***. Adviser: Marlene Isabel Vargas Vilória. Committee members: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo and João Carlos Pereira da Silva.

Sheep out of wool, in different reproductive stages, were inoculated with *N. caninum* tachizoites strain "NC-beef" with the purpose of study the pathophysiology of the disease and the possibility of using them as an experimental model of bovine neosporosis. Inoculation by intravenous route was used. Five pregnant sheep (one with 15 days, two with 30 days, two with 90 days), three not pregnant and two with 10 days post partum were inoculated. By serology, the animals were negative for *N.caninum* and *T. gondii*. Two pregnant sheep, not inoculated, were used as negative controls. Fourth weeks after the inoculation, all animals showed antibodies (IgG) against the parasite and so did their lambs. Abortion wasn't observed in sheep inoculated during pregnancy. In the animals inoculated with 30 days of gestation, was verified fetal reabsorption. A clinical normal lamb born from 15 days of gestation inoculated sheep and two weak lambs from those inoculated with 90 days of gestation. All lambs born from sheep inoculated before or during the gestation showed hystopathologic alterations in different tissues. The most severe were observed in the central nervous system. Inflammatory nonsuppurative processes with or without dystrophic mineralization were the most common lesions. Presence of tissue cysts was

also observed. Clinical signs of the disease or antibodies against the parasite in the lambs born from sheep inoculated 10 days post partum weren't observed. In the necropsy of one lamb belonging to this group no pathologic sign was observed. None of the animals of the control group showed histopathologic alterations. After analyzing the lesions found, we can conclude that sheep out of wool can be used as an experimental model of bovine neosporosis.

1.- INTRODUÇÃO

A neosporose é uma doença que foi descrita em 1988, sendo causada por um protozoário do gênero *Neospora*. Este parasita despertou interesse mundial a partir do momento que foi reconhecido como agente causador de aborto em bovinos.

A infecção com *Neospora caninum* tem impacto econômico especialmente na produção bovina. Estudos retrospectivos realizados em vários países do mundo em fetos bovinos abortados ou natimortos mostram esta doença como uma das principais causas de aborto em bovinos de leite.

Evidências de infecção natural e experimental em diferentes espécies animais mostram um amplo número de hospedeiros, mas, até esta data, não tem sido descrito nenhum caso de neosporose em humanos.

No caso de ruminantes, além de bovinos, a doença pode afetar ovelhas, cabras e ruminantes silvestres. Estudos experimentais com *N. caninum*, usando ovelhas e cabras, têm sido realizados não só para conhecer o comportamento da doença nestas espécies animais, mas também para serem utilizados como um possível modelo de neosporose bovina.

Estudos epidemiológicos demonstram que a distribuição do *N. caninum* é cosmopolita, sendo que no Brasil já foram descritos anticorpos contra o parasita em bovinos, cães e búfalos.

As ovelhas deslanadas têm importância econômica nos países tropicais, por serem animais bem adaptados às condições climáticas nestes países. Além disso, as exigências nutricionais desta espécie são menores

quando comparadas com os bovinos, permitindo assim que se produza proteína animal a menor custo.

No presente estudo, ovelhas deslanadas em diferentes estágios reprodutivos foram inoculadas com taquizoítos de *Neospora caninum* da cepa "NC-Beef", com a finalidade de verificar a fisiopatologia da doença na ovelha e no cordeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A neosporose é uma doença parasitária cujo agente etiológico é um protozoário do gênero *Neospora*, o qual é estrutural e geneticamente relacionado com o *Toxoplasma gondii* (DUBEY e LINDSAY, 1996; McALLISTER *et al.*, 1996). Taxonomicamente o parasita está classificado assim:

Sub-reino: Protozoa
Filo: Apicomplexa
Classe: Sporozoasioda
Ordem: Eucoccidiorida
Família: Sarcocystidae
Gênero: *Neospora*
Espécie: *N. caninum*
N. hughesi

(MUGRIDGE *et al.*, 1999; MARSH *et al.*, 1998; JONES *et al.*, 2000)

2.1. Histórico

O primeiro reconhecimento da doença foi feito por BJERKAS *et al.* (1984) na Noruega, em filhotes de cães da raça Boxer com sinais neurológicos associados a um protozoário semelhante ao *Toxoplasma gondii*. Embora não se tenham detectado anticorpos contra *Toxoplasma*, o agente foi erroneamente identificado como sendo este protozoário. Posteriormente, DUBEY *et al.* (1988a) usando tecidos incluídos em parafina, fizeram um estudo retrospectivo em 23 cães com diagnóstico ou suspeita de

toxoplasmose. Os autores observaram que em 10 dos 23 animais havia um parasita diferente de *T. gondii*, descrevendo-se então o novo gênero como *Neospora* e a espécie *Neospora caninum*.

Em 1988b, DUBEY *et al.* conseguiram isolar o *N. caninum* em cultura celular e em camundongos, a partir de cães infectados, dando assim cumprimento aos postulados de Koch. Nesse mesmo ano se produziu também o primeiro teste para diagnóstico sorológico de *N. caninum*, a imunofluorescência indireta (IFI). Entretanto, THILSTED e DUBEY (1989) foram os primeiros a descrever a presença de organismos semelhantes a *N. caninum* no cérebro de fetos bovinos abortados procedentes de um rebanho leiteiro no Novo México que apresentava abortos persistentes. Posteriormente, LINDSAY e DUBEY (1989) confirmaram este diagnóstico utilizando soros imunes específicos contra *N. caninum*. Os primeiros pesquisadores que reconheceram um protozoário semelhante a *T. gondii* como a maior causa de aborto em bovinos de leite na Califórnia foram BARR *et al.* (1990). O ciclo de vida do *N. caninum* foi elucidado por McALLISTER *et al.* (1998a) quando demonstraram que os cães são os hospedeiros definitivos deste parasita.

Nos eqüinos, o primeiro relato de neosporose foi feito em 1985, quando o parasita foi encontrado no pulmão de um feto abortado (DUBEY e PORTERFIELD, 1990). Até 1998, o *N. caninum* era a única espécie reconhecida do gênero. Nesse mesmo ano foi isolado do sistema nervoso central de um eqüino adulto na Califórnia um parasita semelhante ao *N. caninum*. Ele foi comparado com isolados canino e bovino mediante estudos ultraestruturais, antigênicos e moleculares, encontrando-se diferenças que confirmaram a existência de uma nova espécie, diferente de *N. caninum*, a qual foi denominada *Neospora hughesi* (MARSH *et al.*, 1998).

Experimentalmente tem-se observado que as ovelhas são altamente susceptíveis a infecção por *N. caninum* (DUBEY e LINDSAY, 1996; McALLISTER *et al.*, 1996; BUXTON *et al.*, 1997a; BUXTON *et al.*, 1998; JOLLEY *et al.*, 1999), no entanto, os resultados de uma pesquisa feita na Inglaterra e no País de Gales sugerem que a infecção natural por *N. caninum* não está associada a um número significativo de abortos em ovinos nestes países.

Na literatura o primeiro relato de neosporose ocorrida naturalmente em ovelhas foi feito por DUBEY *et al.* (1990) num cordeiro nascido a término com sintomatologia nervosa. O animal morreu um mês após o nascimento, sendo encontradas lesões principalmente na medula espinhal associada com a presença de cistos.

A neosporose tem sido relacionada com aborto em cabras em diversas ocasiões (BARR *et al.*, 1992; DUBEY *et al.*, 1992; DUBEY *et al.*, 1996a). Em todos os casos, foram observadas lesões no sistema nervoso central associadas à presença de cistos teciduais de *N. caninum*. A semelhança das ovelhas, as cabras são muito susceptíveis à inoculação experimental de *N. caninum*, sendo utilizadas como modelo experimental para estudos de neosporose bovina (LINDSAY *et al.*, 1995).

2.2. Biologia

Três estágios morfológicamente distintos são descritos na biologia do parasita: taquizoítos, cistos teciduais e oocistos.

2.2.1. Taquizoítos

Os taquizoítos de *N. caninum* medem aproximadamente 7,5 x 2 µm, embora, segundo DUBEY e LINDSAY (1996), este tamanho pode variar dependendo do estágio de divisão. A forma dos taquizoítos pode ser ovóide, semi-lunar ou globular e uma célula infectada pode conter mais de 100 taquizoítos. A multiplicação do parasita ocorre por endogenia, ou seja, a partir de um zoíto originam-se duas progênes (SPEER *et al.*, 1999). A invasão ativa é o mecanismo mediante o qual os taquizoítos penetram as células hospedeiras (HEMPHILL *et al.*, 1996).

Segundo SPEER *et al.* (1999), os taquizoítos de *N. caninum* podem ser encontrados dentro de vacúolos parasitóforos localizados no citoplasma de diferentes tipos de células animais, que servem como hospedeiras do parasita. Dentre estas encontramos: células neurais, macrófagos, fibroblastos, hepatócitos, células musculares e células do endotélio vascular

(DUBEY *et al.*, 1988a; BJERKAS e PRESTUS, 1988; SPEER e DUBEY, 1989).

2.2.2. Cistos

Os cistos podem ter forma oval ou arredondada, com um diâmetro entre 30µm até 107µm. A parede do cisto é lisa com uma espessura menor que 5µm. Podem conter entre 20 a 100 bradizoítos com tamanho aproximado de 8,1 x 2 µm (SPEER *et al.*, 1999).

A presença de cistos teciduais de *N. caninum* tem sido demonstrada aparentemente de forma exclusiva em tecido nervoso (SPEER *et al.*, 1999), porém LINDSAY *et al.* (1996b) constataram cistos no músculo ocular de um potro. Posteriormente, PETERS *et al.* (2001), usando técnicas de imunohistoquímica e de microscopia eletrônica, analisaram amostras de músculo esquelético de quatro cães que apresentaram sinais clínicos de neosporose e dois bezerros com infecção confirmada do parasita, apresentando claras evidências de cistos teciduais em músculo esquelético nestas espécies animais.

2.2.3. Oocistos

Os oocistos de *N. caninum* foram descobertos por McALLISTER *et al.* (1998a) em fezes de cães. Os oocistos não esporulados medem entre 11 e 12 µm de diâmetro, têm forma esférica ou oval e parede lisa. Após a esporulação, os oocistos contêm dois esporocistos com forma alongada e medem aproximadamente 6.5 x 2.0µm (LINDSAY *et al.*, 1999; McALLISTER, 1999).

2.2.4. Ciclo Biológico

O ciclo de vida do parasita foi descrito recentemente quando oocistos de *N. caninum* foram identificados em fezes de cães por McALLISTER *et al.* (1998a) (Figura 1). Eles demonstraram que cães alimentados com cistos

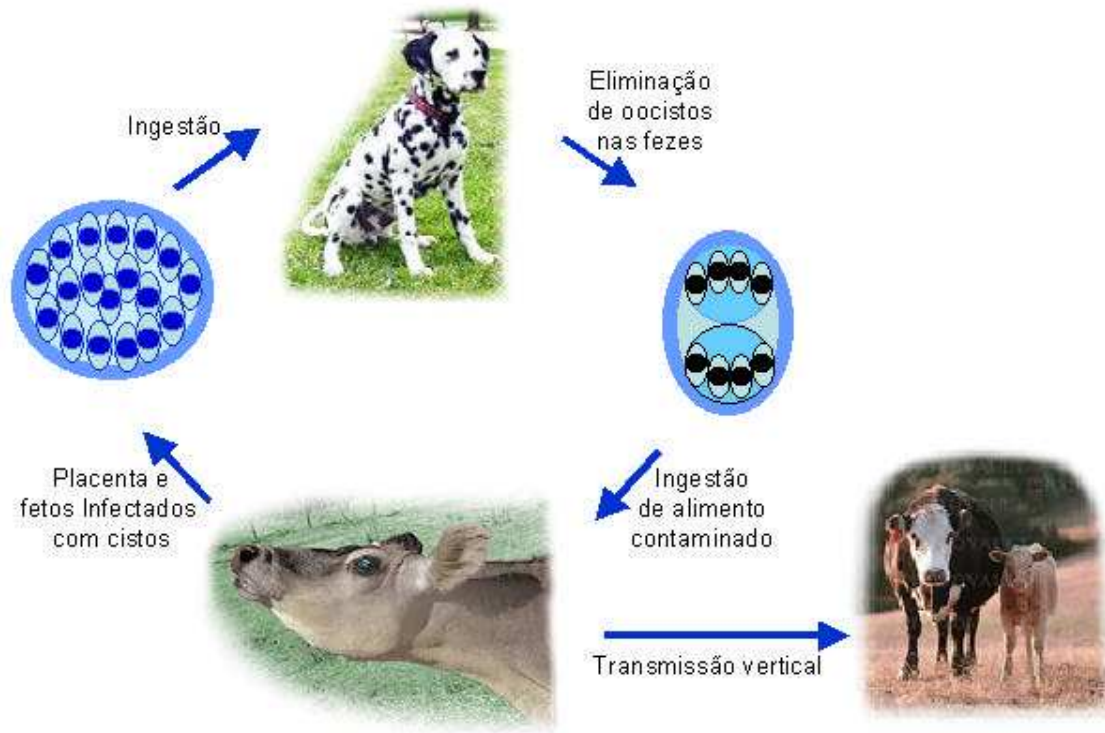


Figura 1. Ciclo biológico do *Neospora caninum*

teciduais, provenientes de camundongos infectados experimentalmente, podiam eliminar oocistos não esporulados nas fezes entre oito e 27 dias após ingestão. Após eliminação, os oocistos esporulam dentro de três dias, mostrando então dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos (MCALLISTER, 1998a; MCALLISTER, 1999; DUBEY, 1999). Oocistos de *N. caninum* são morfologicamente indistinguíveis de oocistos do gênero *Toxoplasma* e *Hammondia*. Até a presente data não se conhece a frequência de liberação dos oocistos, a sobrevivência dos mesmos no meio ambiente e se outros canídeos são igualmente hospedeiros definitivos para *N. caninum* (DUBEY, 1999). De idêntica forma, até agora não existem trabalhos relatando como acontece a formação dos oocistos no intestino do cão.

2.3. Hospedeiros e fontes de infecção

Evidência de infecção natural com *N. caninum* tem sido observada em cães (BARBER e TREES, 1998), bovinos (SCHARES *et al.*, 1998), ovelhas (DUBEY e LINDSAY, 1990), cabras (DUBEY *et al.*, 1992), cervos (DUBEY *et al.*, 1996b) e cavalos (DUBEY e PORTERFIELD, 1990; MARSH *et al.*, 1996). Anticorpos contra o parasita já foram demonstrados em soro de búfalos (DUBEY *et al.*, 1998a), coiotes (LINDSAY *et al.*, 1996a), raposas (SIMPSON *et al.*, 1997) e camelos (HILALI *et al.*, 1998) expostos naturalmente, sugerindo que estes animais são igualmente hospedeiros intermediários naturais para *N. caninum*.

Infecções experimentais têm sido induzidas em camundongos (LINDSAY e DUBEY, 1990a), ratas (LINDSAY e DUBEY, 1990b), cães (DUBEY *et al.*, 1988b), cabras (LINDSAY *et al.*, 1995), ovelhas (McALLISTER *et al.*, 1996), coiotes (LINDSAY *et al.*, 1996a), bovinos (BARR *et al.*, 1994b), porcos (JENSEN *et al.*, 1998) gerbils (DUBEY e LINDSAY, 2000), entre outros.

A transmissão transplacentária de *N. caninum* tem sido observada em bovinos (DUBEY, 1989), ovelhas (McALLISTER *et al.*, 1996) cabras (LINDSAY *et al.*, 1995), camundongos (COLE *et al.*, 1995a), cães (COLE *et al.*, 1995b), cervos (DUBEY *et al.*, 1996b) e primatas (BARR *et al.*, 1994a). Atualmente, é conhecido que a infecção transplacentária de *N. caninum* pode ocorrer repetidamente em bovinos e ovinos (BARR *et al.*, 1993, JOLLEY *et al.*, 1999).

Até a presente data, o potencial de *N. caninum* para infectar humanos é desconhecido (TRANAS *et al.*, 1999). Segundo PETERSEN *et al.* (1999), nenhum caso de infecção por *N. caninum* foi descrito no homem, mas a possibilidade de infecção em humanos não pode ser excluída devido ao fato deste organismo ter uma estreita relação filogenética com *T. gondii*, além do amplo número de hospedeiros.

Ainda não se conhece completamente o papel das formas infectantes de *N. caninum* na epidemiologia da doença. Hospedeiros susceptíveis podem infectar-se por ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos esporulados provenientes das fezes de cães, embora isto tenha

sido, até a presente data, comprovado só experimentalmente em camundongos (McALLISTER, *et al.*, 1998b). Acredita-se que em rebanhos bovinos a transmissão transplacentária tem maior importância na manutenção da doença (BUXTON *et al.*, 1997b, ANDERSON *et al.*, 2000). Entretanto, McALLISTER *et al.* (1998a) comprovaram experimentalmente que os cães fecham o ciclo do parasita ao consumirem cistos teciduais presentes em tecidos de camundongos. Pesquisas mais recentes demonstraram que cães alimentados com placentas provenientes de vacas soropositivas para *N. caninum* eliminam oocistos nas fezes, os quais foram identificados mediante bioensaios em gerbils. Isto confirma que restos placentários constituem fontes de infecção para estes canídeos (DIJKSTRA *et al.*, 2001).

2.4. Sinais clínicos e lesões

2.4.1. Caninos

Relatos sobre neosporose canina têm sido realizados em diversos países do mundo, a maioria deles envolvendo animais jovens congenitamente infectados e de raças diversas (DUBEY, 1999). O sinal clínico mais comumente observado é uma paresia dos membros posteriores, a qual avança progressivamente para uma paralisia espástica (DUBEY e LINDSAY, 1996; PERL *et al.*, 1998). Também tem sido observado dificuldade para deglutir, paralisia da mandíbula (HAY *et al.*, 1990), ataxia, flacidez e atrofia muscular (DUBEY *et al.*, 1998b).

Outros estudos demonstram que na espécie canina o parasita afeta basicamente o sistema nervoso central e o tecido muscular. A maioria das lesões têm sido observadas em filhotes com menos de um ano, apresentando sinais neurológicos progressivos, muitos deles sacrificados devido a um prognóstico reservado. Histopatologicamente se tem observado lesões de encefalomielite e miosite associadas com *N. caninum*. Em alguns casos, o diagnóstico foi confirmado por imunohistoquímica ou isolamento do agente em cultura celular e em animais de laboratório a partir do tecido infectado (BJERKAS e DUBEY, 1991; MAYHEW *et al.*, 1991; JACOBSON e JARDINE, 1993; FLAGSTAD *et al.*, 1995; DUBEY *et al.*, 1988a).

Outras lesões associadas com *N. caninum* são necrose no sistema nervoso central e no fígado (DUBEY *et al.*, 1988a), meningoencefalomielite,

poliradiculoneurite (CUMMINGS *et al.*, 1988), poliradiculite, polimiosite (CUDDON *et al.*, 1992) e miocardite (ODIN e DUBEY, 1993).

A dermatite em cães adultos pode ser uma apresentação clínica não usual da doença (DUBEY *et al.*, 1995; PERL *et al.*, 1998). A neosporose cutânea foi descrita em quatro oportunidades envolvendo animais de seis, 11, 12 e 15 anos de idade (DUBEY *et al.*, 1988b; DUBEY *et al.*, 1995; FRITZ *et al.*, 1997; PERL *et al.*, 1998). Além de lesões ulcerativas na pele, também se observa severa dermatite piogranulomatosa difusa, com presença de um grande número de células inflamatórias e numerosos taquizoítos dentro de macrófagos, neutrófilos e, ocasionalmente, em células endoteliais (PERL *et al.*, 1998).

Em caninos a neosporose pode-se confundir principalmente com alterações neurológicas, musculares, gastrintestinais ou respiratórias, causadas por outros agentes etiológicos, como exemplos temos o vírus da cinomose e o protozoário *T. gondii* (MINEO *et al.*, 2001).

2.4.2. Bovinos

Em bovinos adultos o aborto é o único sinal clínico observado. A maioria dos abortos ocorre entre o 5^o e 6^o mês de gestação, embora se possam apresentar a partir do terceiro mês até o término da gestação. O aborto de fetos com menos de três meses não tem sido descrito (ANDERSON *et al.*, 1991)

Os fetos podem morrer no útero e serem reabsorvidos, mumificados, autolisados ou nascerem mortos (DUBEY e LINDSAY, 1996). A maioria dos animais infectados por via transplacentária nascem clinicamente normais, embora cronicamente infectados (ANDERSON *et al.*, 2000). Podem nascer animais que manifestem sinais clínicos de neosporose, tais como: disfunção dos membros até paralisia completa (ANDERSON *et al.*, 2000), baixo peso, exoftalmia e uma aparência assimétrica dos olhos (DUBEY e LINDSAY, 1996; DUBEY, 1999).

Em infecções naturais, os fetos bovinos abortados geralmente se encontram autolisados com acúmulo de fluido serosanguinolento nas cavidades corporais (ANDERSON *et al.*, 2000). Histologicamente é possível encontrar lesões em diferentes tecidos fetais, embora as mais significativas se encontram em cérebro e consistem em encefalomielite não supurativa caracterizada por infiltração multifocal, com ou sem necrose (DUBEY e LINDSAY, 1996). Ocasionalmente pode-se observar focos de calcificação (BOULTON *et al.*, 1995). BARR *et al.* (1991) relataram outras lesões que também podem ser encontradas, tais como: epicardite não supurativa, acompanhada ou não de miocardite focal não supurativa, miosite, hepatite portal não supurativa acompanhada freqüentemente de necrose hepática focal e pneumonia intersticial focal não supurativa. DUBEY *et al.* (1998c) observaram hidrocefalia num feto bovino abortado no 7º mês de gestação e descreveram a presença de numerosos taquizoítos no cérebro, além de encefalite necrotizante não supurativa.

2.4.3. Ovinos

A neosporose induzida experimentalmente em ovinos de lã e bovinos apresenta semelhanças clínicas e histopatológicas (McALLISTER *et al.*, 1996; BUXTON *et al.*, 1997a). No entanto, até a presente data, não há informação da doença, nem experimental nem naturalmente em ovelhas deslanadas.

Embora o aborto seja o principal sinal clínico observado, BUXTON *et al.* (1997a) relataram resposta febril em ovelhas Scottish Blackface inoculadas com altas doses do isolado Liverpool de *N. caninum*. Também têm-se observado abortos, mumificações, cordeiros nascidos mortos, fracos ou cordeiros nascidos clinicamente normais em ovelhas Rambouillet e Shetland cruzadas com Scottish Blackface inoculadas experimentalmente (McALLISTER *et al.*, 1996; BUXTON, *et al.*, 1997a; JOLLEY *et al.*, 1999). BUXTON *et al.* (1998) observaram reabsorção de fetos em ovelhas Scottish

Blackface que foram inoculadas experimentalmente aos 45 dias de gestação.

O primeiro relato de neosporose congênita ocorrido naturalmente em ovelhas data de 1990. O cordeiro afetado nasceu débil, parcialmente atáxico e foi a óbito com uma semana de idade, sendo que a sintomatologia foi associada à mielite produzida por *N. caninum* (DUBEY *et al.*, 1990). Pesquisas feitas por OTTER *et al.* (1997) na Inglaterra e no País de Gales sugerem que a infecção por *N. caninum* não está associada com um número significativo de abortos em ovinos.

Em ovelhas Rambouillet que foram inoculadas experimentalmente com *N. caninum* aos 65, 90 e 120 dias de gestação por McALLISTER *et al.*, (1996) observou-se em todos os recém nascidos, vivos e mortos, meningite e mineralização distrófica em tecido cerebral, miosite multifocal em diafragma e língua, epicardite, endocardite, miocardite multifocal, hepatite periportal ou perivascular e pneumonia intersticial moderada. Além disto, DUBEY e LINDSAY (1990) descreveram encefalite com múltiplos focos de gliose, hemorragia, necrose, infiltrado perivascular de células mononucleares e presença de taquizoítos nas áreas de lesão, assim como miosite em fetos abortados de ovelhas inoculadas com *N. caninum*.

Na placenta de ovelhas inoculadas experimentalmente, BUXTON *et al.* (1998) observaram processos inflamatórios acompanhados de alterações degenerativas, necróticas e áreas de mineralização, além de estruturas semelhantes a taquizoítos.

2.4.4. Eqüinos

A primeira observação de neosporose em eqüinos foi feita por DUBEY e PORTERFIELD (1990) num feto abortado em 1985, sendo que os autores constataram a presença de numerosos taquizoítos em lesões pulmonares.

Neosporose visceral foi diagnosticado em uma égua com sintomas de anemia e diminuição de peso. À necropsia observou-se aumento de tamanho, necrose, hemorragia e trombose de nódulos linfáticos mesentéricos. Histologicamente, no intestino delgado observaram-se hiperemia e edema, infiltrado inflamatório de neutrófilos e linfócitos, além de vasculite moderada. Taquizoítos de *Neospora* foram observados nos cortes histológicos de linfonodos e intestino delgado (GRAY *et al.*, 1996).

A Mieloencefalite protozoária eqüina ocasionada pelo *Sarcocystis neurona* é considerada como uma das doenças neurológicas mais comuns em eqüinos da América do Norte. No entanto, pesquisas realizadas por MARSH *et al.* (1996) e HAMIR *et al.* (1998) demonstraram que a neosporose pode ser igualmente relacionada com casos clínicos dessa enfermidade. Segundo estes autores, a doença se manifesta clinicamente com sintomatologia nervosa como ataxia severa e dismetria de membros posteriores.

2.5. Epidemiologia

O cão tem um papel muito importante no ciclo de vida e na manutenção da doença no meio ambiente por ser o hospedeiro definitivo, mesmo assim muitos autores acreditam que em rebanhos bovinos o parasita é transmitido de forma mais eficiente de geração para geração, pela via transplacentária (BUXTON *et al.*, 1997b; SCHARES *et al.*, 1988). Estudos de PETERS *et al.* (2001) evidenciaram a presença de cistos teciduais em músculo esquelético de bovinos infectados naturalmente com *N. caninum*, fato que tem uma importância epidemiológica muito grande e que poderia ajudar a elucidar o papel do cão na transmissão da infecção.

Atualmente, sabe-se que o aborto pode acontecer repetidas vezes em vacas e ovelhas (BARR *et al.*, 1993; JOLLEY *et al.*, 1999), mas nenhuma transmissão horizontal tem sido demonstrada até a presente data (DUBEY, 1999).

Anticorpos contra *N. caninum* têm sido relatados em diversos países do mundo, sendo que, na América do Sul, encontrou-se a ocorrência em 20% de soros de cães do Uruguai (BARBER *et al.*, 1997). Já na Argentina, CAMPERO *et al.* (1998) demonstraram a presença do *N. caninum* em dois fetos bovinos abortados. VENTURINI *et al.* (1999) detectaram anticorpos contra o parasita mediante a técnica de IFI em soro de 24,4% e 4,5% de fetos bovinos abortados, procedentes de vacas de leite e carne respectivamente, e em 64,5% de vacas que abortaram.

No Brasil, foram detectados anticorpos em bovinos de leite por GONDIM e SARTOR (1997) usando a técnica de IFI. Posteriormente,

GONDIM *et al.* (1999a) utilizando a mesma técnica de diagnóstico, encontraram uma prevalência de 14,09% em bovinos leiteiros do estado da Bahia. Já MELO e LEITE (1999), em trabalhos realizados em Minas Gerais, encontraram sorologia positiva para *N. caninum*. OGAWA *et al.* (1999) usando IFI relataram a presença de anticorpos contra *N. caninum* no estado do Paraná em 11,69% dos animais estudados. Usando a mesma técnica de IFI, MINEO *et al.* (2001) mostraram a presença de anticorpos contra *N. caninum* no soro de 163 cães que foram admitidos no Hospital Veterinário de Uberlândia, sendo que anticorpos contra o parasita foram detectados em 11 animais (6,7%), embora 5 deles (3,1%) foram reativos também para *T. gondii* e 6 (3,7%) só para *N. caninum*. No estado da Bahia, GONDIM *et al.* (1999b) detectaram anticorpos em 42 (36,52%) soros de búfalos analisados mediante IFI, indicando a exposição destes animais ao parasita.

Os primeiros a isolar *N. caninum* de cérebro de um cão infectado naturalmente no Brasil foram GONDIM *et al.* (2001), sendo que a identificação do parasita foi confirmada mediante exame imunohistoquímico e reação em cadeia de polimerase (PCR), a cepa foi denominada “NC–Bahia”.

2.6. Diagnóstico

Após o isolamento de *N. caninum* por DUBEY *et al.* (1988b) a partir de cães infectados naturalmente, se desenvolveu o primeiro teste de diagnóstico sorológico para neosporose: a reação de imunofluorescência indireta (IFI), utilizando como antígeno taquizoítos derivados de cultura celular. Posteriormente, LINDSAY e DUBEY (1989) desenvolveram um teste imunohistoquímico para detectar o parasita em tecidos (Complexo Avidina–Biotina–Peroxidase).

Os testes de ELISA são utilizados para a demonstração de anticorpos dirigidos contra uma ampla variedade de agentes infecciosos, dentre eles o *N. caninum*. BJORKMAN *et al.* (1994) e PARÉ *et al.* (1995) desenvolveram os primeiros testes de ELISA para o diagnóstico de neosporose em bovinos e cães, sendo que para uso em cães é descrito um tipo de ELISA usando antígenos de *Neospora* associados a Quil A, formando “Iscom” (BJORKMAN

et al., 1994). Em bovinos os antígenos totais têm sido amplamente usados para ELISA como meio de diagnóstico (BJORKMAN e UGGLA, 1999).

Em 1998, ROMAND *et al.* descreveram um teste de aglutinação direta usando taquizoítos do isolado canino NC-1, o qual tem a vantagem de não requerer anticorpo secundário espécie-específico.

A imunohistoquímica é uma das técnicas mais usadas para confirmar o diagnóstico de neosporose em fetos abortados, no entanto, quando o número de parasitas no tecido é baixo pode ser ineficiente e dar lugar a falsos negativos. Pesquisas realizadas por BASZLER *et al.* (1999) demonstram que o PCR usado para detectar DNA de *N. caninum* em tecidos de animais infectados tem uma alta sensibilidade quando comparado com técnicas imunohistoquímicas.

Atualmente, o principal método de diagnóstico de neosporose é a observação microscópica de lesões nos tecidos, especialmente cérebro, coração e fígado. A confirmação deve ser feita mediante provas imunohistoquímicas como peroxidase anti-peroxidase, para identificação do parasita, bem como coleta de soro sanguíneo para avaliação sorológica (DUBEY, 1999).

2.7. Importância econômica

Embora a neosporose tenha importância como causa de aborto bovino, principalmente em gado leiteiro, poucas são as informações que existem sobre as perdas econômicas ocasionadas por esta doença (ANDERSON *et al.*, 1991; TRESS *et al.*, 1999; THURMOND e HIETALA, 1997; DUBEY, 1999; ELLIS, 1997).

As perdas econômicas devidas a neosporose bovina podem ser atribuídas a:

- Aborto;
- Natimortos ou mortalidade neonatal;
- Morte fetal e reabsorção, manifestada como retorno ao serviço;
- Incremento no tempo de concepção ou infertilidade;
- Incremento no descarte de animais;
- Redução na produção de leite;
- Redução no valor dos animais (TREES *et al.*, 1999).

Além das perdas econômicas mencionadas, THURMOND e HIETALA (1997) consideraram que também devem ser incluídos outros custos, tais como: honorários profissionais e estabelecimento de diagnósticos.

Em rebanhos da Califórnia estimase que cerca de 5 a 15% das gestações terminam em aborto e que aproximadamente 33% deles são devidos a neosporose. As perdas econômicas diretamente relacionadas com abortos por *N. caninum* neste estado somam aproximadamente US\$ 35 milhões por ano. Na Austrália, as perdas atribuídas a neosporose na indústria leiteira alcançam cifras de US\$ 85 milhões e na indústria de carne ao redor de 25 milhões anualmente (ELLIS, 1997).

Até a presente data, não existem trabalhos que relatem as perdas econômicas ocasionadas pela neosporose no Brasil.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estudar a patofisiologia da infecção com *Neospora caninum* em ovelhas deslanadas inoculadas em diferentes estágios reprodutivos.

3.2. Objetivos específicos

- a. Verificar a presença de alterações macroscópicas e microscópicas produzidas por *N. caninum*;
- b. Observar o efeito do parasita nos cordeiros quando as ovelhas são inoculadas em diferentes estágios reprodutivos;
- c. Verificar se ovelhas deslanadas podem ser usadas como modelo experimental de neosporose bovina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Parasita

Neste estudo foram utilizados taquizoítos de *Neospora caninum*, da amostra denominada “NC-beef”, isolada de um bovino de carne naturalmente infectado nos Estados Unidos da América, gentilmente cedida pelo professor Milton McAllister da Universidade de Illinois.

4.2. Cultivo de *Neospora caninum*

Para replicar e manter a amostra do parasita utilizaram-se células VERO (ATCC 11096) mantidas em garrafas de 25 cm² com meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina, incubadas a 37°C e 5% de CO₂. Quando as células se expandiam formando uma monocamada, eram infectadas com taquizoítos de *N. caninum* e em seguida incubadas nas mesmas condições anteriores. As culturas foram observadas diariamente, usando microscópio invertido para verificar o crescimento e multiplicação dos taquizoítos. Quando Aproximadamente 80% da monocamada estava infectada se recolhiam os taquizoítos mediante ruptura mecânica das células com ajuda de “Cell Scrapers” sendo em seguida replicados ou recolhidos e mantidos em nitrogênio líquido.

4.3. Animais

Utilizaram-se 12 ovelhas deslanadas em diferentes estágios reprodutivos provenientes do setor de ovinocultura da Universidade Federal de Viçosa. Antes da inoculação com *N. caninum* foi feita sorologia de todos os animais para detectar anticorpos contra este parasita e *T. gondii*. Igualmente, foi realizada ultra-sonografia para verificar presença de gestação e, em caso positivo, a fase da mesma.

Os animais foram identificados usando uma placa numerada na orelha e as crias nascidas com o mesmo número da mãe, precedido pela letra F. As ovelhas foram albergadas em um boxe com paredes e chão revestidos de cimento e isoladas de outros animais. Eram alimentadas com capim picado, ração com 20% de proteína e água “*ad libitum*”.

4.4. Inoculação

Após a cultura e recolhimento dos taquizoitos de *N. caninum*, estes foram retirados das garrafas de cultura, juntamente com os restos de células VERO, colocados em tubos de centrifuga de 10 ml, onde foram bem homogeneizados com ajuda de uma pipeta de 5 ml. Em seguida, esta mistura de taquizoitos foi alíquotada em doses de 1,5 ml/animal e mantidas em refrigeração até o momento da inoculação. O tempo transcorrido entre a preparação do inóculo e a inoculação dos animais foi de aproximadamente 30 minutos.

Dez ovelhas foram inoculadas por via intravenosa com taquizoitos de *N. caninum* cultivados *in vitro*, sendo que, três ovelhas foram inoculadas antes da gestação (6, 7 e 8), uma com 15 dias de gestação (5), duas com 30 dias de gestação (2 e 9), duas com 90 dias de gestação (4 e 11) e duas ovelhas 10 dias após o parto (1 e 10). Além destas, uma ovelha gestante (3) e outra não gestante (12) não inoculadas foram usadas como controle negativo (Tabela 1).

Após a inoculação e durante as 32 semanas que durou o experimento os animais foram observados diariamente para verificar a ocorrência de abortos ou nascimentos.

Tabela 1 – Identificação das ovelhas e estágio reprodutivo no momento da inoculação.

Identificação dos animais	Estagio reprodutivo
1	10 DAP
10	10 DAP
6	AM
7	AM
8	AM

5	15 DG
2	30 DG
9	30 DG
4	90 DG
11	90 DG
3	Controle (-)
12	Controle (-)

4.5. Coleta de amostras

4.5.1. Amostras de sangue

Duas semanas após inoculação foi feita a primeira coleta de sangue para obtenção de soro, com a finalidade de verificar a presença de anticorpos contra *N. caninum*. O sangue para obtenção do soro foi coletado semanalmente até a décima primeira semana após a inoculação, totalizando nove coletas.

4.5.2. Amostras de tecidos e processamento histológico

Três ovelhas inoculadas, além de um controle negativo, foram sacrificadas e necropsiadas seis horas após o parto, ocasião em que se colheram amostras de diversos tecidos: cérebro, coração, pulmão, fígado, rins, baço, intestino, útero, placenta, língua, diafragma e músculo reto dorsal.

Um total de seis cordeiros foram necropsiados: um cordeiro (F7) cuja mãe foi inoculada antes da gestação e um cordeiro (F5) filho de ovelha inoculada com 15 dias de gestação, ambos foram necropsiados seis horas após o nascimento. Um cordeiro (F1), nascido de ovelha inoculada 10 dias após o parto, foi sacrificado e necropsiado após sete semanas de lactação. Um natimorto (F4) e um outro cordeiro (F11), nascidos de ovelhas inoculadas com 90 dias gestação, assim como um controle negativo (F3) também foram sacrificados. Destes animais, coletaram-se amostras de cérebro, coração, pulmão, fígado, baço, rins, língua, diafragma e músculo reto dorsal.

As amostras recolhidas foram fixadas em formol a 10% neutro e tamponado, processadas e coradas pela hematoxilina e eosina, usando a metodologia descrita por LUNA (1968).

Cérebro, cerebelo e medula, bem como amostras de placenta e músculo esquelético, foram examinadas por imunohistoquímica usando o sistema de peroxidase anti-peroxidase (PAP), descrito por PROPHET *et al.* (1992).

4.6. Produção de anti-soros

4.6.1. Produção de imunoglobulina G (IgG) de coelho anti-IgG de ovelha

Para a produção de IgG de coelho anti-IgG de ovelha foram utilizados dois coelhos inoculados com IgG de ovelha e adjuvante de Freund completo e incompleto. Segundo técnica descrita por McKINNEY e PARKINSON (1987), 1mg de IgG de ovelha foi dissolvida em 500µl de solução salina 0,85%, misturada com 500µl de adjuvante de Freund e agitada durante 30 minutos até sua completa homogeneização. Após a preparação do inóculo, este foi aplicado nos animais por via subcutânea. O esquema de inoculação é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Esquema de inoculação para produção de IgG de coelho anti-IgG de ovelha

No da inoculação	Data	Inoculo	Adjuvante de Freund
1 ^a	05-01-2001	1mg	Completo
2 ^a	19-01-2001	2mg	Completo
3 ^a	03-02-2001	1mg	Incompleto

Vinte dias após a última inoculação, os coelhos foram sacrificados e o sangue recolhido em recipiente estéril para obtenção de soro. Posteriormente, foi aliquoteado em tubos tipo Eppendorf e armazenado a -20°C até o seu uso.

4.6.2 Produção de IgG de coelho anti – *N. caninum*.

Utilizaram-se taquizoítos do parasita filtrados em “Sephadex G10” e ressuspendidos em 1 ml de PBS pH 7,2. Foram inoculados dois coelhos por via subcutânea. Como adjuvante se utilizou 0,5mg de saponina diluída em 1ml de PBS pH 7,2 e injetado separadamente pela mesma via. O esquema de inoculação é apresentado na Tabela 3. Oito dias após a última inoculação os coelhos foram sacrificados e o sangue recolhido em recipiente estéril para obtenção de soro. O soro foi aliqotado em tubos tipo Eppendorf e armazenado a –20°C até o seu uso

Tabela 3 – Esquema de inoculação para produção de IgG de coelho anti *N. caninum*.

Nº da inoculação	Data	Inoculo	Adjuvante
1ª	16-03-2001	<i>N. caninum</i> - beef	Saponina 0,5 mg
2ª	31-03-2001	<i>N. caninum</i> - beef	Sem adjuvante
3ª	29-04-2001	<i>N. caninum</i> - beef	Saponina 0,5 mg

4.6.3. Purificação de IgG

Os diferentes anti-soros obtidos foram precipitados para obtenção de IgG mediante uma técnica não cromatográfica (McKINNEY e PARKINSON 1987).

O soro obtido segundo itens 4.6.1.e 4.6.2 foi diluído com quatro volumes de tampão acetato e o pH ajustado para 4,5 com NaOH 0,1 N. Sob agitação, adicionou-se lentamente ácido caprílico na proporção de 25µl/ml da amostra diluída. Após adição do ácido, a agitação foi mantida durante 30 minutos. Posteriormente centrifugou-se a 10.000g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado e misturado com PBS 10x, na proporção de 10 partes de sobrenadante para uma de PBS, ajustou-se o pH para 7,4 com NaOH 1,0 N. O sobrenadante foi resfriado a 4°C e precipitado com sulfato de amônio a 45% sob agitação durante 30 minutos. Logo após foi centrifugado

a 5000g a 4°C durante 40 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em PBS 10x em quantidade equivalente 1:10 do volume original de soro. Este material foi dialisado contra 100 volumes de PBS 1:10 durante 12 horas. Posteriormente, o material foi aquecido entre 50–55°C durante 20 minutos e centrifugado a 5.000g durante o mesmo tempo. O sobrenadante foi aliqotado em tubos tipo Eppendorf e armazenado a –20°C até o seu uso. Uma amostra das imunoglobulinas precipitadas foi corrida em gel redutor de poliacrilamida 10% (PAGE-SDS), sendo confirmadas duas bandas cujos pesos moleculares correspondiam às cadeias leve e pesada da IgG.

4.6.4. Conjugação da IgG com isotiocianato de fluoresceína (FITC)

Anticorpos do tipo IgG de coelho anti- IgG de ovelha foram misturados com Na₂HPO₄ 0,2 M na proporção de ¼ do volume a ser marcado. O FITC, na proporção de 25 µg/mg de proteína a ser marcada, foi solubilizado em Na₂HPO₄ 0,1 M e se misturou por gotejamento com os anticorpos. Imediatamente se ajustou o pH para 9,5 com Na₃PO₄ 0,1 M. Adicionou-se solução de NaCl a 0,85% na proporção de ¼ do volume de anti-soro a ser conjugado, misturou-se lentamente e deixou-se em repouso a temperatura ambiente até completar 75 minutos, contados a partir da adição do FITC. Logo após, centrifugou-se a 2.500g a 4°C durante 10 minutos. Desprezando o sedimento, o sobrenadante foi dialisado contra freqüentes trocas de PBS 1:10 pH 7,6 durante três dias. Posteriormente foi aliqotado e estocado a –20°C até o seu uso.

4.7. Produção de antígenos para imunofluorescência

4.7.1 Purificação do antígeno

Sem retirar o meio de cultivo e com ajuda de um “Cell Screper” foi raspado o fundo da garrafa de cultura contendo os taquizoítos. O conteúdo da garrafa foi colocado em tubo de centrifuga de 10ml e centrifugado a

1.500g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 2ml de PBS pH 7,2. Antecipadamente, foi preparado o “Sephadex G10” em concentração de 1g/3ml de PBS pH 7,2 em bquer de 40 ml e expostas a luz UV durante 10 minutos. Utilizando uma seringa de 3,0 ml sem êmbolo montada em um suporte, foi feita a coluna de “Sephadex G10” até uma altura de 2,5ml. Posteriormente, a mistura de taquizoítos e células foi passada lentamente pela coluna, sendo que os restos celulares eram retidos e só taquizoítos passavam através da mesma. O material filtrado foi centrifugado a 1.500g durante 15 minutos e ressuspensionado em 1,0ml de PBS pH 7,2. Seguidamente foi feita contagem de taquizoítos em câmara de Neubauer para logo serem diluídos em uma concentração de 300 taquizoítos/ μ l de PBS.

4.7.2 Sensibilização de lâminas para IFI

Os taquizoítos purificados foram usados para a sensibilização de lâminas de vidro recobertas com teflon com 10 poços de cinco mm de diâmetro. Em cada poço se colocaram 15 μ l de PBS-FA contendo taquizoítos e deixados para secar a temperatura ambiente. Posteriormente, foram embrulhadas em papel absorvente e papel alumínio e armazenadas a -70°C até seu uso.

4.8. Técnicas imunológicas

4.8.1. Imunofluorescência indireta para detectar anticorpos contra *N. caninum*

O ponto de corte para o soro foi a diluição de 1:100 em PBS-FA sendo que em cada lâmina foram incluídos controles positivo e negativo. Utilizaram-se 15 μ l de soro diluído 1:100 em PBS-FA que foram colocados sobre os poços das lâminas sensibilizadas. Os cortes foram incubados durante 40 minutos a 37°C e posteriormente se fizeram duas lavagens com PBS-FA de 5 e 10 minutos cada. Após secagem à temperatura ambiente adicionaram-se 15 μ l de IgG de coelho anti-ovelha conjugada com

isotiocianato de fluoresceína 1:600, produzida no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários, BIOAGRO. Novamente foram feitas duas lavagens em PBS-FA sobre leve agitação, 5 minutos cada, e se procedeu à montagem da lamínula utilizando Anti-fade, com o objetivo de evitar a perda de fluorescência.

4.8.2. Técnica de Peroxidase anti-peroxidase

Cortes de tecido incluídos em parafina e com espessura de 5 μm foram colocados em estufa durante 24 horas. Foram desparafinados em dois banhos de xilol de 10 minutos cada, seguido de hidratação em série decrescente de álcoois absoluto I e II, 90%, 80%, 70% e PBS pH 7,4 com duração de 5 minutos cada. A peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio metanólico 3% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizou lavagem com PBS pH 7,4 durante 5 minutos. Enxugaram-se os cortes e em seguida foi feita digestão enzimática dos mesmos utilizando tripsina 1mg/ml em PBS pH 7,4 sendo incubados durante 10 minutos a 37°C.

Os cortes foram lavados duas vezes com PBS pH 7,4 durante 5 minutos cada. Posteriormente, cobriram-se os cortes com soro normal de cabra diluído 1:10 em PBS pH 7,4 e em seguida foram incubados em câmara úmida durante 45 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente enxugou-se o excesso de soro normal e sem deixar secar os cortes se colocou o anticorpo primário específico, IgG de coelho anti-*Neospora caninum*, diluído 1:50 em PBS pH 7,4. Os cortes foram incubados durante 18 horas em câmara úmida a 4°C. Após incubação, foram feitas três lavagens com PBS pH 7,4 durante 5 minutos cada. Imediatamente se cobriram com o anticorpo secundário, IgG de cabra anti-IgG de coelho 1:10 em PBS pH 7,4 e incubados durante 45 minutos a 37°C em câmara úmida. Realizaram-se três lavagens com PBS pH 7,4 durante 5 minutos cada e logo em seguida se cobriram os cortes com o complexo PAP 1:200, produzido em coelho ("SIGMA"). Imediatamente se incubaram durante 45 minutos em câmara úmida a 37°C. Foram feitas duas lavagens com PBS pH 7,4 durante 5 minutos cada e seguidamente colocados em solução reveladora de

diaminobenzidina durante um minuto. Os cortes foram lavados em PBS pH 7,4 durante 5 minutos e contracorados com hematoxilina de Harris diluída 1:1 em água destilada durante 6 segundos. Posteriormente foram desidratados em soluções crescentes de álcoois 70%, 80%, 90% e dois álcoois absolutos, diafanizados em xilol e cobertos com lamínulas usando "Entellan".

5. RESULTADOS

5.1. Culturas "in vitro"

Seguindo as técnicas descritas no item 4.2 constatou-se que entre quatro a cinco dias após a inoculação dos taquizoítos de *N. caninum*

observava-se início da destruição da monocamada de células VERO, a qual progredia rapidamente até completa destruição entre sete a oito dias. Desde o início da destruição da monocamada era possível observar os taquizoítos nas áreas destruídas e no citoplasma celular (Figuras 2A e B).

5.2. Produção de IgG de coelho anti-IgG de ovelha

A especificidade da IgG de coelho anti-IgG de ovelha foi demonstrada mediante imunodifusão em agar. O título encontrado foi 1:1.280

5.3. Produção IgG de coelho anti-*N. caninum*.

A especificidade do anti-soro foi determinada mediante a técnica de peroxidase anti-peroxidase realizada sobre amostras de sistema nervoso central nas quais estavam presentes formas císticas do parasita. Igualmente utilizaram-se amostras de músculo cardíaco apresentando cistos de *Sarcocystis sp* os quais não apresentaram reação positiva.

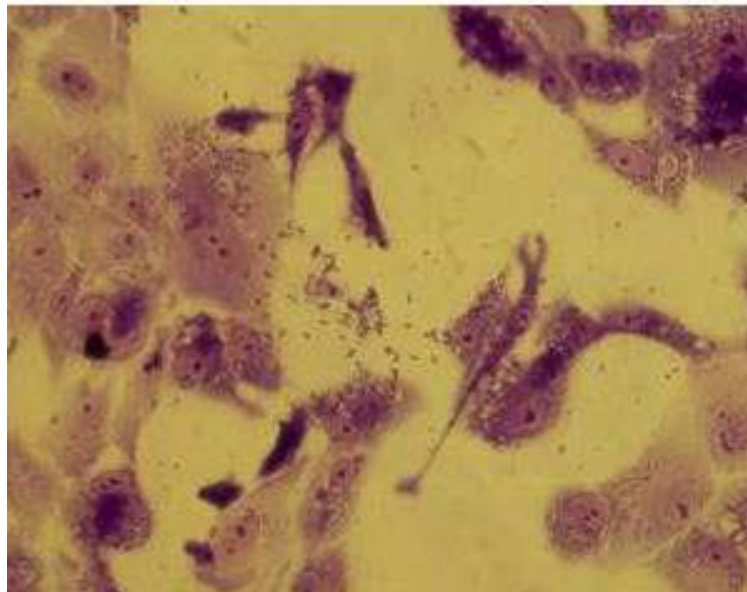
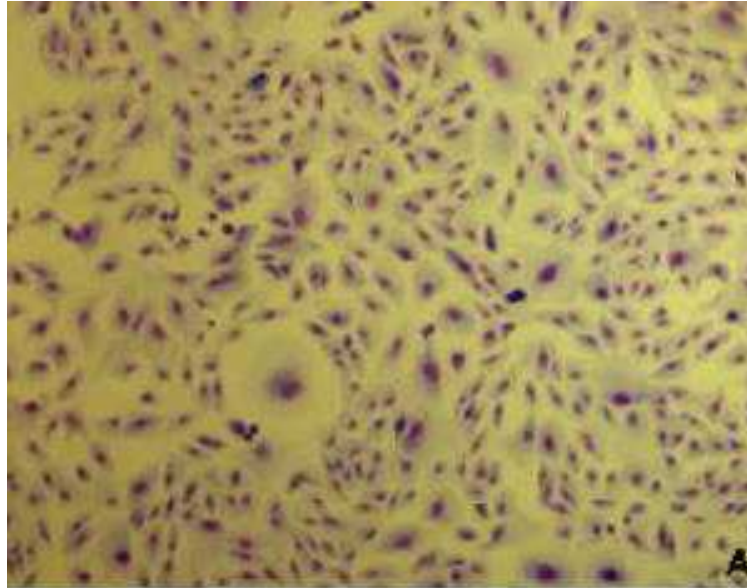


Figura 2. **A.** Células VERO não infectadas, Instant-Prove® 200X. **B.** Células Vero 6 dias após infecção com taquizoítos de *N. caninum* (setas), Giemsa, 400X

5.4. IFI para detectar título de anticorpos

A partir da quarta semana após inoculação se detectaram anticorpos da classe IgG contra *N. caninum*, sendo que o título máximo testado foi de 1:6400 com resultados positivos para todos os animais infectados na sexta semana pós-inoculação. Estes níveis de anticorpos se mantiveram até a última coleta de soro do experimento que foi na décima primeira semana

pós-inoculação (Figura 3). Na Figura 4 observa-se fluorescência para taquizoítos de *N. caninum*. Todos os cordeiros nascidos de mães inoculadas antes e durante a gestação apresentaram anticorpos contra *N. caninum*. Os cordeiros nascidos de ovelhas inoculadas 10 dias após o parto não apresentaram anticorpos contra o parasita. Tanto as ovelhas quanto os cordeiros controle não apresentam títulos de anticorpos contra o parasita.

5.6. Sinais clínicos

Das dez ovelhas que foram inoculadas, quatro (40%) apresentaram clinicamente resposta febril entre seis e dez dias após inoculação, com temperatura variando entre 40°C e 43°C.

Nas duas ovelhas (2 e 9) que foram inoculadas com 30 dias de gestação, verificou-se por ultra-sonografia, 60 dias após a inoculação, que havia ocorrido reabsorção fetal.

Das três ovelhas (6, 7 e 8) inoculadas antes da monta apenas duas ficaram gestantes (7 e 8), as quais deram crias clinicamente normais.

Da ovelha (5) inoculada com 15 dias de gestação nasceu um cordeiro clinicamente normal.

Duas ovelhas (4 e 11) que foram inoculadas com 90 dias de gestação tiveram partos a termo, sendo que o cordeiro F4 nasceu morto e o F11 mostrava-se fraco e com dificuldade para se movimentar (Figuras 5 A e B).

Duas crias lactentes, nascidas de ovelhas inoculadas dez dias após o parto (1 e 10), não apresentaram nenhuma sintomatologia clínica sugestiva de neosporose durante as sete semanas de lactação.

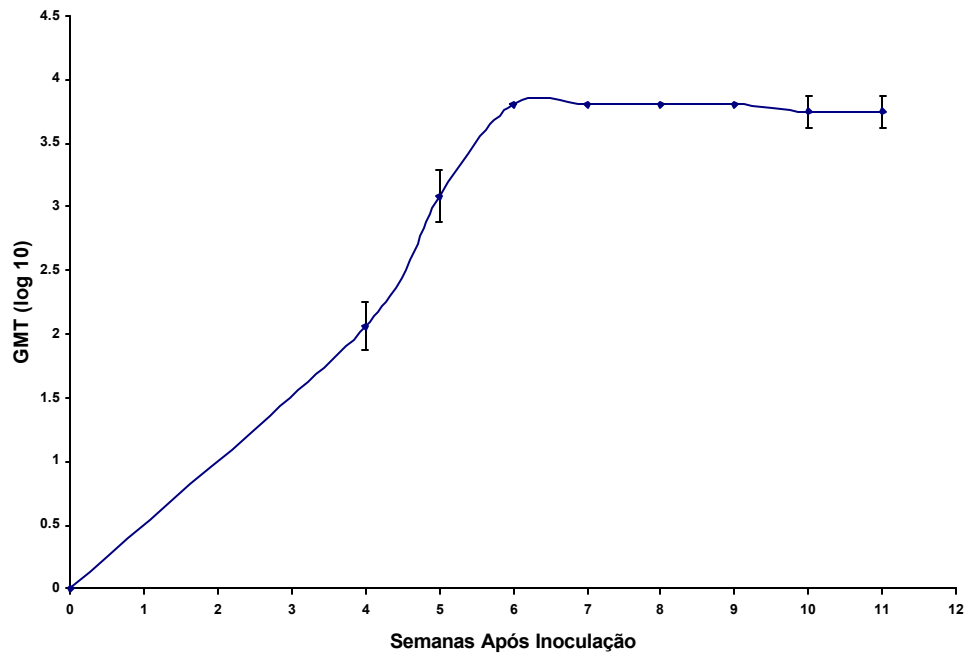


Figura 3. Cinética de anticorpos (IgG) de ovelhas inoculadas com *N. caninum*.

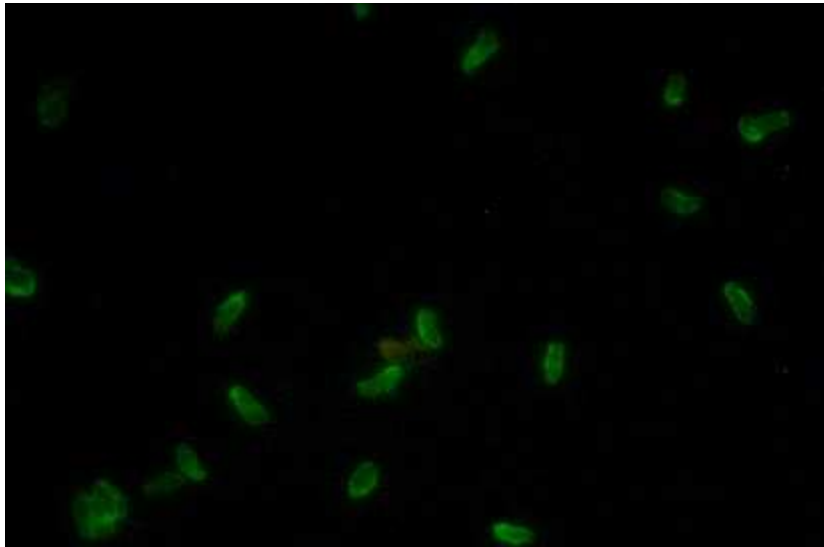


Figura 4 Reação de imunofluorescência indireta para *N. caninum*.



Figura 5. Animais nascidos de ovelhas inoculadas com 90 dias de gestação **A** Natimorto. **B**. Cordeiro nascido débil

Os animais controle negativo não apresentaram patologias relacionadas à gestação e as crias nasceram clinicamente normais. Todos os dados anteriores são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados da inoculação com *N caninum*

Ovelha	Tempo de gestação	Nascimento após inoculação	Reabsorção	Natimorto	Nascido vivo	Lesões microscópicas
1	10 DAP					Não
10	10 DAP					NS
6	AM	ANG				
7	AM	180 dias			Sim	Sim
8	AM	171 dias			Sim	NS
5	15 DG	134 dias			Sim	Sim
2	30DG		Sim			
9	30 DG		Sim			
4	90 DG	59 dias		Sim		Sim
11	90 DG	57 dias			Sim	Sim

5.7. Histopatologia

No cordeiro F1, filho de mãe inoculada 10 dias após o parto, bem como no controle negativo (F3), não foram observadas alterações histopatológicas em quaisquer das amostras dos diferentes tecidos que foram coletados. Igualmente, nas ovelhas adultas necropsiadas (4,5,6,11) não se constatarem lesões macro e microscópicas nos diversos órgãos analisados.

No natimorto e no cordeiro F11 (Figuras 5A e B), nascidos de ovelhas inoculadas com 90 dias de gestação, constatou-se no cérebro uma encefalite multifocal não supurativa, a qual era caracterizada pela presença de focos de necrose central, ocasionalmente com calcificação distrófica, rodeada por células inflamatórias do tipo mononuclear (Figuras 6A e B). Estes focos de necrose eram de tamanho variado e se localizavam preferencialmente na substância cinzenta, estando geralmente próximos ao terceiro e quarto ventrículos e aos ventrículos laterais, raramente localizavam-se no limite entre a substância branca e substância cinzenta. Também era evidente a formação de manguitos perivasculares, os quais eram constituídos por células inflamatórias do tipo mononuclear (Figura 6C). Também foram observados microglioses focais localizadas, preferencialmente, no neurópilo (Figura 6D), bem como vasculite e proliferação de pericitos, hiperemia, hemorragia (Figura 7A). No cordeiro F11 também se observou vacuolização e presença de cisto tecidual sem infiltrado inflamatório (Figuras 7B e C). Não foram verificadas lesões histológicas na medula e nem no cerebelo. No coração foi observado miocardite

focal não supurativa e focos de calcificação distrófica (Figura 8A), além de intensa hiperemia e escassos focos degenerativos-necróticos. No caso do músculo esquelético e do diafragma observou-se necrose de Zenker em algumas fibras musculares as quais mostravam-se refringentes, intensamente acidófilas e com perda das estriações. Igualmente nas amostras de músculo esquelético, língua e diafragma constatou-se miosite focal não supurativa (Figura 8B), às vezes sendo observado no infiltrado inflamatório a presença de alguns mastócitos.

O fígado exibiu hepatite multifocal e hepatite portal não supurativas, as quais se caracterizavam por numerosos focos predominantemente de células mononucleares dispersos pelo parênquima e nas tríades portais, sendo que no animal F4 observou-se hemorragia severa (Figuras 8C e D) além de focos de necrose hepática e hiperemia. Neste animal também foram observados infiltrados inflamatórios do tipo mononuclear ao redor de fibras nervosas autônomas.

No cordeiro (F7), nascido de ovelha inoculada antes da monta, foi notado meningoencefalomielite não supurativa (Figuras 9A e B). As lesões observadas no cérebro eram semelhantes àqueles que foram verificadas no cordeiro natimorto, porém os focos de necrose eram escassos, enquanto que a gliose era mais frequentemente observada (Figura 9C). Na medula também se constataram focos de necrose e gliose na substância cinzenta (Figura 9D). Hepatite focal e hepatite portal não supurativa, de intensidade semelhante à que foi observada no natimorto também foram constatadas neste animal (Figura 10A). Entretanto, nas amostras de músculo esquelético, diafragma e língua os focos de miosite que foram observados eram maiores e mais numerosos (Figuras 10B e C). Já a miocardite focal foi semelhante à que foi observada no natimorto (Figura 10D). À semelhança do que foi observado no natimorto também não se constataram lesões no cerebelo.

No cordeiro (F5), nascido de mãe inoculada com 15 dias de gestação, verificou-se meningoencefalomielite não supurativa. Embora as lesões fossem semelhantes às que se observaram no animal F7, neste animal elas eram mais severas, principalmente na medula onde as áreas de necrose eram maiores (Figuras 11A e B). No cérebro deste cordeiro se constatou a presença de cisto tecidual (Figura 11C). Os focos de miosite não supurativa eram severos (Figura 12A). Endocardite, epicardite e focos de miocardite linfocíticas também foram observados (Figuras 12B e C). Constatou-se também que o infiltrado mononuclear localizava-se ao redor das fibras de Purkinje. No fígado, além da hepatite focal e da hepatite portal não supurativas havia também hemorragia (Figura 12D).

Formas císticas teciduais observadas com coloração de hematoxilina e eosina (Figuras 7C e 11C) e positivamente marcadas pelo método de PAP foram observadas no cérebro dos cordeiros F11 e F5 (Figura 13A). sendo que por este mesmo método também se verificaram antígenos do parasita nas placentas das ovelhas 4, 5 e 11 (Figura 13B).

Placentite, caracterizada por focos de necrose e calcificação distrófica

foi observada nas placentas das ovelhas 4, 5, 7, 8 e 11 (Figuras 14A e B).

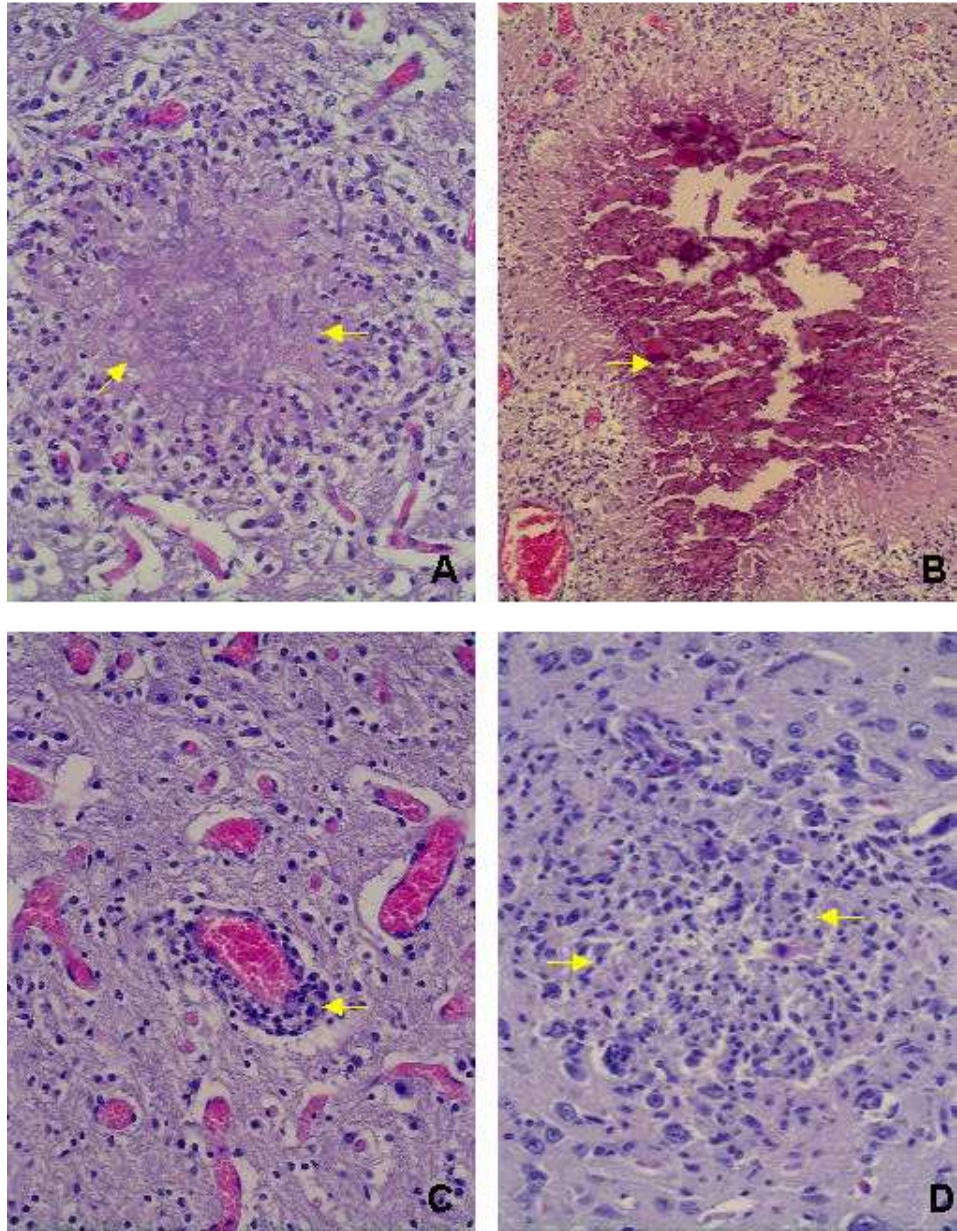


Figura 6. Lesões observadas no cérebro de cordeiros nascidos de ovelhas inoculadas com 90 dias de gestação. **A** Encefalite não supurativa com focos de necrose central (setas), HE, 400X. **B**. Calcificação distrófica (seta), HE, 200X. **C**. Manguito perivascular (seta), HE, 400X. **D**. Gliose (setas), HE, 400X.

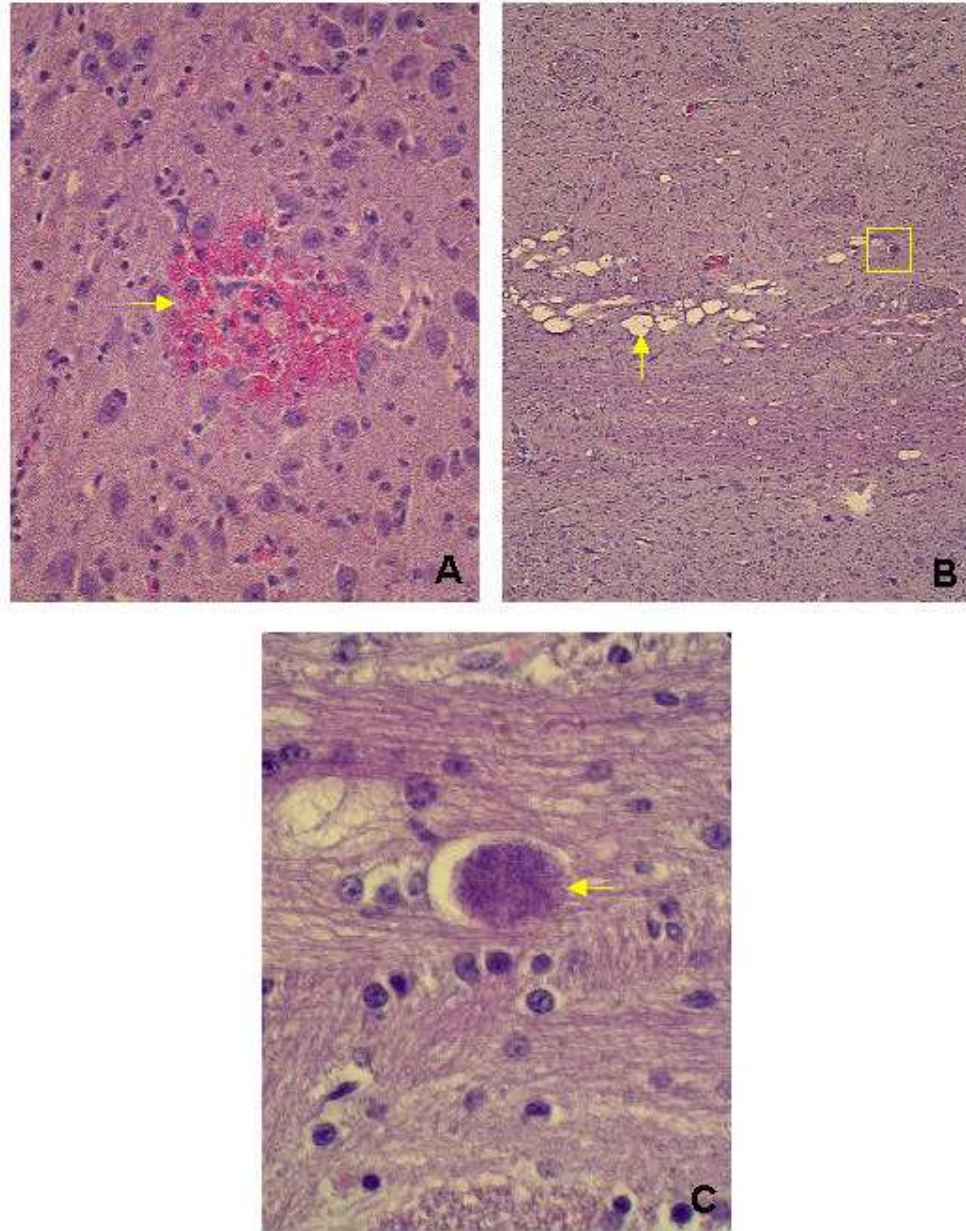


Figura 7. Lesões observadas no SNC de cordeiros nascidos de ovelhas inoculadas com 90 dias de gestação. **A.** Hemorragia (seta), HE, 400X. **B.** Vacuolização (seta) e presença de cisto tecidual (quadrado) no cérebro, HE, 100X. **C.** Detalhe do cisto tecidual (seta), HE, 1000X.

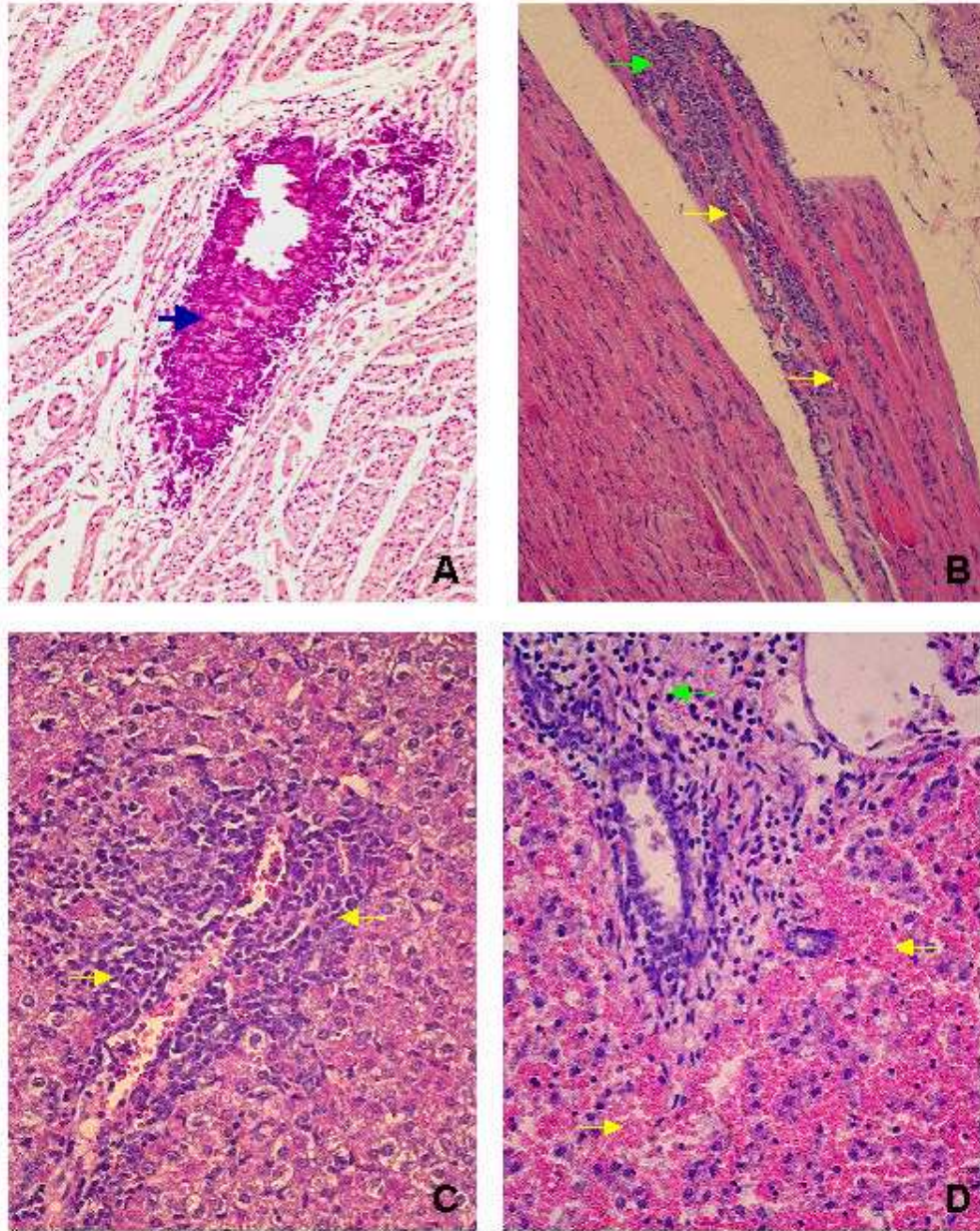


Figura 8. Lesões observadas em diferentes tecidos de cordeiros nascidos de ovelhas inoculadas após 90 dias de gestação. **A.** Foco de calcificação distrófica no músculo cardíaco (seta), HE, 400X. **B.** Miosite focal não supurativa (seta verde) e focos de necrose de Zenker (setas amarelas) no diafragma, HE, 200X. **C.** Hepatite perivascular não supurativa no animal F11 (setas), HE, 400X. **D.** Hepatite portal (seta verde) acompanhada de severa hemorragia no parênquima hepático (setas amarelas) no animal F4, HE, 400X.

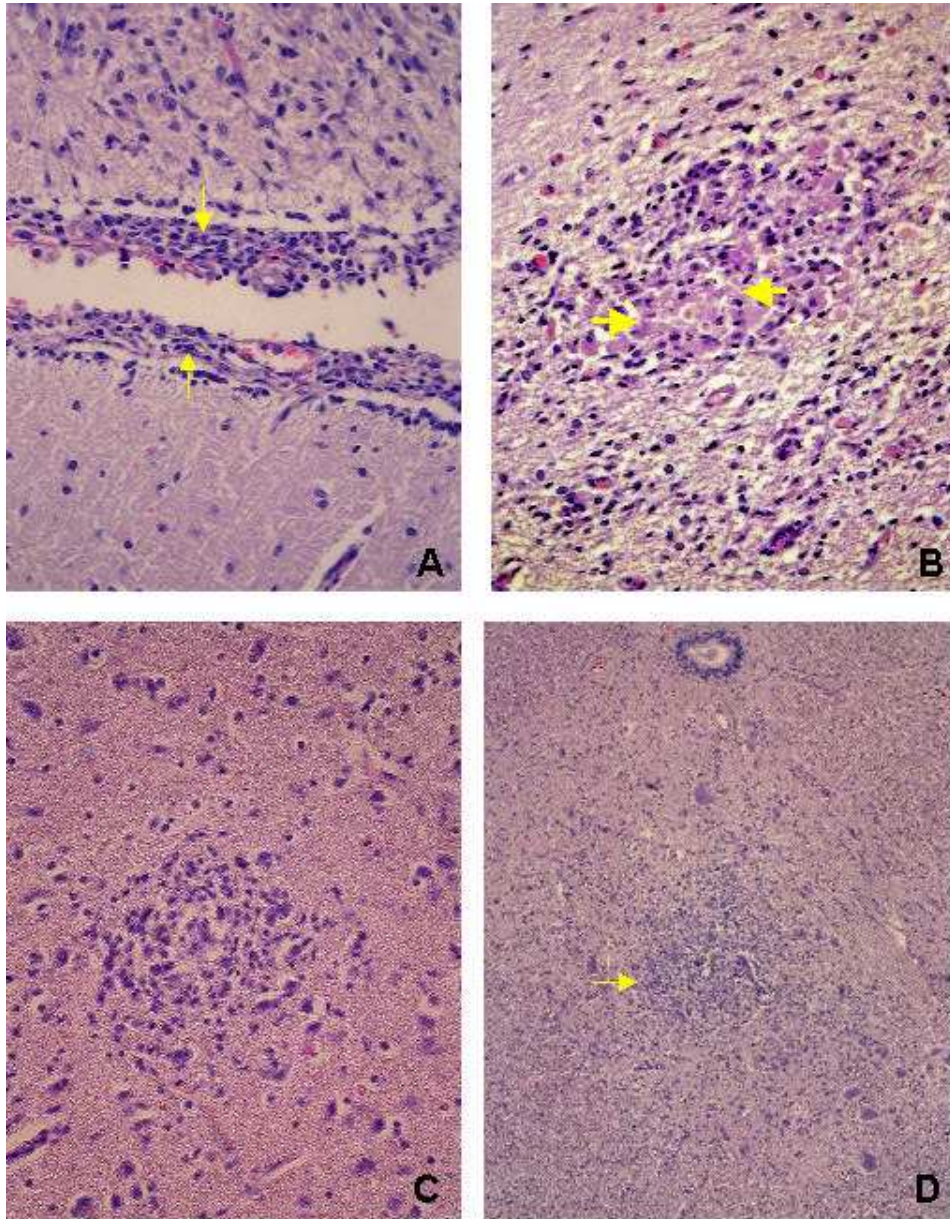


Figura 9. Lesões em SNC de cordeiro nascido de ovelha inoculada antes da monta. **A.** Meningite não supurativa (setas), HE, 400X. **B.** Pequeno foco de necrose (seta) rodeado de infiltrado mononuclear, HE, 400X. **C.** Foco de gliose, HE, 400X. **D.** Foco de gliose e infiltrado inflamatório na medula (seta), HE, 200X.

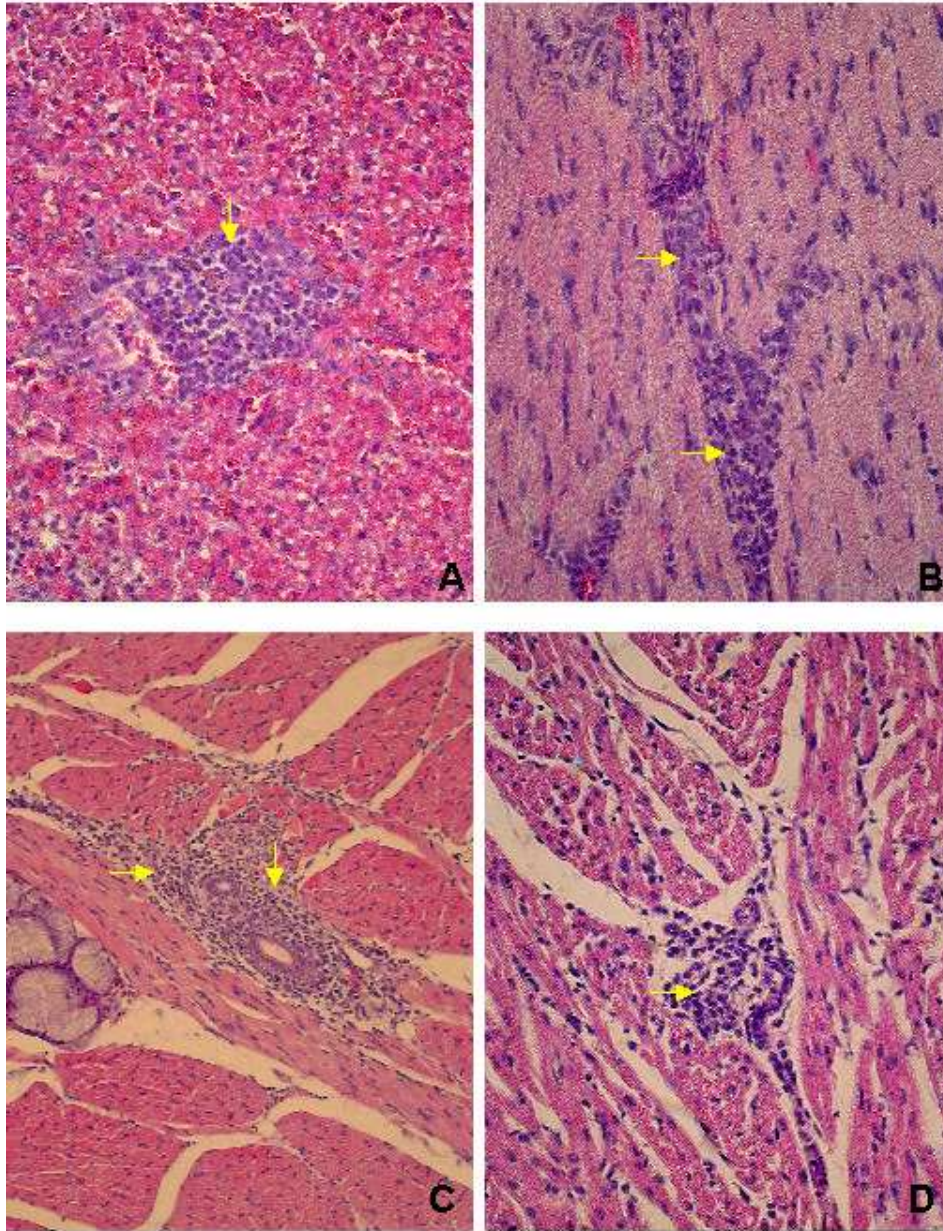


Figura 10. Lesões observadas em diferentes tecidos de cordeiro nascido de ovelha inoculada antes da monta. **A** Hepatite focal não supurativa (seta), HE, 400X. **B**. Miosite não supurativa no diafragma (setas), HE, 400X. **C**. Foco de infiltrado inflamatório na língua (setas), HE, 200X. **D**. Miocardite focal não supurativa (seta), HE, 400X.

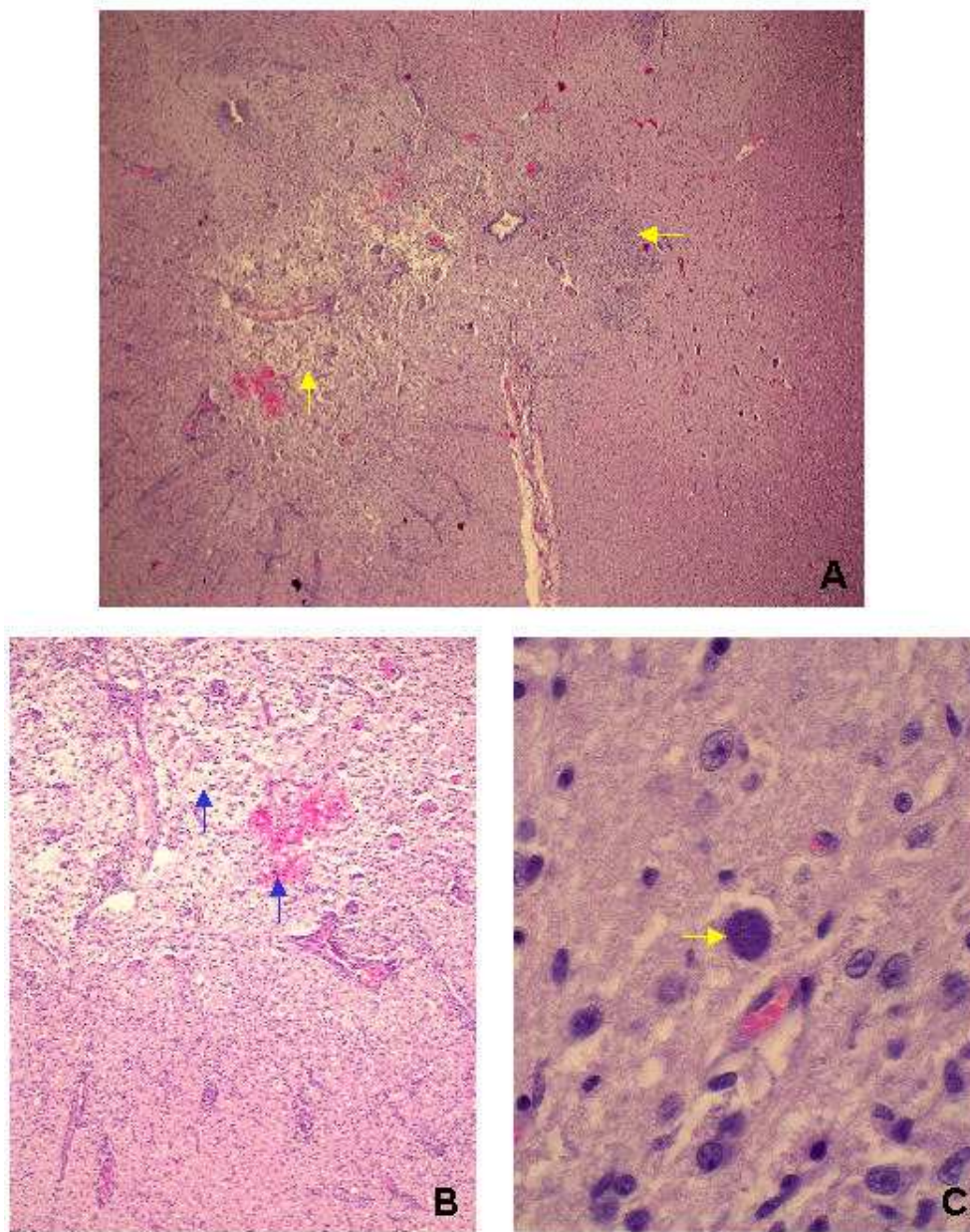


Figura 11. Lesões do SNC observadas em cordeiro nascido de ovelha inoculada com 15 dias de gestação. **A.** Mielite com áreas de necrose (setas), HE, 40X. **B.** Detalhe de mielite apresentando hemorragia e áreas de necrose (setas), HE, 100X. **C.** Cisto tecidual observado no cérebro (seta), HE, 1000X.

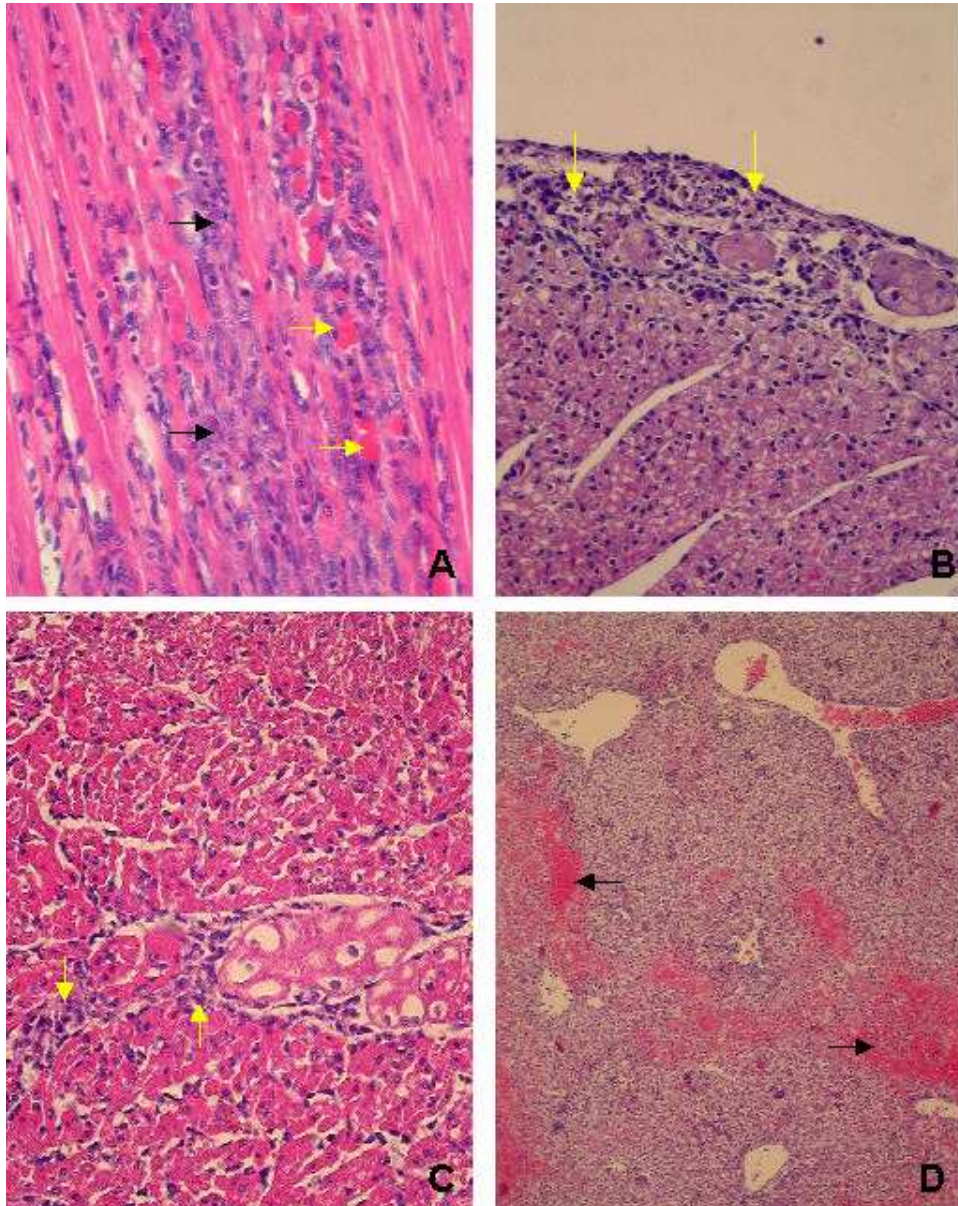


Figura 12. Lesões encontradas em diversos tecidos de cordeiro nascido de ovelha inoculada com 15 dias de gestação. **A.** Miosite não supurativa (setas pretas) com fibras apresentando necrose de Zenker (setas amarelas), HE, 400X. **B.** Endocardite focal não supurativa (setas), HE, 400X. **C.** Miocardite focal não supurativa (setas), HE, 400X. **D.** Focos hemorrágicos no fígado (setas), HE, 100X.

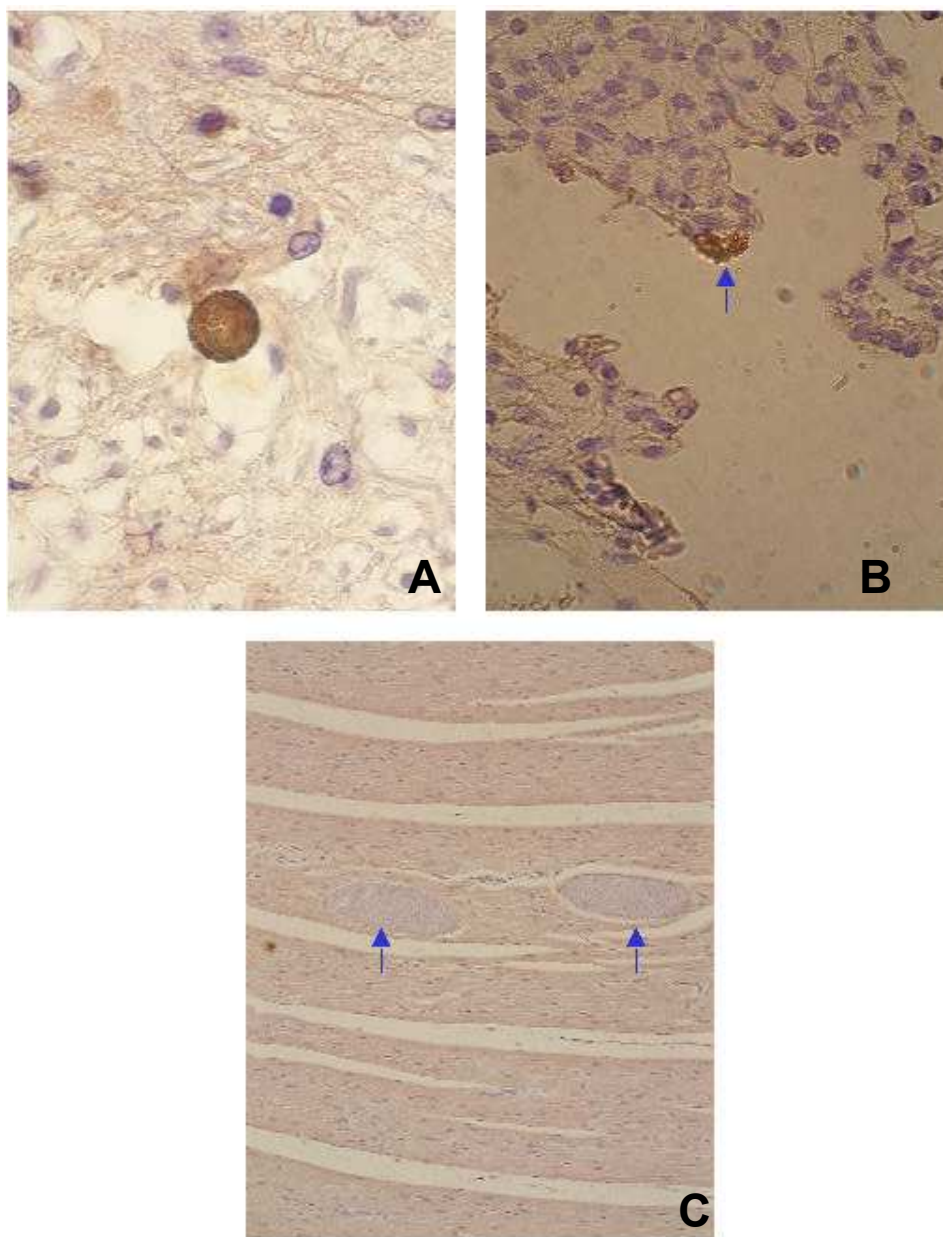


Figura 13. **A.** Forma cística tecidual no cérebro de cordeiro nascido de ovelha inoculada com 90 dias de gestação. PAP, 1000X. **B.** Antígenos de *N. caninum* (seta) em placenta de ovelha inoculada com 15 dias de gestação. PAP, 1000X. **C.** Forma cística tecidual de *Sarcocystes* sp. PAP, 200

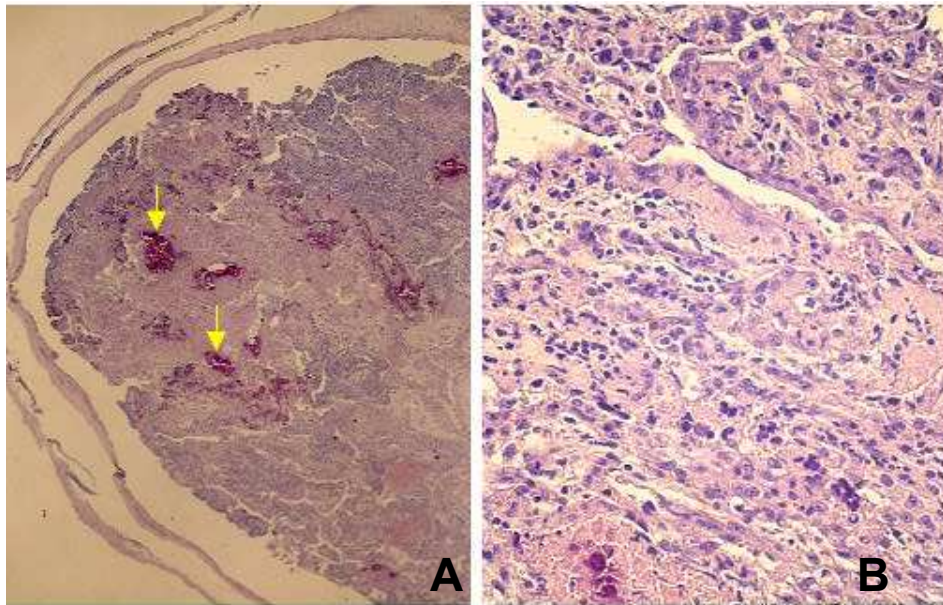


Figura 14. **A.** Focos de necrose com calcificação distrófica na placenta de ovelha inoculada com 90 dias de gestação (setas), HE, 40X. **B.** Placentite não supurativa, HE, 400X.

6. DISCUSSÃO

A inoculação de ovelhas gestantes com *N. caninum* produziu um quadro clínico febril semelhante ao que outros pesquisadores já têm relatado, no qual se encontraram temperaturas de até 43°C (BUXTON *et al.*, 1997a; BUXTON *et al.*, 1998 e BUXTON *et al.*, 2001, INNES *et al.*, 2001).

A resposta antigênica mensurada pela produção de IgG demonstra que a inoculação do parasita foi capaz de produzir anticorpos anti-Neospora, o que indica infecção nos animais e estímulo do sistema imune. A cinética da IgG seguiu um padrão similar ao observado em qualquer infecção, com um início de resposta as quatro semanas, um platô e posterior declínio da mesma.

O fato dos cordeiros terem apresentado anticorpos indica que houve uma infecção transplacentária, com o conseqüente estímulo do sistema monocítico fagocitário, o que já foi descrito por outros pesquisadores (VENTURINI *et al.* 1999).

O aborto é considerado como um sinal clínico freqüente em ovelhas inoculadas, mas não foi observado na presente pesquisa, diferentemente do que tem sido reportado por McALLISTER *et al.* (1996); BUXTON *et al.* (1997a); BUXTON *et al.* (1998); JOLLEY *et al.* (1999) e BUXTON *et al.* (2001). Entretanto, como o número de animais utilizado no presente estudo foi menor que o usado por esses autores, não pode ser descartada a possibilidade de que o aborto viesse a ocorrer na raça de ovelhas usadas neste experimento.

Pesquisadores como McALLISTER *et al.* (1996) e BUXTON *et al.* (1998) reportaram que a reabsorção fetal pode ocorrer quando as ovelhas são inoculadas com 45 e 65 dias de gestação. Entretanto, no presente estudo constatou-se por exame de ultra-sonografia que a reabsorção

embrionária também pode ocorrer quando os animais são inoculados com 30 dias de gestação, fato observado em duas ovelhas. Estes mesmos autores ainda relataram que há ocorrência de natimortos quando as mães são inoculadas com 90 dias de gestação, concordando com o que foi observado em uma ovelha inoculada com este mesmo tempo de gestação.

A literatura relata que infecções congênitas em fetos de ovelhas cronicamente infectadas, cuja infecção foi adquirida antes da gestação, resulta em aborto, semelhante ao que tem sido observado em bovinos (JOLLEY *et al.*, 1999). No entanto, na presente pesquisa observou-se que duas ovelhas inoculadas antes da gestação pariram cordeiros aparentemente normais, mas histologicamente constataram-se lesões em diversos tecidos. Estas lesões eram características da infecção por *N. caninum*. Então, estes achados sugerem que ovelhas inoculadas experimentalmente, 30 dias antes de ficarem gestantes, também podem ter crias congenitamente infectadas a semelhança do que foi reportado em ovelhas por BUXTON *et al.* (2001) e por ANDERSON *et al.* (2000) em bovinos. INNES *et al.* (2001) comentam que um padrão freqüentemente observado em ovelhas infectadas com o parasita é o alto nível de transmissão vertical, embora BUXTON *et al.* (2001) considerem que a transmissão vertical ocorre com baixa freqüência em ovelhas experimentalmente inoculadas antes da gestação. Por outro lado, deve-se considerar a susceptibilidade do tipo de ovelhas e a amostra do parasita que foram utilizados na presente pesquisa.

Neste estudo constatou-se que a ovelha inoculada antes de completar o primeiro mês de gestação pariu um cordeiro a termo, aparentemente normal, fato que até a presente data não foi descrito. Entretanto, como o cordeiro foi sacrificado seis horas após o nascimento e histologicamente se constataram lesões em diversos tecidos é possível que o mesmo viesse a desenvolver sinais clínicos da doença.

DAVISON *et al.* (2001) relataram que não há transmissão lactogênica em bezeros a partir de mães naturalmente infectadas ou mães que ingerem placenta de vacas naturalmente infectadas. A semelhança do relatado por estes autores, em nosso estudo também não foi observada transmissão lactogênica, já que o cordeiro F1 nascido de ovelha inoculada 10 dias após o parto não apresentou nenhum sinal clínico nem lesões compatíveis com neosporose após sete semanas de lactação.

McALLISTER *et al.* (1996) e BUXTON *et al.* (1997a) afirmam que a neosporose induzida experimentalmente em ovinos de lã e em bovinos apresenta semelhanças clínicas e histopatológicas. Pelos resultados clínicos observados e as alterações histopatológicas que foram constatadas em diversos tecidos dos cordeiros necropsiados, pode-se inferir que ovelhas deslanadas também são susceptíveis à infecção experimental com *N. caninum* e que a infecção intra-uterina dos fetos resulta no nascimento de cordeiros clinicamente normais, cordeiros mortos e reabsorções embrionárias. Isto também pode significar que o nascimento de fêmeas clinicamente normais, porém infectadas com as formas císticas teciduais, poderia manter a infecção para futuras gerações sem que tenha havido exposição ambiental ao parasita durante a gestação, concordando com as afirmativas de McALLISTER *et al.* (1996) e BUXTON *et al.* (1997a).

A semelhança das alterações histológicas que foram reportadas em bovinos (DUBEY e LINDSAY, 1996), as lesões necrótico-degenerativas e inflamatórias observadas nos cordeiros necropsiados localizavam-se, preferencialmente, no SNC, coração, músculo esquelético e fígado. Ainda concordando com estes autores, as alterações macroscópicas nestes órgãos foram raramente observadas.

As lesões freqüentemente constatadas no cérebro eram focos de necrose central, rodeada por células do tipo mononuclear, o que segundo DUBEY e LINDSAY (1996) é considerada a lesão mais característica de neosporose, tendo sido descrita em varias espécies animais, natural ou experimentalmente infectadas (DUBEY, *et al.*, 1988a; DUBEY e LINDSAY, 1990). Ainda observou-se que, ocasionalmente, havia calcificação distrófica em alguns focos de necrose, concordando com as observações de BOULTON *et al.* (1995); DUBEY e LINDSAY (1996) e McALLISTER *et al.* (1996).

Autores como DUBEY e LINDSAY (1996) afirmam que em ovelhas é mais freqüente achar lesões na medula espinhal, consistindo de redução unilateral da substância cinzenta do corno ventral com cavitação focal. Diferentemente do relatado por estes autores, na presente pesquisa se observaram lesões em todos os tecidos coletados dos animais necropsiados, sendo que somente em dois deles observaram-se lesões na medula, caracterizadas por focos de necrose e gliose. Em dois animais constatou-se presença de cisto tecidual, ao redor dos quais não havia reação inflamatória. Este último achado está de acordo com o descrito por DUBEY e LINDSAY (1996). Ainda segundo DUBEY (1999), o cérebro fetal é o tecido mais afetado, apesar da infecção por *N. caninum* causar lesões em vários órgãos. Igualmente, neste estudo confirmou-se que as alterações inflamatórias eram mais freqüentes e severas no cérebro que nos outros órgãos.

As lesões que foram observadas no cordeiro nascido da ovelha inoculada antes de completar o primeiro mês de gestação (F5) eram mais severas que aquelas observadas no natimorto e naquele cordeiro nascido de mãe inoculada antes da gestação. Isto pode ser justificado, já que segundo BUXTON *et al.* (1998) o tempo de gestação e a maturidade do feto influenciam as conseqüências da infecção por *N. caninum*, parecendo que a patogenicidade para os fetos é maior quando a inoculação

é realizada antes de 120 dias de gestação. Os referidos autores observaram que aos 45 dias de gestação os efeitos da infecção eram mais severos. Por outro lado, ANDERSON *et al.* (2000) consideram que quando um feto adquire a infecção antes de ter um sistema imunológico bem desenvolvido, geralmente a infecção é generalizada, com lesões inflamatórias disseminadas no cérebro, pulmão, coração, fígado, músculos, placenta e outros órgãos. Baseado nestas observações pode-se inferir que nesse cordeiro (F5) a patogenicidade do *N. caninum* foi maior como consequência da imaturidade do seu sistema imunológico, o que fica refletido pela disseminação e severidade das lesões que foram constatadas em todos os tecidos analisados.

Todavia, nesse animal se observaram na medula lesões necróticas severas, não sendo visualizadas formas livres de *N. caninum*, porém no cérebro se constatou forma cística do parasita. Este achado contraria a afirmativa de BARR *et al.* (1991), a respeito que, em feto bovino, a predominância de formas não císticas de *N. caninum* associadas com extensa necrose tecidual é o resultado de respostas inflamatórias muito acentuadas contra os parasitas, enquanto a formação de cistos e pouca inflamação refletem uma resposta imune imatura.

Também se verificou no cordeiro nascido da ovelha inoculada antes da gestação que embora as lesões no cérebro fossem semelhantes às observadas nos outros animais, nele predominavam os focos de gliose. DUBEY e LINDSAY (1996) afirmam que a gliose é mais freqüente em fetos bovinos abortados no terceiro trimestre. Fazendo um paralelismo com as observações destes autores, ovelhas infectadas antes da gestação poderiam desenvolver uma resposta imune eficiente contra o parasita e a imunodepressão normalmente observada durante a gestação não seria tão intensa a ponto de permitir a infecção precoce do feto. Assim, segundo aqueles autores, o estágio da gestação, e não a dose, é o que determina as consequências da inoculação, embora as ovelhas sejam altamente suscetíveis a *N. caninum*.

Os achados histopatológicos deste experimento estão de acordo com o que tem sido relatado em várias espécies animais, natural ou experimentalmente infectadas. As lesões no sistema nervoso consistem de meningoencefalomielite não supurativa, caracterizada por infiltração linfocitária multifocal, com ou sem necrose multifocal, gliose, manguito perivascular linfocitário e infiltração linfocitária nas meninges, multifocal ou difusa (CUMMINGS *et al.*, 1988; BJERKAS e DUBEY, 1991; MAYHEW *et al.*, 1991; JACOBSON e JARDINE, 1993; FLAGSTAD *et al.*, 1995; DUBEY *et al.*, 1988a; DUBEY e LINDSAY, 1996; McALLISTER *et al.*, 1996; VENTURINI *et al.*, 1999; ANDERSON *et al.*, 2000; BUXTON *et al.*, 2001; PETERS *et al.*, 2001).

A localização das lesões foi no córtex cerebral, concordando com as observações de McALLISTER *et al.* (1996). Entretanto, na maioria das vezes, estas lesões se localizavam próximas aos ventrículos e raramente se observaram no limite entre a substância branca e a cinzenta. Esta localização preferencial das lesões, em ovelhas experimentalmente inoculadas com *N. caninum* não tem sido descrita até o momento, o que pode sugerir que, além da via hematógena, a infecção no SNC também pode se dar através do líquido cefaloraquídeo, principalmente quando lesões prévias acontecem na medula.

Nos trabalhos de PETERS *et al.* (2001) se relata, no metencéfalo de um bezerro de dois dias de idade naturalmente infectado, umas poucas glioses próximas ao quarto ventrículo. Igualmente, DUBEY e LINDSAY (1996) reportaram

ventriculite em cabras. Estes achados ajudariam a dar suporte às vias de infecção do SNC, em ovelhas experimentalmente inoculadas.

Em nenhum dos cordeiros necropsiados se observaram lesões no cerebelo, na literatura consultada somente McALLISTER *et al.* (1996) reportaram que lesões moderadas foram observadas em 6% dos cerebelos dos fetos examinados, o que indica que elas não são freqüentemente observadas.

Em experimentos nos quais se inocularam ovelhas gestantes, observou-se que lesões extraneurais eram mais freqüentes nos fetos abortados e pouco freqüentes nos cordeiros nascidos vivos (McALLISTER *et al.*, 1996). Diferente do que foi relatado por estes autores, na presente pesquisa se constatou lesão no coração, músculo esquelético, língua, diafragma, fígado e pulmão, não só dos cordeiros nascidos vivos como também do natimorto, com características e distribuição semelhantes, embora com severidade diferente.

Estas lesões consistiam em miosite multifocal não supurativa, epicardite e endocardite não supurativa, hepatite portal ou hepatite perivascular não supurativa e pneumonia intersticial focal não supurativa, as quais são semelhantes às que foram citadas por vários autores em diversas espécies animais, natural ou experimentalmente infectados (CUMMINGS *et al.*, 1988; DUBEY *et al.*, 1988a; BARR *et al.*, 1991; CUDDON *et al.*, 1992; ODIN e DUBEY., 1993; DUBEY e LINDSAY, 1996; McALLISTER *et al.*, 1996; PETERS *et al.*, 2001). Além disto, em vários órgãos observou-se infiltrado inflamatório do tipo mononuclear ao redor de fibras nervosas, a semelhança do que foi relatado em cães (CUMMINGS *et al.*, 1988; CUDDON *et al.*, 1992).

As lesões da placenta que foram observadas no presente estudo se parecem com aquelas induzidas experimentalmente em ovelhas por outros autores (DUBEY e LINDSAY, 1996; McALLISTER *et al.*, 1996; BUXTON *et al.*, 1997; BUXTON *et al.* 1998; BUXTON *et al.*, 2001).

A neosporose ovina experimentalmente induzida apresenta semelhanças com a toxoplasmose, ambas produzindo lesões similares no cérebro, placenta e músculo estriado. Entretanto, na toxoplasmose o fígado mostra granulomas multifocais, o que não tem sido observado na neosporose. Outra diferença que deve ser considerada é com respeito à formação de cistos teciduais, já que na toxoplasmose eles podem ocorrer no miocárdio e outros tecidos extraneurais, enquanto os cistos teciduais de *N. caninum* em ruminantes até agora não têm sido encontrados fora do SNC (McALLISTER *et al.*, 1996; PETERS *et al.*, 2001).

No presente estudo, as lesões hepáticas observadas não se caracterizavam pela formação de granulomas e tampouco foram observadas formas císticas do parasita em outros tecidos que não o SNC. Assim, pode-se inferir que os sinais clínicos e as lesões observadas nos diversos tecidos examinados, característicos da infecção por *N. caninum*, foram produzidos pela inoculação experimental com este agente infeccioso, mostrando a utilidade de ovelhas deslanadas como modelo experimental da doença.

Somente no cérebro de dois cordeiros se observaram formas císticas de *N. caninum*, os quais são ocasionalmente encontrados e difíceis de serem observados com hematoxilina e eosina (DUBEY e LINDSAY, 1996; McALLISTER *et al.*, 1996). Estes cistos foram morfológicamente diferentes dos cistos de *T. gondii* e *Sarcocystes sp.* (Figuras 15A, B, C). Este achado está de acordo com os resultados de PETERS *et al.* (2001), quando afirmam que os cistos teciduais ocorrem no sistema nervoso dos hospedeiros intermediários, apresentando formas arredondadas ou ovais, com um diâmetro de até 107µm e, geralmente, possuem parede mais grossa e irregular que os cistos de *T. gondii* (SPEER *et al.*, 1999).

Ainda concordando com DUBEY e LINDSAY (1996) e McALLISTER *et al.* (1996), os cistos teciduais imaturos encontrados no sistema nervoso central de fetos podem não desenvolver a parede espessa característica de *N. caninum*, o que também foi constatado em algumas das formas císticas que foram observadas nesta pesquisa.

Alguns pesquisadores como McALLISTER *et al.* (1996) recomendam o uso de métodos imunohistoquímicos em tecidos lesados, utilizando anticorpos espécie-específicos, o que permite descartar a infecção com *T. gondii*. Por outro lado, ANDERSON *et al.* (2000) consideram que a imunohistoquímica, usando anticorpos específicos contra Neospora, é um método eficaz para identificar as formas biológicas do parasita quando presentes nos tecidos.

Neste estudo foi utilizado um anticorpo policlonal monoespecífico (IgG) contra *N. caninum* e pode-se inferir que os cistos PAP positivos que foram observados no tecido nervoso de alguns cordeiros são deste agente infeccioso. Este achado é reforçado pelos resultados de BUXTON *et al.* (1997a) que também encontraram agregados de taquizoítos no cérebro de um feto cuja ovelha foi inoculada com 90 dias de gestação, quando usaram um anti-soro policlonal contra a amostra “NC-1”.

Da mesma forma, PETERS *et al.* (2001) afirmam que, embora haja evidências histológicas de que os cistos formados são de *N. caninum*, a confirmação somente é obtida quando os mesmos são marcados com anti-soros específicos contra o parasita. Todavia, acrescentam que resultados negativos, tanto sorológica quanto por imunohistoquímica permitem excluir co-infecções com outros parasitas apicomplexos.

A especificidade do anti-soro foi comprovada quando formas císticas teciduais de *N. caninum*, foram marcadas positivamente pelo método de PAP. Igualmente, o achado de formas císticas, marcadas positivamente com imunoperoxidase, no cérebro de cordeiros que nascem aparentemente normais está de acordo com as observações de JOLLEY *et al.* (1999).

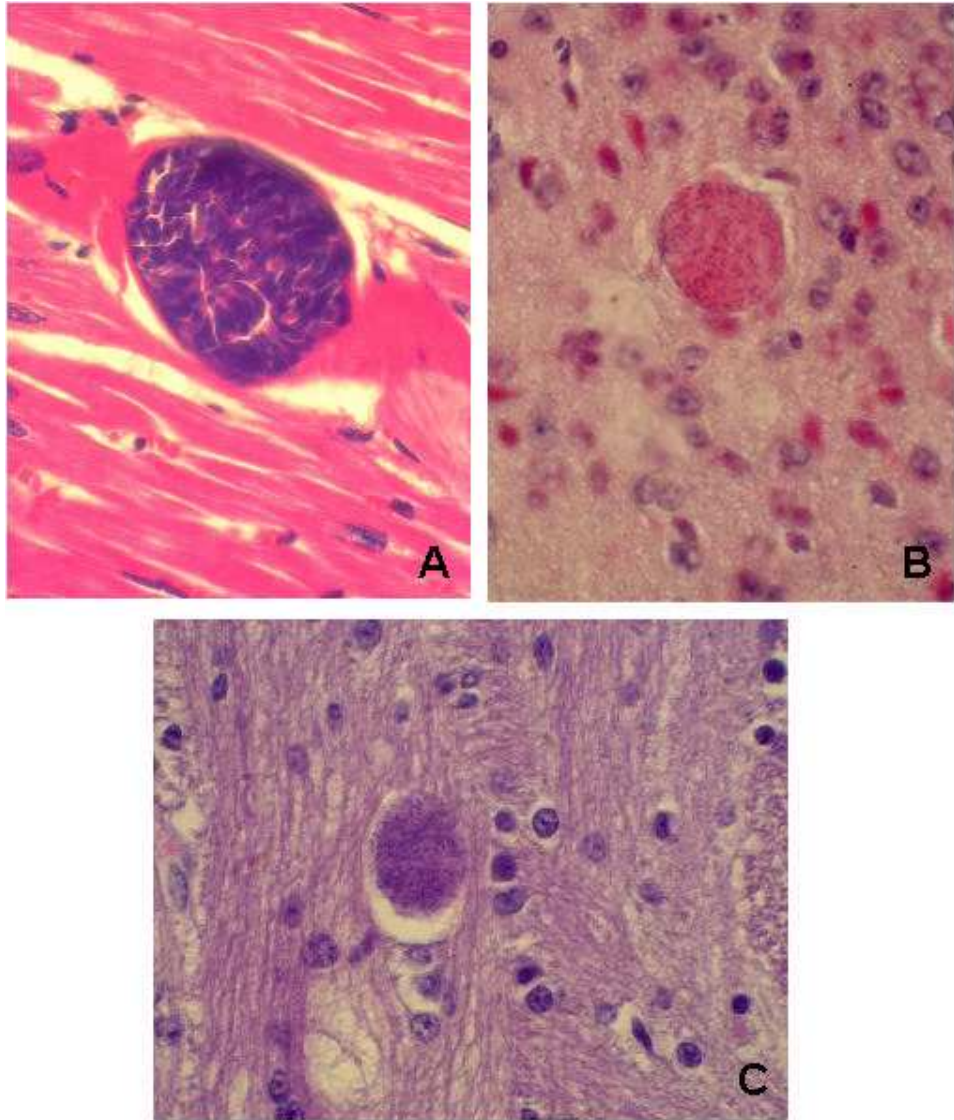


Figura 15. **A.** Cisto tecidual de *Sarcocystis* sp. HE, 1000X. **B.** Cisto tecidual de *Toxoplasma gondii*. HE, 1000X. **C.** Cisto tecidual de *Neospora caninum*. HE, 1000X.

7. CONCLUSOES

Nas condições em que foi feito este experimento pode-se concluir que:

- Infecção experimental com *N. caninum* de ovelhas deslanadas durante e antes da gestação produz alterações histopatológicas no feto, principalmente no sistema nervoso central, além de reabsorções embrionárias, nascimento de cordeiros mortos e nascimento de cordeiros aparentemente normais, embora congenitamente infectados.

- As principais lesões produzidas pelo parasita são processos inflamatórios não supurativos no cérebro, medula, fígado, músculo esquelético e músculo cardíaco.

- As formas císticas teciduais do parasita somente foram encontradas no sistema nervoso central.

- Ovelhas inoculadas após o parto não transmitiram a infecção para crias lactentes.

- As ovelhas de origem africana e seus cruzamentos podem ser usados como modelo experimental para estudos de neosporose bovina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, M.L., ANDRIANARIVO, A.G., CONRAD, P.A. Neosporosis in Cattle. **Animal Reproduction Science**, v.60, 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 as a major cause of abortion in California dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.198, p.241 – 244, 1991.
- 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. **Journal of Parasitology**, v.86, p.1056 – 1058, 1997.
- BARBER, J.S., TREES, A.J. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dog. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.57 – 64, 1998.
- BARR, B.C., ANDERSON, M.L., BLANCHARD, P.C., DAFT, B.M., KINDE, H, CONRAD, P.A. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. **Veterinary Pathology**, v.27, p.354 – 361, 1990.
- BARR, B.C., ANDERSON, M.L., DUBEY, J.P., CONRAD, P.A. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. **Veterinary Pathology**, v.28, p.110-116, 1991.
- BARR, B.C., ANDERSON, M.L., WOODS L.W., DUBEY, J.P., CONRAD, P.A. *Neospora* – like protozoal infections associated with abortion in goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.4, p.336 – 367, 1992.
- BARR, B.C., CONRAD, P.A., BREITMEYER, R., SVERLOW, K., ANDERSON, M.L., REYNOLDS, J., CHAUVET, A.E., DEBEY, J.P., AND ARDANS, A.A. Congenital *Neospora* infections in calves born from cows that had previously aborted *Neospora* – infected fetuses: four cases (1990 – 1992). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.202, p.113 –117, 1993.
- BARR, B.C., CONRAD, P.A., SVERLOW, K.W., TARANTAL, A.F., HENDRICKX, A.G. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. **Laboratory Investigation**, v. 71, p.236 – 242, 1994a.
- 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. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p.207 – 215, 1994b.
- BASZLER, T.V., GAY, L.J., LONG, M.T., MATHISON, B.A. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, ed.12, p.4059 – 4064, 1999.
- BJERKAS, I. AND DUBEY, J.P. Evidence that *Neospora caninum* is identical to the Toxoplasma-like parasite of Norwegian dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.32, p.407-410, 1991.

- BJERKAS, I. AND PRESTHUS, J. Immunohistochemical and ultrastructural characteristics of a cyst – forming sporozoon associated with encephalomyelitis and myositis in dogs. **Acta Pathological Microbiological Immunol. Scand.** V.96, p.445–454, 1988.
- BJERKAS, I., MOHN, S.F., PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming Sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v.17, p.271-274, 1984.
- BJORKMAN, C., LUNDÉN, A., HOLMDAHL, J., BARBER, J., TREES, A.J., UGGLA, A. *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. **Parasite immunology**, v.16, p.643 – 648, 1994.
- BJORKMAN, C., UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1497 – 1507, 1999.
- BOULTON, J.G., GILL, P.A., COOK, R.W., FRASER, G.C., HARPER, P.A.W. AND DUBEY, J.P. Bovine *Neospora* abortion in north-eastern New South Wales. **Australian Veterinary Journal**, v.72, p.119 – 120, 1995.
- BRAUTIGAM, F.E., HIETALA, S.K., GLASS, R. Resultados de levantamento sorológico para a espécie *Neospora* em bovinos de corte e leite. In: Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias, 15, 1996, Campo Grande, MS. **Anais...** Campo Grande: Associação Panamericana de Ciências Veterinárias, 1996, p.284.
- BUXTON, D., CALDOW, G.L., MALEY, S.W., MARKS, J., INNES, E.A. Neosporosis and bovine abortion in Scotland. **The Veterinary Record**, v.141, p.649-651, 1997b.
- BUXTON, D., MALEY, S.W., THOMSON, K.M., TREES, A.J., INNES, E.A. Experimental infection of non-pregnant and pregnant sheep with *Neospora caninum*. **Journal of Comparative Pathology**, v.117, p.1 – 16, 1997a.
- BUXTON, D., MALEY, S.W., WRIGHT, S., THOMSON, K.M., RAE, A.G., INNES, E.A. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v. 118, p.267 – 279, 1998.
- BUXTON, D., WRIGHT, S., MALEY, S.W., RAE, A.G., LUNDÉN, A., INNES, E.A. Immunity experimental neosporosis in pregnant sheep. **Parasite Immunology**, v.23, p.85– 91, 2001.
- CAMPERO, C.M., ANDERSON, M.L., CONOSCIUTO, G., ODRIOZOLA, H., BRETSCHNEIDER, G., POSO, M.A. *Neospora caninum* – associated abortion in a dairy herd in Argentina. **The Veterinary Record**, v.143, p.228 – 229, 1998.
- COLE, R.A., LINDSAY, D.S., BLAGBURN, B.L., DUBEY, J.P. Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. **Journal of Parasitology**, v.81, p.730 – 732, 1995a.

- COLE, R.A., LINDSAY, D.S., BLAGBURN, B.L., SORJONEN, D.C., DUBEY, J.P. Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. **Journal of Parasitology**, v.81, p.208 – 211, 1995b.
- CUDDON, P. LIN, D.S. BOWMAN, D.D. LINDSAY, D.S., MILLER, T.K., DUNCAN, I.D., DeLAHUNTA, A., CUMMINGS, J., SUTER, M., COOPER, B., KING, J.M. AND DUBEY, J.P. Neospora caninum infection in English Springer Spaniel littermates: Diagnostic evaluation and organism isolation. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.6, p. 325-332, 1992.
- CUMMINGS, J.F., LAHUNTA, A., SUTER, M.M. AND JACOBSON, R.H., Canine protozoan polyradiculoneuritis, **Acta Neurophatological**, v.76, p.46-54, 1988.
- DAVISON H.C., GUY, C.S., McGARRY, J.W., GUY, F., WILLIAMS, D.J.L., KELLY, D.F., TREES, A.J. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. **Research in Veterinary Science**, v.70, p.163 – 168, 2001.
- DIJKSTRA, T.H., EYSKER, M., SHARES, G., CONRATHS, F.J., WOUDA, 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. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.747 – 752, 2001.
- DUBEY, J.P. AND LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.67, p1 – 59, 1996.
- DUBEY, J.P. Congenital Neosporosis in a calf. **Veterinary Record**, v.125, p.486, 1989.
- DUBEY, J.P., ABBITT, B., TOPPER, M.J., EDWARDS, J.F. Hydrocephalus associated with *Neospora caninum* infection in an aborted bovine fetus. **Journal of Comparative Pathology**, v.118, n.2, p.169 – 173, 1998c.
- DUBEY, J.P., ACLAND, H.M., HAMIR, A.N. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in a stillborn goat. **Journal of Parasitology**, v.78, p.532 – 534, 1992.
- DUBEY, J.P., CARPENTER J.L., SPEER, C.A., TOPPER M.J. AND UGGLA, A. New recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.192, p.1269 – 1285, 1988a.
- DUBEY, J.P., DOROUGH, K.R., JENKINS, M.C., LIDDELL, S., SPEER, C.A., KWOK, O.C.K., SHEN, S.K. Canine neosporosis: signs, diagnosis, treatment, and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. **International journal for Parasitology**, v.28, p.1293 – 1304, 1998b.
- DUBEY, J.P., HARTLEY, W.J., LINDSAY, D.S. AND TOPPER, M.J. Fatal congenital *Neospora caninum* infection in a lamb. **Journal of Parasitology**, v.76, p.127 – 130, 1990.

- DUBEY, J.P., HATTEL, A.L., LINDSAY, D.S. AND TOPPER, M.J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, p.1259 – 1263, 1988b.
- DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. High susceptibility of gerbils to oral infection with *Neospora caninum* oocyst. **Parasitology Research**, v.86, p.165 – 168, 2000.
- DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.2, p.230 – 233, 1990.
- DUBEY, J.P., METZGER, F.L.J., HATTEL, A.L., LINDSAY, D.S., FRITZ, D.L. Canine cutaneous neosporosis: clinical improvement with clindamycin. **Veterinary Dermatology**, v.6, p.37 – 43, 1995.
- DUBEY, J.P., MORALES, J.A., VILLALOBOS, P., LINDSAY, D.S., BLAGBURN, B.L., TOPPER, M.J. Neosporosis – associated abortion in dairy goat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.208, p.263 – 265, 1996a.
- DUBEY, J.P., PORTERFIELD, M.L. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in na Aborted equine fetus. **Journal of Parasitology**, v.76, p.732 – 734, 1990.
- DUBEY, J.P., Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.84, p.349 – 367, 1999.
- DUBEY, J.P., RIGOULET, J., LAGOURETTE, P., GEORGE, C., LONGEART, L., LE NET, J.L. Fatal Transplacental neosporosis in a deer (*Cervus eldi siamensis*) from a zoo. **Journal of Parasitology**, v.82, p.338 – 339, 1996b.
- DUBEY, J.P., ROMAND, S., HILALI, M., KWOK, O.C.H., THULLIEZ, P. Seroprevalence of Antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in Water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Egypt. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.527 – 529, 1998a.
- ELLIS, J.T. *Neospora caninum*: Prospects for diagnosis and control using molecular methods. In: SHIRLEY, M.W., TOMLEY, F.M., FREEMAN, B.M. (Eds.), Control of using molecular methods, in control of coccidiosis into the next millennium. Institute for Animals Health. Compton Newbury, Berks, UK. p.80,1997.
- FLAGSTAD, A., JENSEN, H.E. BJERKAS, I. AND RASMUSSEN, K. *Neospora caninum* infection in a litter of Labrador Retriever dogs in Denmark. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.36, p.387 – 391, 1995.
- FRITZ, D., GEORGE, C., DUBEY, J.P., TREES, A.J., BARBER, J.S., HOPFNER, C.L., MEHAUT, S., LE NET, J.L., AND LONGEART, L. *Neospora caninum* - associated nodular dermatitis in a middle – aged dog. **Canine Pract.**, v.22, p.21 – 24, 1997.

- 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**, v.101, p. 1 – 7, 2001.
- GONDIM, L.F.P., SARTOR I.F. Detecção de anticorpos contra *Neospora caninum* em vacas leiteiras em uma propriedade com histórico de aborto. In: X SEMINARIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 1997, Itapema, SC **Anais...Itapema: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, 1997, p.346.
- GONDIM, L.F.P., SARTOR I.F., HASEGAWA, M., YAMANE, I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.86, p.71 – 75, 1999a.
- GONDIM, L.F.P., SOUZA, R.M., GUMARÃES, J.E., ALMEIDA, M.A.O. Frequência de anticorpos contra *Neospora caninum* em búfalos criados no estado da Bahia. XI SEMINARIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA. 1999, Salvador, BA **Anais...Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, 1999b, p. 227.
- GRAY, M.L., HARMON, B.G., SALES, L. AND DUBEY, J.P. visceral neosporosis in a 10-year-old horse. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.8, p.130 – 133, 1996.
- HAMIR, A.N., TORNQUIST, S.J., GERROS, T.C., TOPPER, M.J., DUBEY, J.P. *Neospora caninum* - associated equine protozoal myeloencephalitis. **Veterinary Parasitology**, v.79, p.269 – 274, 1998.
- HAY, W.H. SHELL, L.G. LINDSAY, D.S., DUBEY, J.P. Diagnosis and treatment of *Neospora caninum* infection in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.197, p.87 – 89, 1990.
- HEMPHIL, A., GOTTSTEIN, B. AND KAUFMANN, H. Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. **Parasitology**, v.112, p.183 – 197, 1996.
- HILALI, M., ROMAND, S., THULLIEZ, P., KWOK, O.C.H., DUBEY, J.P. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from camels from Egypt. **Veterinary Parasitology**, v.75, p.269 – 271, 1998.
- INNES, E.A., LUNDÉN, A., ESTEBAN, I., MARKS, J., MALEY, S., WRIGHT, S., RAE, A., HARKINS, D., VERMEULEN, A., MCKENDRICK, I.J., BUXTON, D. A previous infection with *Toxoplasma gondii* does not protect against a challenge with *Neospora caninum* in pregnant sheep. **Parasite Immunology**, v.23, p.121 – 132, 2001.

- JACOBSON, L.S. AND JARDINE, J.E. *Neospora caninum* infection in tree Labrador littermates. **Journal of the South African Veterinary Association** v.64, p.47-51, 1993.
- JENSEN, L., JENSEN, T.K., LIND, P., HENRIKSEN, S.A., UGGLA, A., BILLE-HANSEN, V. Experimental porcine neosporosis. **APMIS**, v.106, n.4, p.475 – 482, 1998.
- JOLLEY, W.R., McALLISTER, M.M., McGUIRE, A.M., WILLS, R.A. Repetitive abortion in *Neospora* – infected ewes. **Veterinary Parasitology**, v.82, p.251 – 257, 1999.
- JONES, T.C., HUNT, R.D., KING, N.W. **Patología Veterinaria**, São Paulo: Manole Ltda, 2000, 1415p.
- LINDSAY, D.S., DUBEY, J.P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **American Journal of Veterinary Research**, v.50, p.1981–1983, 1989.
- LINDSAY, D.S., DUBEY, J.P. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). **Journal of Parasitology**, v.76, p.410 – 413, 1990a.
- LINDSAY, D.S., DUBEY, J.P. *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) Infections in rats. **Canadian Journal of Zoology**, v.68, p.1595 – 1599, 1990b.
- LINDSAY, D.S., KELLY, E.J., MCKOWN, R., 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*) and experimental infections of coyotes with *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, v.82, p.657 – 659, 1996a.
- LINDSAY, D.S., RIPPEY N.S., POWE, T.A., SARTIN, E.A., DUBEY, J.P., BLAGBURN, B.L., Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. **American Journal of Veterinary Research**, v.56, p.1176 – 1180, 1995.
- LINDSAY, D.S., STEINBERG, H., DUBIELZIG, R.R., SEMRAD, S.D., KONKLE, D.M., MILLER, P.E. AND BLAGBURN, B.L. Central nervous system neosporosis in a foal. **American Journal of Veterinary Diagnostic investigation**, v.8, p.507 – 510, 1996b.
- LINDSAY, D.S., UPTON, S.J., DUBEY, J.P. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1521 – 1523, 1999.

- LUNA, L.G. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3^a ed. Washington D.C. McGraw – Hill. p.1 – 37, 1968.
- MARSH, A.E., BARR, B.C., MADIGAN, J., LAKRITZ, J., NORDLHAUSEN, R., CONRAD, P.A. Neosporosis as a cause of equine Protozoal Myeloencephalitis, **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 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). **Journal of Parasitology**, v, 84, p.983 – 991, 1998.
- MAYHEW, I.G., SMITH, K.C., DUBEY, J.P., GATWARD, L.K. AND McGLENNON, N.J. treatment of encephalomyelitis due to *Neospora caninum* in a litter of puppies. **Journal of Small Animal Practice**, v.32, p.609 – 612, 1991.
- McALLISTER M.M. Uncovering the Biology and Epidemiology of *Neospora caninum*. **Parasitology Today**, v.15, n.6, p.216 – 217, 1999.
- McALLISTER, M.M, JOLLEY, W.R., WILLS, R.A., LINDSAY,D.S., MCGUIRE, A.M., TRANAS, J.D. Oral inoculation of cats with tissue cysts of *Neospora caninum*. **American Journal of Veterinary Research**, v.59, p.441 – 444, 1998b.
- 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*. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.1473-1478, 1998a.
- 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. **Veterinary Pathology**, v.33, p.647 – 655, 1996.
- McKINNEY, M.M., PARKINSON, A. A simple, non-chromatography procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. **Journal of immunological Methods**, v.96, p.271 – 278, 1987.
- MELO, C.B., LEITE, R.C. *Neospora caninum* em Minas Gerais: Dados preliminares. XI SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA. In: XI SEMINARIO DE PARASITOLOGÍA VETERINÁRIA. 1999, Salvador, BA **Anais...Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, 1999, p.225.
- MINEO, T.W.P., SILVA, D.A.O., COSTA, G.H.N., VON ANCKEN, A.C.B., KASPER, L.H., SOUZA, M.A., CABRAL, D.D., COSTA, A.J., MINEO, J.R. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.98, p.239 – 245, 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 closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1545 – 1556, 1999.
- ODIN, M., AND DUBEY J.P. Sudden death associated with *Neospora caninum* – myocarditis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.203, p.831 – 833, 1993.
- OGAWA , L., SANTOS, A.P.M., NAVARRO, I.T., BRACARENSE, A.P.F.R.L., VIDOTTO, O., OKANO, W., FALBO, M.K., ALFIERI, A.A., MEDICI, K.C., FREITAS, J.C., OLIVEIRA, R.C., FREIRE, R.L., GONDIM, L.F.P., MARANA, E.R.M. SHIMADA, M.T. Monitoramento sorológico do *Neospora caninum* em vacas leiteiras após abortamento em Londrina-Paraná e região. In XI SEMINARIO DE PARASITOLOGIA VETERINARIA. 1999, Salvador, BA **Anais...Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, 1999, p. 225.
- OTTER, A., WILSON, B.W., SCHOLES, S.F., JEFFREY, M., HELMICK, B., TREES, A.J. Results of a survey to determine whether *Neospora* is a significant cause of ovine abortion in England and Wales. **Veterinary Record**, v.140, n.7, p.175 – 177, 1997.
- PARÉ, J., HIETALA, S.K., THURMOND, M.C. An Enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora sp.* Infection in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.7, p.352 – 359, 1995.
- PERL, S., HARRUS, S., SATUCHNE, C., YACOBSON, B., HAINES, D. Cutaneous neosporosis in dog in Israel. **Veterinary Parasitology**, v.79, p.257-261, 1998.
- PETERS, M., LUTKEFELS, E., HECKEROTH, A.R., SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cyst in skeletal muscle of naturally infected dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.1144 – 1148, 2001.
- PETERSEN, E., LEBECH, M., JENSEN, L., LIND, P., RASK, M., BAGGER, P., BJÖRKMAN, C., UGGLA, A. *Neospora caninum* Infection and Repeated Abortions in Humans. **Emerging Infectious Diseases**, v.5, n.2, 1999.
- PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B. e SOBIN, L.H. **Laboratory Methods in Histotechnology – Armed Forces Institute of Pathology**. Washington, 1992. 274p.
- ROMAND, S., THULLIEZ, P., DUBEY, J.P. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. **Parasitology Research**, v.84, p.50 – 53, 1998.
- SCHARS, G., PETERS, M., WURM, R., BÄRWALD, A., CONRATHS, F.J. The Efficiency of Vertical transmission of *Neospora caninum* in Dairy Cattle Analyzed by serological techniques. **Veterinary Parasitology**, v.80, p87 – 98, 1998.

- SIMPSON, V.R., MONIES, R.J., RILEY, P., CROMEY, D.S. Foxes and Neosporosis. **The Veterinary Record**, v.141, p.503, 1997.
- SPEER, C.A., DUBEY, J.P. ultrastructure of tachyzoites, bradizoytes and tissue cyst of *Neospora caninum*. **Journal of Protozoology**, v.36, p.458 – 463, 1989.
- SPEER, C.A., DUBEY, J.P., McALLISTER, M.M., BLIXT, J.A. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradizoytes and tissue cyst of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1509 – 1519, 1999.
- THILSTED, J.P., DUBEY, J.P. Neosporosis – Like Abortions in a Herd of Dairy Cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.1, p.205 – 209, 1989.
- THURMOND, M.C., HIETALA, S.K. Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first – lactation dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 210, p.672 – 674, 1997.
- TRANAS, J., HEINZEN, R.A., WEISS, L.M., McALLISTER, M.M. Serological Evidence of Human Infection with the Protozoan *Neospora caninum*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.6, p.765 – 767, 1999.
- TREES, A.J., DAVISON, H.C., INNES, E.A., WASTLING, J.M. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International journal for Parasitology**, v. 29, p.1195 – 1200, 1999.
- VENTURINI, M.C., VENTURINI, L., BACIGALUPE, D., MACHUCA, M., ECHAIDE, I., BASSO, W., UNZAGA, J.M., DI LORENZO, C., GUGLIELMONE, A, JENKINS, M.C., DUBEY, J.P. *Neospora caninum* infection in bovine fetuses and dairy cows with abortions in Argentina. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1705 – 1708, 1999.