



COLÉGIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

**"I Fórum Brasileiro de Estudos sobre
Neospora caninum"**

ANAIS

São Paulo, 15 e 16 de setembro de 2005

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo

Apoio:



Bem vindos ao I Fórum Brasileiros de Estudos sobre *Neospora caninum*

A Comissão Organizadora do I Fórum Brasileiro de Estudos sobre *Neospora caninum* saúda todos os participantes e deseja uma feliz estada em São Paulo durante estes dias.

Durante o último Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária ocorrido em Ouro Preto, devido ao grande interesse que a mesa redonda sobre Neosporose despertou, com elevado número de participantes, foi sugerido por vários participantes que fosse organizado um encontro onde pudéssemos discutir com mais calma o tema. Assim sendo, logo que esta diretoria tomou posse, decidimos que iríamos realizar este Fórum e, felizmente tivemos o apoio de vários colegas, com o envio de trinta e sete trabalhos que serão discutidos nestes dias, confirmando que o tema é de grande interesse da comunidade científica brasileira e que ainda há várias perguntas a serem por nós respondidas.

Agradecemos aos colegas do exterior, pesquisadores experientes em *N. caninum* que irão dividir conosco seus conhecimentos e abrilhantar as discussões.

Finalmente, não poderíamos deixar de agradecer a Direção da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e a Intervet pelo apoio que nos deu para que este seja um Fórum de debates enriquecedor.

São Paulo, 14 de setembro de 2005.

Rosângela Zacarias Machado
Solange Maria Gennari
Rodrigo Martins Soares
Sandra Mayumi Nishi

PROGRAMA
QUINTA-FEIRA, 15 DE SETEMBRO

08:30 **Abertura**

Apresentação de trabalhos

Situação atual das pesquisas com *Neospora caninum* no Brasil (1-11)
Coordenador: Rodrigo Martins Soares

- 09:00 1 ***Neospora caninum* em búfalos (*Bubalus bubalis*)**
Aline A. R. Rodrigues, Daniel M. Aguiar, Takako U. Fujii, Rinaldo B. Vianna, Vânia S. O. de Paula, Wilma A. S. Buzeti, Rosângela Z. Machado, Rodrigo M. Soares, Solange M. Gennari
- 09:15 2 **Aborto Bovino por *Neospora caninum*: fatores associados ao resultado positivo da imunoistoquímica**
Caroline Argenta Pescador, Luís Gustavo Corbellini, André Corrêa, Milene Schmitz, Djeison Lutier Raymundo, David Driemeier
- 09:30 3 **Kinetics of TCD4⁺ and TCD8⁺ lymphocyte populations in dogs experimentally infected with *Neospora caninum***
Tiago W.P. Mineo, Rosângela Z. Machado
- 09:45 4 **Possible role of bovine trophoblast giant cells in the vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle**
Rosângela Z. Machado, T.W.P. Mineo, L.P. Landim Jr, A.F. Carvalho, C. Pfarrer, S.M. Gennari, A.A.R. Rodrigues, M.A. Miglino
- 10:00 5 **Clonagem e expressão da porção C-terminal do antígeno de superfície NC-43 de *Neospora caninum* e sua identidade com anticorpos de bovinos no estado de Mato Grosso do Sul**
Renato Andreotti, F. Paiva, M.S.C. Lima-Junior, A. Caetano, M.F.C. Matos
- 10:15 **Café**
- 10:30 6 **Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients infected by HIV or with neurological disorders**
J. Lobato, D.A.O. Silva, T.W.P. Mineo, J.D.H.F. Amaral, G.R. Silva Segundo, J.M. Costa-Cruz, M.S. Ferreira, A.S. Borges, José Roberto Mineo
- 10:45 7 **Experimental infection of pigeons (*Columbia livia*) by *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii***
Tiago W. P. Mineo, J.A. Marciano, A.O.T. Carrasco, K. Werther, A.A. Pinto, R.Z. Machado
- 11:00 8 **Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em animais silvestres brasileiros**
Lúcia E.O. Yaj, William A. Cañón-Franco, Júlia C.H. Tiemann, J.P. Dubey, José M.B. Duarte, Sílvio L.P. de Souza, Vilma C. Geraldi, Celso E. Souza, Nara A.R. Farias, Jerônimo Ruas, Solange M. Gennari

- 11:15 9 **Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora* spp em eqüinos de diferentes Estados brasileiros**
Jessica S. Hoane, Solange M. Gennari, Jitender P. Dubey, Márcio G. Ribeiro, Alexandre S. Borges, Lúcia E. O. Yai, Daniel M. Aguiar, Guacyara T. Cavalcante, Gérson L. Bonesi, Daniel K. Howe
- 11:30 10 **Detecção de anticorpos anti-*Neospora* sp. em éguas e a correlação com a produção de potros no Paraná**
Daniele C.S Hoffmann, J.R. Dittrich, R.R.T.B. Richartz, M.E. Gasino Joineau, J. Antunes, R.D. Pinckney, I. Deconto, V. Thomaz-Soccol, R. Locatelli-Dittrich
- 11:45 11 **Estudo de caso-controle para verificação de associação entre distúrbios reprodutivos em fêmeas da espécie eqüina e infecção por *Neospora* sp**
Eliana Monteforte Cassaro Villalobos, Elenice Maria Sequetin Cunha, Maria do Carmo Cústodio de Souza Hunold Lara, Solange Maria Gennari, Sílvio Luís Pereira de Souza, Tatiana Evelyn Hayama Ueno, Rodrigo Martins Soares
- 12:00 **Almoço**

Continuação – Apresentação de trabalhos

Situação atual das pesquisas com *Neospora caninum* no Brasil (12-21)
Coordenador: Luís Fernando Pita Gondim

- 13:45 12 **Perdas na produção e custos no tratamento em rebanhos leiteiros canadense infectados com *Neospora caninum***
João Paulo A. Haddad, Ian R. Dohoo, John A. Vanleeuwen, Greg Keefe, Alfons Weersink
- 14:00 13 **Fatores de risco para soropositividade para *Neospora caninum* em vacas leiteiras canadenses**
João Paulo A. Haddad, Ian R. Dohoo, John A. Vanleeuwen, Greg Keefe, Morgan Scott, Terry Whiting
- 14:15 14 **Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e cães da Amazônia Ocidental Brasileira, Estado de Rondônia**
Daniel M. Aguiar, Guacyara T. Cavalcante, Willian A. Cañón-Franco, Aline A.R. Rodrigues, Daniela P. Chiebao, Marcelo B. Labruna, Luis M.A. Camargo, Solange M. Gennari
- 14:30 15 **Fatores de risco associados à presença de anticorpos contra *Neospora caninum* em cães de Araçatuba – SP**
Kátia D. S. Bresciani, Solange M. Gennari, Cárís M. Nunes, Anna Cláudia M. Serrano, Anderson B. de Moura, Neusa S. Stobbe, Silvia H. V. Perri, Alvimar J. da Costa, Ricardo A. Dias
- 14:45 16 **Coefficientes reprodutivos e características de desempenho em bovinos de corte infectados pelo *Neospora caninum***
Cláudia Del Fava, E.M. Pituco, E. De Stefano, L.H. Okuda, C.I.L. Ferrari, J.J.A.A. Demarchi, A. Marini, F.P. Oliveira, J.F. Fonzar, A.G. Gasparelli Júnior

- 15:00 17 **Pesquisa de *Neospora caninum* em sêmen de touros de Centrais de Inseminação Artificial do Brasil**
E.M. Pituco, Liria H. Okuda, C. Del Fava, E. Stefano, O.S. Shimoazono, C.N. Camargo, N.T.C. Galetti, M.C.T. Oliveira, L.H. Rodrigues
- 15:15 18 **Transmissão vertical de *Neospora caninum* em bovinos da microrregião de Goiânia, Goiás**
Suzana Alves Bastos, Débora Pereira Garcia Melo, Cybelly Moreno Boaventura, Andréa Caetano da Silva
- 15:30 19 **Prevalência de *Neospora caninum* em cães na cidade de Campo Grande, MS**
Fernando Paiva, R. Andreotti, A. K. Piacenti, T.C. Borghesan,
- 15:45 20 **Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos das microrregiões de Goiânia e Anápolis, Goiás**
Débora Pereira Garcia Melo, Suzana Alves Bastos, Cybelly M. Boaventura, Luis Miguel Ortega-Mora, Andréa Caetano da Silva
- 16:00 21 **Soroprevalência da infecção por *Neospora caninum* em ovinos reprodutores oriundos de rebanhos comerciais do Distrito Federal**
Tatiana E. H. Ueno, M. B. Heinemann, V. S. P. Gonçalves, A. A. R. Rodrigues, S. M. Gennari, T. L. B. Dilli, B. M. Akimoto, R. M. Soares
- 16:15 **Café**
- 16:30 **Diagnóstico sorológico e molecular em Medicina Veterinária – conceitos básicos.**
Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, FMVZ – USP, Brasil
- 18:00 **Churrasco de conagraçamento**

SEXTA-FEIRA, 16 DE SETEMBRO

- 08:30 **Métodos de diagnóstico do *Neospora caninum*.**
Dr. Mark Jenkins, United States Department of Agriculture, Beltsville, EUA
- 9:45 **Café & Pôsters**
- 10:45 **Epidemiologia do *Neospora caninum***
Dr. Willem Wouda, Animal Health Service, Holanda
- 12:15 **Almoço**
- 13:30 **Imunologia do *Neospora caninum***
Dra. Elisabeth A. Innes, Moredun Research Institute, Edinburg, Escócia
- 14:45 **Patologia comparada do *Neospora caninum***
Dr. Milton M. McAllister, Department of Veterinary Pathobiology, University of Illinois, EUA
- 16:00 **Café**
- 16:15 ***Neospora caninum* em animais silvestres**
Prof. Dr. Luís Fernando Pita Gondim, Escola de Medicina Veterinária, UFBA, Brasil
- 17:30 **Documento com recomendações para estudos futuros com *Neospora caninum***
Todos os participantes
- 18:00 **Encerramento**

Apresentação de pôsters

Sessão de Pôsters com presença dos respectivos apresentadores na sexta-feira, 16 de setembro (9:45 – 10:45)

- P1 **Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper e Uggla, 1988), em ovinos e caprinos do Estado de São Paulo**
L.P.C. Figliuolo, N. Kasai, Alessandra M.A. Ragozo, V.S. de Paula, R.A. Dias, S.L. Souza, A.A.R. Rodrigues, R.B. Viana, D.M. Aguiar, S.M. Gennari
- P2 **Soroprevalência e fatores associados a *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em ovinos e cães de propriedades do município de Guarapuava, Paraná, Brasil**
Paulo Roberto Romanelli, Roberta Lemos Freire, Odilon Vidotto, Elisabete Regina Marangoni Marana, Liza Ogawa, Vânia S. Ortega de Paula, Italmar Teodorico Navarro
- P3 **Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães da microrregião da Serra de Botucatu, Estado de São Paulo**
Carla Cristina G. de Moraes, Jane Megid, Edviges Maristela Pituco, Líria Hirome Okuda, Cláudia Del Fava, Eliana de Stefano
- P4 **Aspectos epidemiológicos da infecção pelo *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em cães o município de Campina Grande, Paraíba***
S.S. Azevedo, A.A.R. Rodrigues, C.S.A. Batista, S.A. Vasconcellos, D. M. Aguiar, A.M.A. Ragozo, C.J. Alves, S.M. Gennari
- P5 **Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães de Goiânia, Goiás**
Cybelly Moreno Boaventura, Suzana Alves Bastos, Débora Pereira Garcia Melo, Andréa Caetano da Silva
- P6 **Ocorrência de anticorpos contra *Neospora caninum* em soros de felinos naturalmente infectados do Município de Araçatuba, SP**
Kátia D. S. Bresciani, Anna Cláudia M. Serrano, Sílvia H. V. Perri, Alessandro F. T. do Amarante, Solange M. Gennari
- P7 **Avaliação dos parâmetros reprodutivos e transmissão vertical de *Neospora caninum* em central de transferência de embriões em Goiás**
Vanessa Silvestre Ferreira de Oliveira, Débora Pereira Garcia Melo, Bruno César Ferreira Gonzaga, Lucas Jacomini Abud, Andréa Caetano da Silva
- P8 **Isolamento de *Neospora caninum* em amostras de fetos bovinos abortados no Brasil**
Líria H. Okuda, E.M. Pituco, E. Stefano, L.M. Perucini
- P9 **Anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães e bovinos de propriedades rurais produtoras de leite tipo B da Região Norte do Estado do Paraná: Estudo da prevalência e de fatores de risco**
Sílvio L. P. Souza, José S. Guimarães, Denise P. Bergamaschi, Solange M. Gennari
- P10 **Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis Estados brasileiros**
Alessandra M.A Ragozo, V.S.O. de Paula, S.L.P. Souza, D.P. Bergamaschi, S.M.Gennari
- P11 **Obtención y estudio de la variabilidad biológica de nuevos aislados de *Neospora caninum***
Javier Regidor-Cerrillo, Luis Miguel Ortega-Mora, Andréa Caetano da Silva

- P12 **Projeto de cooperação internacional CAPES-MECD Espanha: “Neosporose bovina: prevalência, transmissão e variabilidade biológica entre isolados”**
Andréa Caetano da Silva, Luis Miguel Ortega Mora
- P13 **Avaliação da frequência de anticorpos para *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper e Uggla, 1988) e para *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1908) Nicolle e Manceaux, 1909, em pessoas soropositivas para o vírus da imunodeficiência humana (HIV)**
Paula Gonçalves Filippon, Camille Pâmela Benatti, Cristina Fialho, Lorena Eva Bigatti, Flávio Antônio Pacheco de Araujo, João Henrique Correa Kanan, Neusa Saltiel Stobbe
- P14 **Projeto de pesquisa: Quantificação da expressão gênica de citocinas em tecidos de bovinos infectados com *Neospora caninum***
Sandra M. Nishi, Solange M. Gennari, Rodrigo M. Soares, Paulo C. Maiorka
- P15 **Inquérito soropidemiológico do *Neospora caninum* em bovinos criados na região semi-árida do Estado da Bahia**
E. E. V. Jesus, Rosângela S. Uzêda, A. M. Pinheiro, J. C. F. Menk, M. A. O. Almeida
- P16 **Ocorrência de anticorpos IgG anti-*Neospora caninum* em rebanho de ovinos no Estado da Bahia**
A.R.S. Otero, Rosângela S. Uzêda, E.E.V. Jesus, A.M. Pinheiro, M.A.O Almeida
- P17 **Inquérito sorológico do *Neospora caninum* em caprinos do Estado da Bahia**
Rosângela S. Uzêda, E. E. V. Jesus, A. M. Pinheiro, M. A. O. Almeida, L. F. P. Gondim, H. V. Barbosa Jr

Diagnóstico Sorológico e Molecular em Medicina Veterinária – Conceitos Básicos

Leonardo José Richtzenhain

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo
Email: leonardo@usp.br

São diversas as características fenotípicas de um patógeno que podem ser empregadas na sua identificação. Entre elas estão sua morfologia, a capacidade de produção de toxinas, enzimas e receptores, a patogenicidade, a virulência, etc.

Características morfológicas são mais discriminativas em patógenos complexos, dada a riqueza de atributos morfológicos que podem ser pesquisados. Por outro lado, em patógenos mais simples as características morfológicas são frequentemente insuficientes para diferenciá-los. Assim, as características morfológicas permitem comumente diferenciar carrapatos de um mesmo Gênero, mas não vírus de uma mesma Família.

As técnicas sorológicas baseiam-se em características fenotípicas especiais dos patógenos, conhecidas como características antigênicas, decorrentes da capacidade de alguns de seus componentes de reagir com anticorpos específicos.

A fim de permitir uma análise crítica das técnicas sorológicas, os seguintes conceitos serão discutidos:

Reação sorológica (ou teste sorológico): São artifícios laboratoriais para evidenciar a reatividade entre anticorpos e determinantes antigênicos de antígenos. No diagnóstico de doenças transmissíveis, as reações sorológicas podem ser empregadas tanto no diagnóstico direto (detectando e identificando o agente), como no diagnóstico indireto (pesquisando a presença de anticorpos no animal que entrou em contato com o agente).

Identificação sorológica: É o uso de reação sorológica no diagnóstico direto, ou seja, na identificação de um patógeno através da sua reatividade com anticorpos padrão (de especificidade conhecida). Para tanto podem ser empregados soros padrão policlonais de animais experimentalmente imunizados, ou anticorpos monoclonais previamente produzidos.

Sorodiagnóstico: É o uso de reação sorológica no diagnóstico indireto, ou seja, pesquisando a presença de anticorpos no animal que entrou em contato com o agente. No sorodiagnóstico, o soro do animal a ser testado é sempre de natureza policlonal. Para tanto, podem ser empregados antígenos brutos ou purificados e, mais recentemente, os antígenos recombinantes. Eventualmente, em ensaios ditos competitivos, é possível pesquisar a presença no animal de anticorpos contra determinantes antigênicos específicos, através da competição dos mesmos com anticorpos monoclonais previamente obtidos.

Sinal: Toda reação sorológica indica a ocorrência ou não de complexos antígeno-anticorpo através do desenvolvimento de um sinal de natureza variável. Na aglutinação o sinal é a formação de grumos, na precipitação em gel é a formação de linhas de precipitação, na imunofluorescência é a emissão de fluorescência, no ELISA o desenvolvimento de cor, etc. Conceitualmente, o sinal é sempre gerado por interações antígeno-anticorpo.

Sensibilidade Analítica de uma Reação Sorológica: Nas diferentes reações sorológicas, um número variável de reações antígeno-anticorpo (ou impulsos elementares) deve ocorrer para a geração de um sinal detectável. A sensibilidade analítica de uma determinada reação sorológica é a menor quantidade de antígeno (no caso da identificação sorológica) ou anticorpo (no caso do sorodiagnóstico) que deve reagir para gerar um sinal. A sensibilidade analítica é determinada em condições experimentais *in vitro* e varia expressivamente entre as diferentes reações sorológicas.

Sinal específico: É o sinal obtido por impulsos elementares não relacionados à reatividade cruzada entre diferentes antígenos. Em outras palavras, é o sinal obtido pela reatividade com determinantes antigênicos específicos do agente focado.

Sinal inespecífico: É o sinal obtido por impulsos elementares relacionados à reatividade cruzada entre diferentes antígenos. É o sinal obtido pela reatividade com determinantes antigênicos presentes em mais de um agente. Este tipo de sinal tende a gerar resultados falso-positivos.

Ruído: É um “falso sinal” pois não é gerado pela interação antígeno-anticorpo, ou seja, por impulsos elementares. Como exemplo, pode-se citar a adsorção indevida de anticorpos a microplaca de ELISA, ou a deposição de conjugado em tecidos na imunofluorescência. Notar que é diferente do sinal inespecífico, o qual embora também tenda a gerar resultados falso-positivos, é fruto de impulsos elementares.

Sinal Aparente das Reações Sorológicas: O Sinal Aparente (ou Sinal Resultante) de uma reação sorológica é determinado pela Equação 1:

$$\text{Equação 1. } S_a = S_e + S_i + R$$

Onde: S_a = Sinal aparente; S_e = Sinal específico; S_i = Sinal inespecífico R = Ruído

Como se nota, na geração do Sinal Aparente de uma reação sorológica, participam os Sinais Específicos, os Sinais Inespecíficos e os Ruídos. Avaliar e reduzir a participação dos Sinais Inespecíficos e dos Ruídos, constitui tarefa árdua e um desafio constante para os sorologistas.

Especificidade Analítica de uma Reação Sorológica: É definida como a capacidade que um teste sorológico possui de discriminar antígenos semelhantes. É extremamente difícil de avaliar, pois a escolha dos antígenos a discriminar é finita e arbitrária e normalmente calcada na proximidade filogenética dos agentes que os possuem.

Classificação dos Testes Sorológicos

Os testes sorológicos podem ser divididos em Testes de Ligação Primária e Secundária, através das seguintes conceituações:

Testes de Ligação Primária: São testes onde todo impulso elementar participa da geração do sinal, de maneira que um aumento contínuo de impulsos elementares leva a um aumento contínuo do sinal. Estes testes não estão sujeitos a fenômenos de *pró-zona*. Os testes sorológicos que empregam anticorpos marcados com fluorocromos, enzimas e radioisótopos constituem os testes de ligação primária.

Testes de Ligação Secundária: São testes onde nem todo impulso elementar participa da geração do sinal, de maneira que um aumento contínuo de impulsos elementares não leva necessariamente a um aumento contínuo do sinal. Estes testes estão sujeitos a fenômenos de *pró-zona* acima mencionados.

Sensibilidade e Especificidade Diagnósticas das Reações Sorológicas: As Sensibilidade e Especificidade Analíticas das Reações Sorológicas, como já comentado, são determinadas experimentalmente *in vitro* sob condições controladas e bem definidas em laboratório. Todavia, quando utilizamos as reações sorológicas para fins diagnósticos, ou seja, para inferir sob a condição de um parâmetro em indivíduos de uma população, os termos sensibilidade e especificidade ganham outra conotação. No contexto diagnóstico de doenças transmissíveis, além das características analíticas do teste sorológico em questão, entram em jogo uma série de outros fatores muito mais complexos, que envolvem relações entre o agente, o hospedeiro e o meio ambiente.

Os parâmetros normalmente pesquisados em doenças transmissíveis são Doente (+) / Sadio (-) ou Infectado (+) / Não infectado (-). Assim, a Sensibilidade Diagnóstica de uma reação sorológica é medida pela proporção de quantos dos indivíduos realmente positivos são classificados como positivos pelo teste em questão. A Especificidade Diagnóstica de uma reação sorológica é medida pela proporção de quantos dos indivíduos realmente negativos são classificados como negativos pelo teste em questão.

Diagnose of *Neospora caninum*

Mark Jenkins

Animal Parasitic Diseases Laboratory, United States Department of Agriculture,
Beltsville, MD, USA

Email: mjenkins@anri.barc.usda.gov

The disease neosporosis is caused by the protozoan *Neospora caninum* and appears to be a major cause of abortion in dairy and beef cattle worldwide. Neosporosis presents a significant problem to veterinary practitioners because there are no obvious clinical signs in the infected dam, aside from abortion or birth of a diseased calf. Immunohisto-chemistry (IHC) and/or isolation of *N. caninum* from neural tissue and the absence of evidence for other abortifacients (e.g. *Leptospira*) provide strong evidence for neosporosis-associated abortion. Although point source (oocyst) infections in naïve cows result in higher rates of reproductive failure than recrudescence of a chronic tissue cyst infection, the most common outcome of both exogenous and endogenous transplacental transmission is the birth of an infected, but otherwise normal calf. Studies on epidemiology of neosporosis and confirmation of clinical pathology in the diagnosis of *N. caninum* as a cause of abortion rely heavily on detecting antibodies in serum or other fluids from adult cows, newborn calves, and aborted fetuses. Serological assay of fetal fluids has been shown to be useful for corroborating histological examination or polymerase chain reaction (PCR) amplification of *N. caninum* DNA in neural tissue. The presence of antibodies to *N. caninum* in dam serum or in pre-colostral serum from a newborn calf is indicative of exposure to the parasite. Assays such as immunofluorescence antibody test (IFAT), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and immunoblot assays (IB) all rely on recognition of a mixture of native *N. caninum* antigens of varying complexity. The use of recombinant *N. caninum* proteins in ELISA format is gaining greater acceptance in serodiagnosis of this disease. This lecture will review the current state of technology in the use of native and recombinant *N. caninum* protein in serodiagnosis of neosporosis in cattle. In addition, the corroboration of IHC or *N. caninum* cell culture by molecular methods, such as PCR will be discussed.

Some aspects of the epidemiology of bovine neosporosis

Willem Wouda

Animal Health Service Ltd., P.O. Box 9, 7400 AA Deventer, The Netherlands

Email: w.wouda@gdvdieren.nl

Neospora caninum is a major cause of reproductive failure in dairy and beef cattle in many countries, causing considerable economic losses. The infection may cause foetal resorption, mummification, abortion, and premature birth. However, most foetuses infected during pregnancy survive and are born congenitally infected but clinically healthy. Rarely, congenitally infected calves may have nervous signs varying from mild ataxia to tetraparalysis. The main clinical manifestation of neosporosis in cattle is abortion. The infection has been associated with sporadic, endemic and epidemic abortions.

In the Netherlands the mean apparent seroprevalence for *N. caninum* in 2003 was 10.3% in dairy cattle and 13.9% in beef cattle. In contrast, the mean seroprevalence in 12 dairy herds with endemic abortions was 39% (range 13% to 67%) whereas in 5 herds with epidemic abortions this figure was even 51% (range 27% to 79%). We have some experience with the use of bulk milk screening for *N. caninum* antibodies as a tool to monitor a certain

seroprevalence in the lactating cows, which may be associated with an increased risk of reproductive losses due to neosporosis. The ELISA we use for bulk milk testing can detect a proportion of seropositives of 15% or higher among the lactating cows.

The main route of transmission in cattle is the vertical route from cow to calf during gestation. We found that the rate of congenital infection decreased with increasing parity of the mother. Seropositive heifers had 80% congenitally infected offspring, while in older cows 66% of the offspring was congenitally infected. Congenitally infected animals transmit the infection again to their offspring. Therefore, vertical transmission contributes significantly to the maintenance of an infection in a herd. A prospective cohort study in four dairy herds with *N. caninum*-associated abortions, showed that seropositive cows had a two- three-fold higher risk of abortion than seronegative cows. It appears that most sporadic and endemic abortions in cattle due to neosporosis are the result of reactivation of a chronic infection.

We have studied a number of *N. caninum* abortion epidemics often involving more than 20% of the pregnant cattle in a herd. In several occasions we found evidence of a recent horizontal infection preceding the abortion outbreak. Since the dog has been identified as a definitive host of *N. caninum*, it is plausible that cattle may be infected by ingestion of oocysts shed by dogs. Epidemiological evidence for a role of farm dogs was obtained in a case control study, which showed that the presence of dogs on a farm was the most important risk factor for the occurrence of *N. caninum* abortions in the cattle. In a further study we analysed the *N. caninum* seropositivity of farm dogs in relation to the *N. caninum* seroprevalence of the cattle on these farms. It was found that the presence of a seropositive dog on a farm was associated with a high prevalence of infection in the cattle, indicating a relationship between *N. caninum* infections in both species.

Several studies have shown that the prevalence of antibodies to *N. caninum* was significantly higher in farm dogs than in dogs from urban areas. Apparently, farm dogs are at a higher risk of exposure to *N. caninum* than urban dogs. A collaborative study with German researchers showed that feeding of placenta from naturally infected cows to dogs may lead to shedding of oocysts. A second meal with infected placenta after five weeks did not lead to a repeated oocyst shedding in these dogs, but did so in an unexposed control dog. Field observations indicate that placenta is a likely source of infection for farm dogs. Other sources of infection for dogs may be bovine carcasses or raw meat. In another study in 8 dairy herds with evidence of a point source exposure to *N. caninum* it was found that a new dog had been introduced within 1.5 years prior to onset of postnatal infections in the cattle. The hypothesis is that the newly introduced dogs acquired the infection by ingestion of materials from persistently infected cattle, and subsequently shed oocysts, which caused infection and abortions in previously seronegative cattle.

Vertical and horizontal transmission may occur simultaneously in a herd. A single serological screening of a whole herd in connection with an analysis of age distribution of seropositive animals and a comparison of dam-daughter serostatus, is a good tool to interpret the mode of transmission. In case of vertical transmission, seropositive animals are equally distributed across the different age groups, and seropositive daughters have seropositive dams. In case of (additional) horizontal transmission an age related clustering of seropositive animals can be found together with a lack of association between the serological status of dams and daughters. Age clusters of *N. caninum* seropositive cattle may have either seronegative dams or seronegative offspring. The first situation indicates post-natal infection of the daughters, and the second situation indicates post-natal infection of the dams after the birth of their seronegative daughters.

Immune responses to *Neospora caninum*

Elisabeth A. Innes

Moredun Research Institute, Pentlands Science Park, Edinburgh EH26 OPZ
Email: Lee.Innes@moredun.ac.uk

Infection with the protozoan parasite *Neospora caninum* is thought to be a major cause of reproductive failure in cattle worldwide. Cattle infected with the parasite are 3-7 times more likely to abort compared to uninfected cattle. The parasite may be transmitted to cattle through the ingestion of oocysts that are shed in the faeces of acutely infected dogs (definitive host of *N. caninum*) or by congenital infection from mother to foetus via the placenta. Interestingly, transplacental transmission can occur over consecutive pregnancies and congenitally infected heifers can transmit the parasite to their own offspring. This repeated vertical transmission observed in naturally infected cattle suggests that cattle do not easily develop effective immunity to the parasite, presenting a significant challenge to the development of a control strategy based on vaccination.

Neospora caninum, like many other apicomplexan parasites, is an obligate intracellular pathogen therefore it is likely that cell-mediated immune (CMI) responses are important in protective immunity. Treatment of cells *in vitro* using the inflammatory cytokines interferon gamma (IFN γ) or tumour necrosis factor alpha (TNF α) caused significant inhibition of intracellular parasite multiplication. In addition depletion of IFN γ in mice rendered the animals more susceptible to disease. Lymphocytes from infected cattle will show antigen-specific proliferative responses resulting in the production of IFN γ and CD4+ T-cells can be cytotoxic for parasite infected autologous cells.

Bovine neosporosis is a disease that manifests during pregnancy where the developing foetus is particularly vulnerable. Pregnancy poses an interesting problem for the immune system of the mother as she is essentially carrying a semi-allogeneic graft (the foetus) without immunological rejection taking place. Various theories have been put forward to explain this interesting phenomenon and pertinent within the context of understanding the host-parasite relationship in bovine neosporosis is cytokine regulation in pregnancy. The pro-inflammatory Th-1-type immune responses, that appear to be important in protection against *N. caninum*, may, at the materno-foetal interface, prove to be detrimental to the pregnancy. The cytokine environment in the placenta favours the more regulatory Th-2-type cytokines that may not be so effective in controlling the infection. There are significant changes in the dam's CMI response as pregnancy progresses that may influence disease pathogenesis. Around mid-gestation there is a significant down-regulation of mitogenic and antigen-specific lymphocyte proliferation along with IFN γ responses compared with pre-pregnancy and early pregnancy samples from the same group of cattle. The timing of placental and foetal infection in gestation is also an important factor in determining disease outcome. The immuno-competence of the foetus develops progressively throughout gestation. Around 2-3 months of gestation the foetal lymphocytes will respond to mitogen and start showing antigen-specific proliferation, antibody and cytokine responses from 4-6 months of gestation.

As pregnancy progresses there is a decrease in disease severity. It is unknown whether this may be due to the foetus being increasingly able to protect itself or that the regulatory Th2-type cytokines produced by the dam, necessary to maintain the pregnancy, are damping down the potentially destructive Th-1-type maternal immune response.

The host-parasite relationship in cattle infected with *N. caninum* is a dynamic interaction involving the maternal immune response, the developing foetal immune response and the parasite; with the interaction between the three changing throughout pregnancy. The parasite exploits the natural changes occurring in the dam's immune response during pregnancy to transfer to the foetus. If the foetus survives, it is born infected with the parasite often with no obvious clinical signs. The parasite and host co-exist quite happily until the host becomes pregnant and then the parasite becomes active again transmitting to a new host. This form of vertical transmission is a highly effective strategy for the parasite as naturally infected cattle will transmit the parasite, over several generations, without developing effective immunity. In contrast, experimental infection of naïve cattle prior to pregnancy did not result in vertical transmission of the parasite during pregnancy and induced sufficient immunity to protect cattle against an experimental challenge administered in mid-gestation.

While it is possible to induce protective immunity following experimental infection in naïve cattle this may be more problematic in congenitally infected animals. Does the fact that some cattle first experience the parasite following infection *in-utero*, while their immune

systems are still developing, somehow compromise their ability to develop effective immunity against the parasite later in life?

Improving our understanding of the host-parasite relationship in bovine neosporosis will aid in the development of effective control strategies against the disease.

1The comparative pathology of neosporosis

Milton M. McAllister

Department of Pathology, University of Illinois, EUA
Email: mmmcalli@uiuc.edu

In this review, "neosporosis" will be used to refer to any disease caused by infection with *Neospora caninum*. The lesser known *N. hughesi*, which has been isolated from horses with myelitis, will not be discussed.

In naturally occurring *N. caninum* infections of any animal host, the most common result is no visible lesion and no obvious clinical abnormality; in other words, most infections are subclinical. In cattle, clinical disease may occur in the fetus or congenitally infected neonatal calf, but (other than abortion) there is no report of clinical illness ever having occurred in cattle after the first several weeks of life. When congenital infection occurs, the result may be: a subclinical infection (the most common occurrence); abortion or stillbirth (the most frequently observed problem); or neurological or other impairments including weakness, inability to stand, imbalance, poor suckling reflex, or seizures.

Infection of dogs is usually subclinical, even when they are actively shedding oocysts in feces. Litters of puppies that are congenitally infected may develop progressive hind-limb paresis. Various clinical signs and lesions have been associated with neosporosis in adult dogs, which may involve neurologic abnormalities, myocarditis, or focal cutaneous ulcers. Although immunosuppression is often present in affected dogs (sometimes from treatment with corticosteroids), some reports of canine neosporosis are not necessarily associated with immunosuppression, so it is natural to speculate that both the genetics of the dog and the virulence of the parasite strain play roles in the outcome.

Naturally-occurring neosporosis has been reported in aborted fetuses of water buffalo (*Bubalus bubalis*), aborted goat fetuses and in a newborn goat kid with encephalitis, a 2-month-old fawn of a wild black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*), a calf of a free-ranging white rhinoceros (*Ceratotherium simum*), a stillborn fawn of a captive deer of eld (*Cervus eldi siamensis*), and in stillborn calves of captive lesser kudu (*Tragelaphus imberbis*). Neosporosis is uncommonly recognized in sheep; this disease was implicated in a portion of abortions in a flock of ewes, and was once discovered in a lamb with congenital myelitis. Infection with *N. caninum* was also implicated in France in a small proportion of abortions in horses. This organism has been detected by isolation or PCR in wild brown rats (*Rattus norvegicus*), wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) and in a wild raccoon (*Procyon lotor*) with concurrent canine distemper infection, but so far there have been no reports of illness attributed to *N. caninum* infections in these animal species. Although serologic surveys indicate that many other species of wild animals may be infected with *N. caninum* (or with cross-reacting organisms), so far there have been no reports of associated disease in these animals.

There are several methods of *N. caninum* transmission, and it is important to have a clear understanding of the differences because they influence the outcome of the infection. The most commonly recognized method of transmission in cattle (and the easiest to detect in retrospective studies) is transplacental; however, there are distinct types of transplacental transmission that should be considered. "Exogenous" transplacental transmission refers to passage of organisms to the fetus from a cow that first becomes infected when she is pregnant. "Endogenous" transplacental transmission refers to passage of organisms to the fetus from a cow that was already infected with *N. caninum* before she became pregnant. Endogenous

transplacental transmission can be further subdivided into 1) transmission from cows that themselves were infected after birth but before the current pregnancy, or 2) transmission from cows that themselves were born infected (congenitally infected cows). Currently, there are no tests to distinguish between the two subtypes of endogenous transplacental transmission, and it isn't known if these two types of infected cows will transmit infections to their offspring with the same efficiency or likelihood of abortion. The commonly used term "vertical transmission" does not distinguish between exogenous and endogenous transplacental transmission, so the newer terminology is recommended.

Cattle may also become infected at any age after birth by ingesting *N. caninum* oocysts. Another possible method of post-natal transmission to cattle, which has not been tested, is "artificial carnivorism" - - ingestion of *N. caninum* infected tissues of rodents or other animals that have been inadvertently processed into a mixed ration; whether or not wild rodents or other small animals may be infected with *N. caninum* has been poorly studied, but PCR evidence of infections in rats has been reported in Taiwan. Other possible methods of post-natal transmission, which appear to be uncommon if they occur at all, include transmammary transmission, ingestion of another cow's placenta, and transmission through infected semen.

Canids become infected by ingesting infected tissues of cattle, deer, or other intermediate hosts. It is a common misconception that dogs are most likely to become infected by consuming aborted fetuses. In fact, many aborted fetuses are badly decomposed and the *N. caninum* organisms are often dead. Dogs can become infected by eating placentas from congenitally infected calves, carcasses of subclinically infected calves or cows that die from unrelated causes, or offal from slaughtered cattle or wild deer killed by human hunters (in North America, infection prevalence in deer is very high). Transplacental transmission also occurs in dogs, but only in a small proportion of pregnancies.

The lesions (i.e. the changes in tissues) that are induced by infection with *N. caninum*, and the resulting disease, are variable depending upon the animal host, the route of infection, and the presence of immunosuppression. The previous infection history is also important; for example, during point-source outbreaks of neosporosis, the risk of abortion is lower in chronically infected cows than in their newly infected herdmates. Infection with *N. caninum* can cause mild to severe inflammation in the brain and spinal cord (CNS), eyes, dorsal nerve root ganglia (PNS), skeletal muscle, heart, skin, liver, kidney, and lungs. In all species, the predominant cellular response to *N. caninum* infection is lymphocytic, with admixed histiocytes (i.e. macrophages without abundant cytoplasm). Chronic inflammatory responses may also contain plasma cells. It is difficult in routine H&E stains to distinguish lymphocytes from microglia, or histiocytes from astrocytes, which is why the inflammation is often diagnosed as "nonsuppurative" (indicating the absence of neutrophils), instead of lymphocytic, astrocytic, or gliotic. Inflammation in the brain is distributed in a multifocal pattern, and severe lesions may have a central area of necrosis, which is very classical of protozoal infections. There often is meningitis, which can occur with or without encephalitis.

Tachyzoites may be observed in lesions, but are usually difficult to find without an immunohistochemical (IHC) stain. IHC of brain and other tissues is a very helpful diagnostic tool, but this is not a very sensitive test unless multiple sections of multiple tissues are examined. IHC procedures should be validated using control tissues that contain *N. caninum*, and compared with control tissues that contain *T. gondii*; in most animals, toxoplasmosis is the major differential diagnosis for neosporosis. Tissue cysts may occur in the CNS of animals infected for several weeks or longer. The cysts, when observed, may be in an area with or without inflammation. The cyst wall of *N. caninum* is often thicker than 1 micron, in which case it is clearly distinguished from *Toxoplasma gondii*, although a cyst with a thin wall could be either *T. gondii* or a young *N. caninum* cyst. In cattle, toxoplasmosis is rare and neosporosis is common. In sheep, neosporosis appears to be rare and toxoplasmosis is common. Abortion in goats can be caused by either organism.

Bovine neosporosis should be suspected when nonsuppurative lesions are found in the brain, meninges, heart (epicardium, myocardium, endocardium), or skeletal muscles. The likelihood of neosporosis is very high when the fetus has nonsuppurative lesions in all three of the above tissues. Multifocal cerebral necrosis, when it occurs, is nearly pathognomonic for neosporosis in cattle, because this lesion does not occur with BVDV infection and because toxoplasmosis is so rare in cattle. Similar lesions in goats and sheep are also compatible with

toxoplasmosis. The finding of *N. caninum* tachyzoites or tissue cysts in lesions, using a properly controlled IHC test, is diagnostic of neosporosis abortion; however, organisms are not found in all cases. PCR is an excellent tool to confirm infections, but may also be positive in subclinically infected animals that perhaps were aborted for unrelated reasons. The vast majority of cows that abort from neosporosis will have a high antibody titer to *N. caninum*, although many cows will also be seropositive when giving birth to clinically normal calves.

Subclinical infections in newborn calves may be associated with mild to moderate lesions in brain and meninges, but infected adults have no recognized lesions. At any time after fetal development and the neonatal period, *N. caninum* organisms have never been observed in tissues using H&E or IHC. Infections in adult cows are difficult to detect with PCR, even in seropositive cows that have repeatedly transmitted infections to their offspring.

It is probable that the natural host range of *N. caninum* may be far greater than currently recognized. Large scale surveys are needed of wild rodents, birds, and other animals. Sylvatic cycles between wild ruminants and wild canids may be more significant to the parasite than is the domestic cycle between dogs and cattle. On the other hand, the gastrointestinal tract may be a natural barrier to the transmission of *N. caninum* in many animal species. Although most animals can be experimentally infected by injection of tachyzoites, it is more important to determine which animals can be infected by ingestion of oocysts or by carnivorousness.

***Neospora caninum* em animais silvestres**

Luís F. P. Gondim

Departamento de Patologia e Clínicas, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Av. Ademar de Barros 500, Ondina, Salvador, Bahia, 40170-110, Brasil.
Tel. 71-3263-6767, Fax. 71-3245-2813, E-mail: pita@ufba.br

A neosporose, doença causada pelo coccídio *Neospora caninum*, é uma enfermidade mundialmente conhecida por causar altas taxas de abortamento em bovinos e alterações neuromusculares em cães. A existência do ciclo silvestre do parasita tem sido suspeitada, pois *N. caninum* tem sido observado em diferentes espécies de animais silvestres. Estudos sorológicos realizados em várias regiões do planeta são sugestivos de que o parasita está disseminado na fauna silvestre, porém, a simples detecção de anticorpos anti-*N. caninum* nesses estudos deve ser vista com cautela. A inexistência de teste sorológico para *Hammondia heydorni*, parasita muito próximo filogeneticamente do *N. caninum*, deixa dúvidas sobre a possibilidade de reatividade cruzada entre os dois parasitas. Recentemente, foi confirmada a participação de um canídeo silvestre (coiote / *Canis latrans*) e veado (*Odocoileus virginianus*) no ciclo de vida do *N. caninum*. Animais silvestres estão provavelmente contribuindo para a transmissão do parasita para animais de produção e de companhia. As medidas de controle e prevenção da neosporose, antes centradas em condutas envolvendo animais domésticos, devem também contemplar a participação de animais silvestres. Nessa apresentação é abordado o impacto dos recém-descobertos hospedeiros silvestres de *N. caninum* e de outras espécies animais potencialmente importantes no ciclo de vida do parasita.

(1)

***Neospora caninum* em búfalos (*Bubalus bubalis*)**

Aline A. R. Rodrigues^a, Daniel M. Aguiar^a, Takako U. Fujii^b, Rinaldo B. Vianna^c, Vânia S. O. de Paula^a, Wilma A. S. Buzeti^d, Rosangela Z. Machado^e, Rodrigo M. Soares^a, Solange M. Gennari^{a*}

^a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87 – Cidade Universitária, São Paulo, SP. *Email: sgennari@usp.br

^b Pólo Regional da APTA, Registro, São Paulo

^c Universidade Federal Rural da Amazônia, Pará

^d Faculdade de Engenharia, Curso de Agronomia, UNESP, Ilha Solteira, São Paulo ^e Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, São Paulo

O protozoário *Neospora caninum* é uma das maiores causas de aborto em bovinos, porém em búfalos apenas haviam relatos da presença de anticorpos anti-*N. caninum* em alguns países onde esta espécie é economicamente importante ^{1, 2, 3}. Os estudos abaixo descritos foram realizados na tentativa de obter-se maiores informações sobre *N. caninum* em búfalos no Brasil. 1) Estudos de ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* foram realizados nos estados de São Paulo e Pará; 2) A produção de anticorpos anti-*N. caninum* foi estudada em búfalos jovens experimentalmente infectados; 3) Acompanhamento do perfil sorológico de fêmeas bubalinas e seus bezerros logo após o nascimento; 4) Isolamento do agente de búfalos adultos naturalmente infectados; 5) Identificação do *N. caninum* de fetos obtidos de fêmeas bubalinas sacrificadas em abatedouros.

Anticorpos anti-*N. caninum* foram pesquisados no soro de 222 fêmeas de búfalos do Vale do Ribeira, no Estado de São Paulo, usando Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação de Aglutinação Modificada (NAT). Na RIFI anticorpos foram encontrados em 64% dos animais com título de 25 (42 animais), 50 (53), 100 (31), 200 (10), 400 (3) e ≥ 800 (3) e no NAT em 53% das búfalas, com título 40 (52 animais), 80 (27), 160 (21) e ≥ 320 (17).

Anticorpos anti-*N. caninum* foram determinados no soro de 196 búfalos de três fazendas do Pará, usando RIFI. Anticorpos foram encontrados em 139 (70,9%) búfalos. Sendo títulos ≥ 25 a < 200 em 41 animais, ≥ 200 a 800 em 35 animais e ≥ 800 em 63 animais. O número de animais apresentando título ≥ 800 foi estatisticamente mais alto ($P < 0,05$). Todas as fazendas apresentaram animais soropositivos, entretanto a ocorrência foi maior ($P < 0,05$) na fazenda 1 (87,2%) quando comparado com a fazenda 2 (65,7%) e fazenda 3 (65,8%).

Seis búfalos foram inoculados pela via subcutânea com 5×10^6 taquizoítos da cepa Nc-Illinois de *N. caninum* e dois animais permaneceram como controles não inoculados. Amostras de sangue foram coletadas semanalmente durante oito semanas e então mensalmente até um ano pós-inoculação (p.i.) e a cinética da resposta imune humoral foi acompanhada pela RIFI, considerando como positivos títulos ≥ 25 . Nenhum dos búfalos inoculados com o parasita apresentou alteração na temperatura retal quando comparado com os animais do grupo controle. Todos os búfalos inoculados apresentaram título de anticorpos anti-*N. caninum* ≥ 100 na RIFI entre os dias sete e 11 p.i., e seus títulos permaneceram elevados até sete semanas p.i. Os picos de anticorpos ocorreram entre a semana oito p.i., atingindo valores de 1600 em um, 800 em três e 400 em dois búfalos. Os títulos de anticorpos decaíram para 25 e 50 em todos os seis búfalos aos 12 meses p.i. Nos dois controles não inoculados, títulos de anticorpos não foram detectados (≤ 25) na RIFI.

Soro de 29 fêmeas bubalinas e seus bezerros com idade de um a dois dias foram coletados e testados quanto à presença de anticorpos anti-*N. caninum*. Desses 29 bezerros, 23 foram positivos na primeira colheita e 17 permaneceram positivos durante todo o período de acompanhamento. Os outros seis animais tornaram-se soronegativos aos quatro (dois bezerros), seis (um bezerro), sete (dois bezerros) e oito (um bezerro) meses de vida.

Cérebros de seis búfalos naturalmente infectados foram colhidos e utilizados para o isolamento do parasita através das técnicas de bioensaio em cães, bioensaio em cultivo celular e bioensaio em gerbils. O material positivo foi analisado pela Reação em Cadeia pela Polimerase

(PCR) para confirmar-se a identidade do parasita. O cérebro do búfalo 403 foi positivo no bioensaio em cães (NcBrBuf 1), do búfalo 406 foi positivo no bioensaio em cães e células (NcBrBuf 2), dos búfalos 410 e 419 no bioensaio em gerbils (NcBrBuf 3 e 5) e o búfalo 412 foi positivo no bioensaio em cães, cultivo celular e gerbils (NcBrBuf 4). A identidade do parasita foi confirmada por métodos moleculares e biológicos. Os isolados não foram patogênicos a gerbils. As sequências do gene Nc5 e do fragmento ITS-1 foram analisadas e mostraram-se idênticas entre elas e bastante similares às seqüências de outros isolados. Oocistos obtidos dos cães que receberam o cérebro dos búfalos naturalmente infectados foram administrados a um bezerro bovino, pela via oral e este animal soroconverteu (RIFI \geq 25) duas semanas pós-inoculação.

Amostras obtidas de cérebro e fluído torácico de nove fetos com idade gestacional variando de dois a nove meses foram colhidos. O cérebro de um dos fetos foi positivo no PCR, para o gene Nc5 específico para o *Neospora*, e para a região ITS-1. Os produtos foram seqüenciados e confirmaram a identidade do parasita como *N. caninum*. Todos os fluídos fetais examinados pela RIFI foram negativos quanto a presença de anticorpos anti-*N. caninum*.

Os resultados dos estudos realizados geraram informações relevantes sobre *N. caninum* na espécie bubalina no Brasil. Anticorpos anti-*N. caninum* foram detectados em fêmeas de dois estados brasileiros em grande número dos animais avaliados^{5,6}. Búfalos se infectam experimentalmente com cepa de *N. caninum* de origem bovina, soroconvertendo contra esse agente, porém os títulos permanecem altos por um período menor do que o relatado em bovinos⁴.

Os achados do estudo realizado entre mães e filhos sugerem uma alta taxa de transmissão vertical em búfalos além de um período médio de sete meses de duração de anticorpos colostrais no soro dos bezerros bubalinos, uma média um pouco maior do que a encontrada em bezerros bovinos, que está ao redor de seis meses⁷. A transmissão vertical do agente pôde ser confirmada com a detecção do parasita em um feto bubalino.

Os resultados obtidos com os isolamentos do *N. caninum* de búfalos naturalmente infectados indicam grande semelhança genética do parasita encontrado em búfalos com aqueles descritos de isolados provenientes de bovinos e cães, além de demonstrar que a associação de técnicas foi mais eficaz no isolamento do agente, e confirmar a participação dos búfalos como hospedeiros intermediários do *N. caninum*. O isolado proveniente de búfalos foi capaz de infectar bovino⁸.

Bibliografia

- 1 - DUBEY, J. P.; ROMAND, S.; HILALI, M.; KWOK, O. H.; THULLIES, P. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Egypt. **Int. J. Parasitol.**, v. 28, n. 3, p. 527-529, 1998.
- 2 - GUARINO, A.; FUSCO, G.; SAVINI, G.; FRANCESCO, G.; CRINGOLI, G. Neosporosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. **Vet. Parasitol.** v. 91, n. 1-2, p.15-21, 2000.
- 3 - HUONG, L. T.; LJUNGSTROM, L.; UGGLA, A.; BJORKMAN, C. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes in southern Vietnam. **Vet. Parasitol.** v.75, n. 1, p. 53-57, 1998.
- 4 - MALEY, T.; BUXTON, D.; THOMSON, M.; SCHRIEFER, C. S.; INNES, E. A. Serological analysis of calves experimentally infected with *Neospora caninum*: 1-year study. **Vet. Parasitol**, v. 96, n. 1, p.1-9, 2001.
- 5 - FUJII, T. U.; KASAI, N.; NISHI, S. M.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Seroprevalence of *Neospora caninum* in female water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from southeast region of Brazil. **Vet. Parasitol**, v.99, n.4, p.331-334, 2001.
- 6 - GENNARI, S. M.; RODRIGUES, A. A. R., VIANA, R. B.; CARDOSO, E. C. Occurrence of antibodies anti-*Neospora caninum* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from North region of Brazil. **Vet. Parasitol**, (no prelo).
- 7 - RODRIGUES, A. A. R.; GENNARI, S. M.; PAULA, V. S. O.; AGUIAR, D. M.; FUJII, T. U.; STARKE-BUZETI, W.; MACHADO, R. Z.; DUBEY, J. P. Serological response to *Neospora caninum* in experimentally and naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Vet. Parasitol.**, v. 129, n.1-2, p.21-24, 2005.
- 8 - RODRIGUES, A. A. R.; GENNARI, S. M.; AGUIAR, D. M.; SREEKUMAR, C., HILL, D. E.; MISKA, K. B.; VIANNA, M. C. B.; DUBEY, J. P. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by

dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.124, p.139-150, 2004.

(2)

Aborto bovino por *Neospora caninum*: fatores associados ao resultado positivo da imunoistoquímica

Caroline Argenta Pescador, Luís Gustavo Corbellini, André Corrêa, Milene Schmitz, Djeison Lutier Raymundo, David Driemeier

Setor de Patologia Veterinária. Faculdade de Veterinária, UFRGS, Cx Postal 15094, CEP 91540-000 Porto Alegre – RS.

e-mail: carolpescador@yahoo.com.br

Neospora caninum é um protozoário pertencente ao Filo Apicomplexa e considerado um dos principais agentes etiológicos de aborto em bovinos. O diagnóstico pode ser realizado através da análise histopatológica de diversos órgãos e confirmado pela imunoistoquímica (IHQ). A presença de lesões caracterizadas por encefalite multifocal necrosante associada a infiltrados não supurativos em vários órgãos são forte indicativo de neosporose em fetos bovinos. Porém, estudos realizados no Setor de Patologia Veterinária (SPV)/UFRGS tem observado que grande parte do cérebro dos fetos bovinos enviados para análise apresentam uma consistência líquida, dificultando a obtenção de fragmentos de cérebro para a análise histopatológica. Adicionalmente, lesões histopatológicas sugestivas de infecção por protozoário, vêm sendo constantemente observadas em fragmentos de músculo esquelético, coração, pulmão, fígado e rim dos fetos bovinos abortados. Isso gerou a necessidade de avaliar metodologias de diagnóstico patológico na tentativa de observar lesões distintas em outros órgãos que auxiliassem no diagnóstico presuntivo de neosporose na ausência do cérebro. O objetivo do presente estudo foi verificar os fatores associados ao resultado positivo para *N. caninum* na imunoistoquímica e avaliar a frequência e características das lesões sugestivas de infecção por protozoário em diversos tecidos de fetos bovinos abortados.

Um total de 237 fetos bovinos abortados foram enviados ao SPV da UFRGS entre junho de 1999 e maio de 2004. Os fetos foram necropsiados e fragmentos de pulmão, coração, fígado, rim, músculo esquelético e todo o cérebro foram fixados em formalina tamponada a 10%, e processados por técnicas histológicas convencionais. Os casos que apresentavam lesões necrosantes e infiltrados inflamatórios não supurativos sugestivos de infecção por protozoário foram selecionados e analisados por critérios padronizados. O exame imunoistoquímico foi realizado em apenas um corte por órgão de cada caso utilizando um anticorpo policlonal anti-*N. caninum* comercial na diluição de 1:1000. A técnica empregada foi biotina-streptavidina – peroxidase, utilizando cromógeno DAB. Dados relacionados a idade dos fetos, autólise, incluindo consistência do cérebro (líquida/normal-pastosa), lesões histológicas compatíveis com infecção por protozoário em diversos órgãos foram registrados e categorizados. A associação entre o resultado da IHQ (positivo/negativo) por caso analisado e fatores observados na macroscopia e microscopia dos fetos necropsiados foi verificada através da regressão logística multivariada utilizando um programa SAS para Windows. De junho de 1999 a maio de 2004, 237 fetos bovinos abortados foram analisados. Destes, 72 apresentaram lesões histológicas sugestivas de infecção por protozoário, caracterizadas pela presença de miosite não-supurativa (66/70), miocardite não-supurativa (53/69), pneumonia intersticial mononuclear com focos de necrose (48/68) e encefalite não-supurativa multifocal (45/67). O cérebro apresentava consistência líquida em 61,1% dos fetos, dificultando a obtenção de tecido para a análise histológica e IHQ. A IHQ revelou a presença de taquizoítos e raros cistos de *N. caninum* no cérebro de 55,2% (37/67), fígado 9% (6/66), rim 9% (9/66), músculo esquelético 8,5% (3/70), pulmão 4,4% (3/68) e coração 4,3% (3/69) dos fetos que apresentaram lesões histológicas sugestivas de infecção por protozoário. No modelo final da análise multivariada, três variáveis estiveram associadas significativamente com resultado positivo na IHQ nos fetos abortados: consistência do cérebro ($P=0,031$; OR= 4,35; 95% CI:1,1320-2,8116), presença de lesão no

cérebro ($P=0,028$; OR= 4,94; 95%CI: 0,1646-3,0313) e idade ($P=0,189$; OR= 0,41, 95% CI: 1,5982-0,1436).

Os resultados apontados sugerem que a neosporose é uma importante causa de abortos em rebanhos bovinos do Estado do Rio Grande do Sul. A maior parte dos fetos 55,2% (37/67) com resultado positivo na IHQ, apresentaram lesões no cérebro, indicando que este tipo de lesão é altamente sugestiva de infecção por *N. caninum*, fazendo deste tecido o melhor órgão para a realização do teste de IHQ. A presença de consistência líquida do cérebro tornou difícil a observação de lesões histológicas compatíveis com infecção por *N. caninum*. Na grande maioria dos casos, o músculo esquelético, coração e pulmão foram os órgãos que mais apresentaram lesões histológicas inflamatórias sugestivas de protozoário. Entretanto, quando estes órgãos foram submetidos ao teste de IHQ obtiveram resultado negativo, indicando um diagnóstico falso-negativo. Fetos jovens apresentam uma maior probabilidade de conter protozoários visíveis e lesões menos severas devido ao seu incompleto desenvolvimento imunológico, causando assim destruição do neurópilo com pouca reação inflamatória. Diante disso, esforços para a coleta de cérebro devem ser estimuladas por patologistas e médicos veterinários a campo para aumentar o sucesso de diagnóstico definitivo de neosporose através do exame de IHQ.

(3)

Kinetics of TCD4⁺ and TCD8⁺ lymphocyte populations in dogs experimentally infected with *Neospora caninum*

Tiago W.P. Mineo*, Rosângela Z. Machado

Departamento de Patologia Veterinária, FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP. 14.884-900

* Email: tmineo@fcav.unesp.br

Neospora caninum is a cyst-forming protozoan parasite that infects many warm blooded animals, intermediate hosts of the parasite. However, only dogs and coyotes have been demonstrated to shed oocysts in their feces, being characterized as definitive hosts. Studies about the host-parasite relationship have been made mostly in the intermediate hosts, such as bovines and mice, indicating that the host's resistance to infection is dependent on T CD4+ lymphocyte subsets and IFN γ production. Therefore, this work aimed to establish the kinetics of canine blood derived TCD4+ and TCD8+ lymphocyte subset populations, during experimental infection with *N. caninum*. Four dogs were divided in two groups: Group 1 (G1) – 2 one year old dogs; Group 2 (G2) – 2 two month old puppies; All animals were fed with central nervous system and muscular tissues of a calf experimentally infected with high doses of *N. caninum* NC-1 isolate (First inoculum = 5×10^8 culture derived tachyzoites, through the jugular vein; second inoculum = 5×10^6 tachyzoites, intra-dermal administration). A flow cytometry protocol using whole blood was followed, for the CD4(FITC)/CD8(PE) labeling of the desired lymphocytes. Sample specific labeling was accompanied by the addition of negative isotope controls. Normal values were obtained from repeated assays in normal dogs with different ages. These data were divided into puppy and adult categories, where the mean percentage of TCD4+ and TCD8+ cells was calculated for each. A standard deviation value was also calculated, and added above and below the mean values, creating a 'normal' range. G1 dogs remained within the normal percentage range of TCD4+, TCD8+ cells and CD4/CD8 ratio during most of the experimental period, even though presenting a higher percentage of TCD8+ cells when compared to G2 ($p < 0,05$). G2 puppies presented normal TCD8+ cell percentages, but demonstrated very high CD4 levels and CD4/CD8 ratio since the first days post-infection, being those statistically higher than G1 ($p < 0,05$). To know, it is possible to affirm that dogs with different ages present distinct blood lymphocyte pattern when challenged by *N. caninum*, which could be related to susceptibility/resistance to the infection.

(4)

Possible role of bovine trophoblast giant cells in the vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle

Rosângela Z. Machado^{a*}, T.W.P. Mineo^a, L.P. Landim Jr^{a,b}, A.F. Carvalho^c, C. Pfarrer^d,
S.M. Gennari^b, A.A.R. Rodrigues^b, M.A. Miglino^b

^aDepartamento de Patologia Veterinária, FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP, 14.884-900, *E-mail: zacarias@fcav.unesp.br; ^bFMVZ-Universidade de São Paulo, SP; ^cUNIFEOB, São João da Boa Vista, SP; ^dDept. of Obstetrics and Gynecology, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany.

Neospora caninum is an apicomplexan parasite that has brought several concerns to cattle raisers due to its relationship to fetal loss in *Bos taurus* and *Bos indicus* breeding. However, the precise mechanism of the parasite's vertical transmission and induced abortions are not completely understood. The bovine trophoblast giant cells (TGC) play a major role in the maternal-fetal interactions. These cells migrate during the entire pregnancy period, from the chorionic connections to uterine epithelium. This study aimed to investigate the possible role of TGC as phagocytic cells and consequently their participation in the bovine vertical transmission cycle of *N. caninum*. The TGC were isolated by discontinuous Percoll gradient at 1043 and 1060 g/ml in DMEM medium supplemented with 10% bovine fetal serum, and characterized with Hoechst 33342 staining specific to the nucleus. Isolated TGC were cultured in the same medium described above, and infected with 10⁴ tachyzoites of *N. caninum* NC-1 strain. Slides with smears of culture derived normal and infected TGC were stained by Giemsa technique. Multiplication of parasites took place in 2-3 day cycles. Healthy cows' placenta and normal and infected cultured TGC were immunostained with monoclonal antibodies MAC-387, against TGC, and anti-iNOS demonstrating their phagocyte capacity against the parasite. Thus, TGC were characterized as cells with macrophagic activity, which may host *N. caninum in vitro*. Therefore, we may conclude that TGC could potentially participate in the vertical transmission (from mother to fetus) of the bovine neosporosis.

(5)

Clonagem e expressão da porção C-terminal do antígeno de superfície NC-43 de *Neospora caninum* e sua identidade com anticorpos de bovinos no estado de Mato Grosso do Sul

Andreotti, R.¹; Paiva, F.²; Lima-Junior, M.S.C.¹; Caetano, A.³ & Matos, M.F.C.²

1 - Embrapa Gado de Corte, BR 262 km 04, Caixa Postal 154, CEP 79002-970
Campo Grande – MS, Email:andreott@cnpqc.embrapa.br

2 - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

3 – Embrapa Cenargen

A neosporose em bovinos é uma doença causada pelo protozoário *Neospora caninum*, identificado pela primeira vez em 1988, em cães com encefalomielite, seu hospedeiro definitivo. Estudos sorológicos de vários países demonstraram o parasita como a maior causa de abortos em rebanhos leiteiros. A doença está amplamente disseminada nos diferentes continentes. No Brasil, a *N. caninum* tem sido notificada em diferentes Estados, indicando que a neosporose possui ampla distribuição geográfica, independente das diferenças ecofisiográficas. No Estado

de Mato Grosso do Sul, exames sorológicos em amostras de sangue de vacas criadas no planalto, sem e com histórico de aborto, revelaram prevalências de 7,7 (91/7) e 43 % (90/38), respectivamente. Na região pantaneira, exames sorológicos de sangue colhidos em novilhas apresentaram prevalência de 30% (60/18) para *N. caninum*. A importância econômica da neosporose bovina é atribuída principalmente aos custos associados ao aborto, ao valor dos fetos, a inseminação artificial ou a cobertura, a diminuição da produção de leite, ao aumento do descarte e a reposição dos animais. As perdas indiretas estão relacionadas com o estabelecimento do diagnóstico, falhas na estação de reprodução, aumento do período de lactação, possível perda na produção de leite e possíveis perdas por descarte de vacas positivas.

Em bovinos os dois mecanismos de infecção por *N. caninum* são a transferência do parasita da mãe para o feto (transmissão vertical ou infecção congênita) e a ingestão de oocistos esporulados (transmissão horizontal ou infecção pós natal). O diagnóstico depende de uma combinação entre o histórico do rebanho, sinais clínicos e dados de laboratório. A sorologia é utilizada como método diagnóstico nos estudos epidemiológicos de abortos devido ao *N. caninum*. O sorodiagnóstico é importante para avaliar a exposição e o risco de infecção por *N. caninum* de um rebanho. No entanto, o custo do diagnóstico sorológico no Brasil ainda é um fator limitante para uma melhor avaliação e manejo adequado dessa enfermidade.

O gene da proteína Nc-p43 foi clonado e sua expressão foi avaliada na sua capacidade antigênica em teste de ELISA, mostrando um resultado com alta especificidade e sensibilidade. Este trabalho teve como objetivo, a partir do Cultivo *in vitro* de tachizoítos de *N. caninum* para obtenção do DNA genômico, amplificar o segmento de DNA da região C-terminal da proteína usando primers específicos pré-estabelecidos, clonagem parcial do gene, realizar a expressão e purificação da proteína recombinante e avaliá-la com relação a sua identidade antigênica frente a soros de animais positivos do estado de Mato Grosso do Sul.

A partir de células Vero infectadas com tachizoítos de *N. caninum*, foi realizada a extração de DNA genômico para a realização da amplificação da região de interesse por reação de polimerase em cadeia - PCR usando primers específicos. Eletroforese em gel de agarose a 1% foi realizada para identificar e avaliar o produto amplificado. A clonagem e expressão foram realizadas em sistema de expressão direcionado pET100 (Invitrogen). As colônias de *E. coli* transformadas foram selecionadas em meio com ampicilina e a produção foi realizada em meio LB líquido. O segmento clonado foi seqüenciado em sistema Mega Base (Pharmacia) para a confirmação do inserto. A proteína recombinante foi purificada por meio de cromatografia, usando coluna de afinidade de níquel em sistema de cromatografia AKTA (Pharmacia). A proteína purificada apresentou um rendimento de 1,7 mg por litro de cultura de *E. coli* produzida. A proteína recombinante apresentou um peso molecular em torno de 28k em eletroforese SDS-PAGE 12% e reconheceu soro de animais positivos em sistema de immunoblotting.

Com base nesses resultados pretende-se avaliar a proteína recombinante da região C-terminal da proteína NC-p43 em ensaios imunoenzimáticos para avaliar a sua sensibilidade e especificidade como antígeno.

(6)

Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients infected by HIV or with neurological disorders

J Lobato,¹ DAO Silva,¹ TWP Mineo,² JDHF Amaral,¹ GR Silva Segundo,¹ JM Costa-Cruz,³ MS Ferreira,⁴ AS Borges,⁴ JR Mineo^{1*} E-mail: jrmineo@ufu.br

Laboratory of Immunoparasitology,¹ Laboratory of Parasitology³ and Section of Infectious Diseases of Clinic Hospital,⁴ Federal University of Uberlândia, , Campus Umuarama, Uberlândia, MG; Laboratory of Immunoparasitology², FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP.

Considering that little is known about the epidemiology of *Neospora caninum* infection in humans, particularly in populations with high *T. gondii* infection rates, the present study aimed to investigate the presence of antibodies to *N. caninum* in *Toxoplasma*-seropositive and -seronegative individuals. A total of 256 serum samples divided into 4 groups (61 HIV-positive patients, 50 patients with neurological disorders, 91 newborns, and 54 healthy subjects) were assessed for *N. caninum* and *T. gondii* serology by indirect fluorescent antibody test (IFAT), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblot (IB). IgG antibodies to *N. caninum* were predominantly detected in HIV-patients (38%) and patients with neurological disorders (18%), while newborns and healthy subjects showed the lowest seropositivity rate (5% and 6%, respectively). Seropositivity to *N. caninum* was significantly associated with seropositivity to *T. gondii* in the two first groups. Seroreactivity to *N. caninum* was confirmed by IB with positive sera recognizing predominantly the 29 kDa antigen of *N. caninum*. The results of this study indicate the presence of *N. caninum* exposure or infection in humans, particularly in HIV patients or with neurological disorders, who could have opportunistic and concurrent infections with *T. gondii*. These findings may bring a new concern for the unstable clinical health of HIV patients and the actual role of *N. caninum* infection in human immunocompromised patients.

(7)

Experimental infection of pigeons (*Columbia livia*) by *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*

T.W.P. Mineo*, J.A. Marciano, A.O.T. Carrasco, K. Werther, A.A. Pinto, R.Z. Machado

Departamento de Patologia Veterinária, FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP. 14.884-900

* Email: tmineo@fcav.unesp.br

Neospora caninum and *Toxoplasma gondii* are protozoan parasites that present similar biologic and morphological features. However, with distinct pathogenic effects and antigen patterns. Both are able to infect a wide range of hosts, demonstrating their ability to spread through the environment. Pigeons (*Columbia livia*), which lack natural predators in Brazil, are considered hazardous to public and animal health since they may serve as reservoirs of varied infectious agents. This work aimed to evaluate *N. caninum* and *T. gondii* infections in pigeons. Four pigeons were inoculated with 1×10^7 *T. gondii* RH strain tachyzoites derived from Swiss-Webster mice peritoneal exsudate (Group 1), while 4 other animals were infected with 1×10^7 culture derived tachyzoites of *N. caninum*'s NC-1 (Group 2). Specific IgG antibodies to *N. caninum* and *T. gondii* were detected by indirect immunofluorescence technique. Group 1 animals demonstrated serological response to *T. gondii* after 5 days post-infection (dpi), reaching maximum IgG titers at 10 dpi (1:10240). Histopathological and immunohistochemistry analysis (IHQ) of formalin-fixed tissues demonstrated a highly parasitized central nervous system of a pigeon that died from acute toxoplasmosis. Parasites were also found in pancreas, duodenum, cardiac muscle, lungs, kidney, liver and proventriculus, followed by mononuclear inflammatory infiltrates. Group 2 pigeons also seroconverted and presented IgG peak at 5 and 10 dpi, respectively, however with lower titers, negative-prone at the end of the experimental period. *N. caninum* was shown by IHQ in the heart, SNC, kidney, spleen and liver, although in very small quantities found in 2 birds that deceased during the experiment. We can conclude from the data herein presented that pigeons may be a useful experimental model of *N. caninum* and *T. gondii* infections, even though other studies are necessary to elucidate the parasites' role in free ranging birds.

Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em animais silvestres brasileiros

Lúcia E. O. Yai¹, William A. Cañón-Franco², Júlia C. H. Tiemann², J. P. Dubey³, José M. B. Duarte⁴, Sílvio L. P. de Souza², Vilma C. Geraldi⁵, Celso E. Souza⁶, Nara A. R. Farias⁷, Jerônimo Ruas⁷, Solange M. Gennari²

¹ Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores, Prefeitura do Município de São Paulo, SP. Email: oishiyai@yahoo.com

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, SP

³ United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Animal and Natural Resources Institute, Animal Parasitic Diseases Laboratory, Beltsville, MD, USA

⁴ Departamento de Zootecnia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP

⁵ Divisão Técnica de Medicina Veterinária e Manejo da Fauna Silvestre, Prefeitura do Município de São Paulo, SP.

⁶ Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo, SP.

⁷ Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, RS

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Em 1984, *Neospora caninum*, um parasita coccídeo pertencente ao phylum Apicomplexa, família Sarcocystidae, foi primeiramente observado em cães na Noruega (Bjerkas et al., 1984) e alguns anos mais tarde foi descrito como um novo gênero e espécie (Dubey et al., 1988). Desde então *N. caninum* vem sendo relatado em todo o mundo infectando animais domésticos e silvestres (Dubey, 2003). O presente trabalho descreve a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em diferentes espécies de animais silvestres do Brasil, criados em cativeiro e de vida livre e faz algumas considerações epidemiológicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de soros de animais silvestres foram analisadas quanto à presença de anticorpos anti-*N. caninum* pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). Dentre os animais analisados foram contemplados canídeos (Cañón-Franco et al., 2004), marsupiais (Yai et al., 2003), roedores e cervídeos (Tiemann et al., 2005; no prelo).

Os canídeos estudados eram todos de vida livre, sendo 12 *Lycalopex gymnocercus* (graxaim do campo), 30 *Dusicyon vetulus* (raposa do campo) e 15 *Cerdocyon thous* (cachorro do mato). Dos marsupiais foram examinadas amostras de soros de 396 gambás de orelha preta (*Didelphis marsupialis*) e dentre os roedores 149 capivaras (*Hicrochaeris hidrochaeris*), sendo as amostras destas duas espécies também colhidas de animais de vida livre.

Dos cervídeos dois estudos foram realizados, um com 150 animais de 31 cativeiros e 16 zoológicos (Tiemann et al., 2005), do gênero *Mazama* (*M. gouazoubira*, *M. nana*, *M. americana*, *M. rondoni*, *M. bororo*). O outro estudo foi realizado com veados campeiros (*Ozotoceros bezoarticus*) capturados de dois ambientes distintos, Parque Nacional de Emas, em Goiás (23 animais), ambiente onde animais domésticos são raramente observados e Pantanal, Mato Grosso (16 animais), onde os cervídeos convivem muito próximos aos animais domésticos e ao homem. Os valores de ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* entre os animais dos dois ecossistemas foram analisadas pelo teste de comparação de duas proporções (Tiemann et al., no prelo).

RESULTADOS E CONCLUSÃO

A Tabela 1 apresenta os valores de ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em diferentes espécies de animais silvestres brasileiros, bem como suas procedências e técnicas diagnósticas utilizadas.

Tabela 1 – Ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em diferentes espécies de animais silvestres brasileiros, origem e método diagnóstico utilizado.

Espécie	Examinados	Positivos (%)	Origem	Método
Canídeos	57	9 (15,8)		RIFI (≥ 50)
<i>L. gymnocercus</i> (L)	12	5 (41,7)	RS	
<i>C. thous</i> (L)	15	4 (26,7)	SP, PR	
<i>D. vetulus</i> (L)	30	0 (0,0)	PB	
Marsupiais (gambás)				
<i>D. marsupialis</i> (L)	396	84 (21,2)	SP	RIFI (≥ 25)
Roedores (capivaras)				
<i>H. hydrochaeris</i> (L)	149	13 (8,7)	SP	RIFI (≥ 25)
Cervídeos				
<i>Mazama</i> spp (C)	150	63 (42,0)	AC, AL, AM, BA, GO, MT, MG, PA, PR, RN, RS, RJ, RO, SC, SP	RIFI (≥ 50)
<i>O. bezoarticus</i> (L)	39	15 (38,5)		RIFI (≥ 50)
	23	3 (13,0)	GO (Pq. N. de Emas)	
	16	12 (75,0)	MT (Pantanal)	

(L) – vida livre; (C) - cativo

Das espécies de canídeos examinadas, somente animais do gênero *D. vetulus*, do estado da Paraíba não se apresentaram positivos ao *N. caninum*. Uma vez que este agente já foi isolado de canídeos silvestres (coiotes) nos EUA (Gondim et al, 2004), há possibilidades que outros canídeos também sejam hospedeiros definitivos.

Gambás e capivaras de vida livre também se apresentaram positivos à presença de anticorpos anti-*N.caninum*, sendo mais um forte indício de um ciclo silvestre do agente em nosso meio.

Nos cervídeos altos valores de ocorrência foram observados em animais de cativeiro. Quanto aos veados de vida livre, comparando-se os valores de ocorrência entre os animais dos dois ecossistemas, menor valor ($p < 0,001$) foi observado no Parque Nacional de Emas, local onde animais domésticos são menos freqüentes que no Pantanal, sugerindo a importância dos animais domésticos na ocorrência da infecção desses cervídeos.

Estudos devem ser conduzidos para se isolar o agente de cervídeos neotropicais e confirmar a via de transmissão do *N. caninum* nessa espécie, bem como entre os animais silvestres brasileiros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bjerkas, I.; Moh, S. F., Presthus, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Z. Parasitenk**, v.70, p. 271-274, 1984.
 Cañón-Franco, W. A.; YAI, L. E. O.; Souza, S. L. P.; Santos, L. C.; Farias, N. A. R.; Ruas, J.; Rossi, F. W., Gomes, A. A. B.; Dubey, J, P.; Gennari, S. M. Detection of antibodies to

- Neospora caninum* in two species of wild canids *Lycalopex gymnocercus* and *Cerdocyon thous* from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.123, n.3-4, p.275-277, 2004.
- Dubey, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Korean Journal of Parasitology**, v.41, n.1, p.1-16, 2003.
- Dubey, J. P.; Carpenter, J. L.; Speer, C. A.; Topper, M. J.; Uggla, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v.192, p. 1269-1285, 1988.
- Gondim, L. F. P., McAllister, M. M., Pitt, W. C., Zemlicka, D. E., Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.34, p.159-161, 2004.
- Tiemann, J. C. H.; Rodrigues, A. A. R.; Souza, S. L. P., Duarte, J. M. B.; Gennari, S. M. Occurrence of anti *Neospora caninum* antibodies in Brazilian cervids kept in captivity. **Veterinary Parasitology**, v.129, n.3-4, p.341-343, 2005.
- Tiemann, J. C. H.; Souza, S. L. P., Rodrigues, A. A. R.; Duarte, J. M. B.; Gennari, S. M. Environmental effect on the occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in pampas-deer (*Ozotoceros bezoarticus*). **Veterinary Parasitology**, no prelo.
- Yai, L. E. O., Cañón-Franco, W. A., Geraldi, V. C., Summa, M. E. L., Camargo, M. C. G. O., Dubey, J. P., Gennari, S. M. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) from the city of São Paulo, Brazil. **Journal of Parasitology**, v.89, n.4, p.870-871, 2003.

(9)

Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora* spp em equinos de diferentes Estados brasileiros

Jessica S. Hoane¹, Solange M. Gennari², Jitender P. Dubey³, Márcio G. Ribeiro⁴, Alexandre S. Borges⁴, Lúcia E. O. Yai⁵, Daniel M. Aguiar², Guacyara T. Cavalcante², Gérson L. Bonesi⁶, Daniel K. Howe¹

¹Department of Veterinary Science, Kentucky University, 108 Gluck Equine Research Center, Lexington, Kentucky, 40546-0099, USA

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP. São Paulo, SP

³United States Department of Agriculture, ARS, Animal and Natural Resources Institute, Animal Parasitic Disease Laboratory, Beltsville, MD 20705-2350, USA

⁴Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, SP.

⁵Centro de Controle de Zoonoses, Prefeitura Municipal de São Paulo, SP.

⁶Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Delegacia Federal do Paraná.

Introdução e Objetivos

A Mieloencefalite Protozoária Equina (MPE) é uma doença neurológica debilitante de equinos causada pelos protozoários *Sarcocysts neurona* e *Neospora hughesi* (Dubey et al., 2001; Marsh et al., 1998). O hospedeiro definitivo do *N. hughesi* ainda não está definido, assim não se sabe como os equinos se expõem a este parasita. Adicionalmente também não está claro como os equinos se infectam pelo *N. caninum*, mesmo conhecendo seu hospedeiro definitivo, no caso cães e coiotes (McAllister et al., 1998; Gondim et al., 2004). Recentemente um grande estudo soropidemiológico demonstrou que a infecção por *Neospora* spp na América do Norte é incomum entre os equinos (Hoane et al., 2005). Dubey et al. (1999a) no Brasil e na Argentina (Dubey et al., 1999b) realizaram um inquérito sorológico em equinos e não observaram reações sorológicas contra *N. caninum*, pelo teste de Aglutinação (NAT – *Neospora* Agglutination Test). Neste estudo os autores examinaram apenas soros de animais procedentes de locais com boas condições sanitárias como o jockey clube de São Paulo e a cavalaria do exército Argentino.

O presente estudo objetivou determinar a ocorrência de anticorpos anti-*Neospora* spp. em equinos de trabalho de diversos estados brasileiros.

Material e Métodos

Foram testados soros de 961 equinos procedentes de 10 estados brasileiros (Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Rondônia, Santa Catarina e São Paulo). As amostras foram obtidas de animais enviados a frigoríficos de equinos e de fazendas onde se explora a bovinocultura, nas quais os animais eram utilizados para trabalho. Os equinos eram de ambos os sexos e a maioria com idade superior a 10 anos. Para o diagnóstico foi utilizado um ensaio imunoenzimático (ELISA) preparado com antígenos de superfície (NhSAG1), com ponto de corte de 20 PP (porcentagem de positividade) conforme padronizado por Hoane et al. (2005).

Resultados

Do total de equinos analisados, determinou-se a ocorrência de 2,5% (24/961), baseados na detecção de anticorpos contra o antígeno de superfície (NhSAG1) de *N. hughesi*. A Tabela 1 sumariza os resultados por estado estudado.

Tabela 1. Ocorrência de anticorpos reagentes a antígenos de superfície NhSAG1 de *N. hughesi* por estado, São Paulo, SP. 2005

Estado	Nº equinos testados	Nº equinos positivos	%
Bahia	09	01	11,1
Goiás	15	0	0
Mato Grosso	28	0	0
Mato Grosso do sul	11	0	0
Minas Gerais	10	0	0
Paraná	146	5	3,4
Rio Grande do Sul	2	0	0
Rondônia	192	3	1,6
Santa Catarina	21	0	0
São Paulo	513	15	2,9
Total	961	24	2,5

Discussão e Conclusão

O presente trabalho relata a presença de anticorpos anti-NhSAG1 de *N. hughesi* em equinos de diversos estados brasileiros, em diferentes condições de manejo. Em estudo realizado em equinos procedentes do jockey clube de São Paulo e do exército Argentino, não foi detectada a presença de anticorpos anti-*Neospora* spp (Dubey et al., 1999a; Dubey et al., 1999b). Entretanto, neste estudo observou-se ocorrência de 2,5% (24/961), semelhante aos resultados encontrados em animais dos EUA, 3,4% de um total de 1917 equinos estudados (Hoane et al., 2005). Até o presente momento, os trabalhos de soroprevalência indicam que os equinos da América do Norte e do Sul são pouco infectados por *Neospora* spp. Ainda assim, mais informações são necessários para se esclarecer o papel do *N. caninum* e *N. hughesi* na epidemiologia dessa infecção em equinos.

Bibliografia

- Dubey, J.P.; Lindsay, D.S.; Saville, W.J.; Reed, S.M. et al. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Vet Parasitol.** v.95, p.89-131, 2001.
- Dubey, J.P.; Kerber, C.E.; Granstrom, D.E. Serologic prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses in Brazil. **J Am Vet Med Assoc**, v.215, p.970-972, 1999a.
- Dubey, J.P.; Venturini, M.C.; Venturini, L. Prevalence of antibodies *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses from Argentina. **Vet Parasitol**, v.86, p.59-62, 1999b.
- Marsh, A.E.; Barr, B.C.; Packham, A.E. et al. Description of a new *Neospora* specie (protozoa: Apicomplexa; Sarcocystidea). **J. Parasitol.** v.84, p.1575-1582.
- Gondim, L. F. P.; McAllister, M. M.; Pitt, W. C. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol**, v.34, n.2, p.159-161, 2004.
- Hoane, J. S.; Yeargan M.R.; Stamper, S. et al. Recombinant NhSAG1 ELISA: A sensitive and specific assay for detecting antibodies against *Neospora hughesi* in equine serum. **J Parasitol**, v.9, p.446-452, 2005.
- McAllister, M. M.; Dubey, J. P.; Lindsay, D. S. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol**, v.28, n.9, p.1473-1478, 1998.
-

(10)

Deteção de anticorpos anti-*Neospora sp.* em éguas e a correlação com a produção de potros no Paraná

Hoffmann, D.C.S.⁴; Dittrich, J.R.¹; Richartz, R.R.T.B.²; Gasino Joineau, M.E.¹; Antunes, J.¹; Pinckney, R.D.³; Deconto, I.¹; Thomaz-Soccol, V¹; Locatelli-Dittrich, R.¹

¹Universidade Federal do Paraná

²Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti

³St. George's University, School of Veterinary Medicine, Grenada, West Indies

⁴ Rua Hildebrando Dúlcio, 419. Bairro Bacacheri. Curitiba-Paraná

e-mail: dani_vet2000@yahoo.com.br

Em eqüinos a neosporose é causada pelos protozoários *Neospora caninum* e *Neospora hughesi*, que podem causar problemas reprodutivos e/ou neurológicos. Casos de neosporose clínica foram descritos em eqüinos da França e dos Estados Unidos. Na América do Sul não existem relatos de neosporose em eqüinos, contudo, os casos de abortos, doenças neonatais e problemas neurológicos são comuns nestes animais. Este trabalho visou determinar a prevalência de anticorpos anti-*Neospora sp.* em éguas e contribuir com a escassa literatura de neosporose em eqüinos. Neste estudo foram avaliadas amostras de soro de éguas provenientes de um haras da região metropolitana de Curitiba, entre os anos de 2003 e 2004. Foram utilizadas 36 éguas no período de setembro de 2003 e as mesmas 36 éguas em março de 2004. Em 2003 e 2004 foram registrados os nascimentos de 22 e 32 potros, respectivamente. A técnica utilizada para a detecção de anticorpos (IgG) para *Neospora sp* foi a Imunofluorescência Indireta (IFI), nas diluições 1:50 e 1:100. As lâminas de IFI foram preparadas com taquizoítas da cepa de referência NC-1, obtidos do cultivo *in vitro* e posteriormente fixados nas lâminas. Em 2003, foram detectados anticorpos para *Neospora sp* em 17 éguas (47%) na diluição 1:50 e em cinco éguas na diluição 1:100 (13, 8%). Em 2004, a prevalência de anticorpos foi de 30% (11/36) na diluição 1:50 e 16,6 % (6/36) na diluição 1:100. As 17 éguas soropositivas para *Neospora sp.* produziram nove potros em 2003, e as 19 soronegativas 13 potros. Em 2004, as 11 éguas soropositivas produziram 10 potros, e as 25 soronegativas, 22 potros. Neste haras não foram observadas diferenças significativas entre a produção de potros dos grupos de éguas soropositivas e soronegativas para *Neospora sp.* Estes resultados indicam que os eqüinos no Brasil, e mais especificamente, no Paraná, foram

expostos ao protozoário *Neospora sp* e que estudos adicionais são necessários para avaliar as consequências da neosporose eqüina.

(11)

Estudo de caso-controle para verificação de associação entre distúrbios reprodutivos em fêmeas da espécie eqüina e infecção por *Neospora sp*.

Eliana Monteforte Cassaro Villalobos¹, Elenice Maria Sequetin Cunha¹, Maria do Carmo Cústodio de Souza Hunold Lara¹, Solange Maria Gennari², Sílvio Luís Pereira de Souza², Tatiana Evelyn Hayama Ueno², Rodrigo Martins Soares²

1- Instituto Biológico, Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252 SP/SP CEP 04261-120, email villalobos@biologico.sp.gov.br, 2- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

O objetivo deste trabalho foi verificar a existência de associação entre a presença de anticorpos séricos anti-*Neospora spp.* e a apresentação de história recente de falhas reprodutivas em fêmeas da espécie eqüina. Foram analisadas 1000 amostras de soro de eqüinos pertencentes ao banco de soros do Laboratório de Raiva e Encefalites Virais do Instituto Biológico, sendo que 500 amostras eram de soros enviados com solicitação de diagnóstico de infecção por Herpesvírus Eqüino tipo 1 (HVE-1) e as outras 500, de soros encaminhados para sorodiagnóstico de Anemia Infecciosa Eqüina. As amostras foram recebidas pelo laboratório entre os anos de 2000 e 2005. As amostras destinadas ao diagnóstico sorológico de infecção por HVE-1, um vírus causador de abortamentos em fêmeas eqüinas, foram reunidas em um grupo denominado "grupo caso". Este grupo constituía-se de soros provenientes de 483 fêmeas que apresentavam história recente de distúrbios reprodutivos e de soros de 17 machos reprodutores provenientes de rebanhos nos quais havia casos clínicos de distúrbios reprodutivos em fêmeas contactantes. Como distúrbios reprodutivos foram considerados abortamentos no terço final da gestação ou mortalidade neonatal. As amostras destinadas ao diagnóstico sorológico de Anemia Infecciosa Eqüina (AIE) foram arroladas como "grupo controle", constituindo-se de soros de animais que necessitavam de sorodiagnóstico para fins de emissão de guia de trânsito animal para participação em eventos hípicas, feiras agropecuárias ou estação de monta. As amostras do grupo controle totalizaram 219 soros de fêmeas e 281 soros de machos. Nenhum animal do grupo controle apresentava sintoma clínico de qualquer natureza, condição atestada pela assistência médica – veterinária responsável por cada animal na ocasião da solicitação do exame. Para determinar a presença de anticorpos anti-*Neospora spp.*, foi empregada a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), sendo considerados positivos os soros que determinassem fluorescência quando diluídos na razão de 1:50. Para a sensibilização das lâminas utilizadas na RIFI foram empregados taquizoítos da amostra NC-1 de *Neospora caninum*. Os soros considerados reatores (título ≥ 50) em uma primeira série de testes foram posteriormente diluídos na base dois a partir da diluição 1:50 até a diluição 1:800, para que fosse realizada uma segunda série de testes para se conhecer a maior diluição que ainda gerasse sinal fluorescente (titulação dos soros). No grupo de animais com problemas reprodutivos, a frequência de animais positivos foi de 15,4% (77/500) enquanto no grupo de animais clinicamente sadios a frequência encontrada foi de 6,0% (30/500). Considerando apenas os resultados das fêmeas de ambos os grupos, entre os 483 animais do grupo "caso", 15,1% (73/483) eram sororeagentes, enquanto no grupo "controle", 5,5% (12/219) das éguas eram sororeagentes. A distribuição de títulos nas fêmeas sororeagentes pertencentes ao grupo "caso" foi de 44 animais com título 50, 13 animais com título 100, seis animais com título 200, e 10 animais com título 400. No grupo "controle", sete fêmeas apresentaram título 50, dois animais com título 100, nenhum animal com 200 e três animais com título 400. Utilizando-se o teste χ^2 com nível de significância de 5%, foi possível detectar associação entre frequência de animais soropositivos e ocorrência recente de distúrbios

reprodutivos, tanto na análise de todos os animais, quanto na análise somente das fêmeas. O valor de "odds ratio" (OR) para associação entre doença e positividade pela RIFI para o grupo formado por todos os 1000 animais foi de 2,85 (IC95% = 1,86 |—| 4,37). O valor de OR para o grupo formado apenas pelas fêmeas foi de 3,01 (IC95% = 1,674|—| 5,636). É possível que os animais reatores tenham sido expostos a outros parasitos que tenham similaridade com o *N. caninum* em termos de repertório de antígenos de superfície como, por exemplo, o *N. hughesi*. Soros de animais reagentes para *N. hughesi* podem reagir com taquizoitos de *N. caninum* em provas sorológicas como a empregada neste estudo, pois ambas as espécies de *Neospora* são estreitamente relacionadas. Porém, as infecções por *N. hughesi* estão associadas a distúrbios neurológicos em equinos e não a problemas reprodutivos e, portanto é esperado que a frequência de ocorrência de anticorpos anti-*N.hughesi* nos grupos caso e controle devam ser equivalentes. A diferenciação entre a resposta sorológica para os dois agentes em tela somente será possível com a realização de testes que empreguem antígenos específicos de cada uma das espécies de coccídio ou testes que envolvam a participação de anticorpos monoclonais para a seleção de resposta a determinantes antigênicos diferenciais. Mesmo assim, a associação encontrada neste estudo sugere que a ocorrência de distúrbios reprodutivos em fêmeas equinas esteja associada à infecção por *N. caninum*, indicando que a possibilidade deste agente participar na gênese de abortamentos deva ser investigada.

(12)

Perdas na produção e custos no tratamento em rebanhos leiteiros canadense infectados com *Neospora caninum*

João Paulo A. Haddad¹, Ian R. Dohoo², John A. Vanleeuwen², Greg Keefe², Alfons Weersink³

1 – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. E-mail: jphaddad@vet.ufmg.br

2 - University of Prince Edward Island, Atlantic Veterinary College, Health Management Department.

3 - Agricultural Economics & Business, University of Guelph.

Objetivos

O objetivo deste estudo foi estimar a perda na produção devido a infecção por *Neospora caninum* na indústria canadense como um todo e para estimar os intervalos de possíveis perdas em rebanhos leiteiros individuais no Canadá. Estas duas estimativas nos permitirão avaliar o valor de perda por animal infectado, como também por rebanho infectado.

Material e métodos

Um modelo estocástico utilizando hipercubo latino como modelo de simulação e 10.000 interações foi elaborado. A base da informação utilizada foi de um orçamento parcial composto de três componentes, sendo estes componentes o impacto na produção de leite, o impacto no descarte prematuro de matrizes e o terceiro nas perdas associadas a custos de tratamento de animais que abortaram. O modelo levou em conta a variabilidade e incertezas em muitos dos parâmetros requeridos e conseqüentemente produziu distribuições probabilísticas das perdas estimadas.

Dos parâmetros utilizados foram usados como efeito fixo o tamanho médio do rebanho (100 para a primeira estimativa e 61 para a segunda), a produtividade das vacas por lactação por ano (9. 519 litros/ano) e o preço pago ao produtor por litro de leite (CAD\$ 0,59). Distribuições triangulares foram usadas nos seguintes parâmetros: custo de reposição de matrizes (mínimo CAD\$1.500,00; mais provável CAD\$2.000,00; máximo CAD\$2.500,00), valor de descarte de matriz (mínimo CAD\$300,00; mais provável CAD\$500,00; máximo CAD\$700,00),

valor de cria recém-nascida (mínimo CAD\$200,00; mais provável CAD\$400,00; máximo CAD\$600,00) e custo de medicação e visita veterinária (mínimo zero; mais provável CAD\$50,00; máximo CAD\$100,00). Distribuições normais foram utilizadas nos seguintes parâmetros: percentual na redução de produção de leite ($\mu = 0,5\%$, $\sigma = 0,2\%$), percentual no aumento de descarte de matrizes devido a infecção por *Neospora caninum* ($\mu = 3,45\%$ and $\sigma = 1,23\%$) e aumento no risco de aborto devido a infecção por *Neospora caninum* ($\mu = 18\%$, $\sigma = 10\%$). A Prevalência foi medida de duas formas, a primeira para a indústria leiteira como um todo, quando utilizou-se a prevalência no nível animal distribuída normalmente ($\mu = 11.9\%$, $\sigma = 0.92\%$), e a segunda para as perdas por rebanho médio infectado, quando utilizou-se a prevalência animal de dentro rebanho com uma distribuição beta ($\alpha=1.0004$, $\beta=5.33$).

O aumento do risco de aborto devido a infecção por *Neospora caninum* foi estimado usando meta-análise com efeitos aleatórios da literatura publicada. Existia uma grande variação entre os estudos. Se este parâmetro fosse determinado de forma mais precisa estimativas de perdas causadas por infecção de *Neospora caninum* poderiam ser mais acuradas.

Utilizou-se como análise de sensibilidade a variação de 10% para cima e para baixo de quatro parâmetros em cenários distintos, sendo os quatro parâmetros a prevalência, percentual na redução de produção de leite, percentual no aumento de descarte de matrizes devido a infecção por *Neospora caninum* e aumento no risco de aborto devido a infecção por *Neospora caninum*.

Resultados e Discussão

Para a indústria leiteira canadense a perda anual por animal atribuída a *Neospora caninum* foi estimada em aproximadamente CAD\$1.766,51 por 100 matrizes ou CAD\$18,00 por matriz infectada (95% Intervalo de confiança = \$6 a \$30 por matriz).

Para rebanhos, assumindo um tamanho médio do rebanho de 61 matrizes, foi estimado a perda de CAD\$1.426,11 por rebanho infectado, existindo ainda um intervalo bastante alto no intervalo de confiança para 95% (de CAD\$35 a CAD\$5.012) devido principalmente a influência da variação da prevalência animal dentro do rebanho.

Aproximadamente 50% das perdas econômicas para os fatores estudados foram atribuídas a abortos, e correspondentemente os dois fatores que mais influenciaram na análise de sensibilidade foram a prevalência e o impacto da infecção de *Neospora caninum* no risco de aborto.

Conclusão

A infecção por *Neospora caninum* é uma importante causa de perdas econômicas para a produção leiteira canadense.

(13)

Fatores de risco para soropositividade para *Neospora caninum* em vacas leiteiras canadenses

João Paulo A. Haddad¹, Ian, R. Dohoo², John A. Vanleeuwen², Greg Keefe², Morgan Scott³, Terry Whiting⁴

1 – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. E-mail: jphaddad@vet.ufmg.br

2 - University of Prince Edward Island, Atlantic Veterinary College, Health Management Department.

3 - Texas A&M University, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Department of Veterinary Integrative Biosciences.

4 - Manitoba Agriculture and Food, Winnipeg, Manitoba

Objetivos

O objetivo deste estudo foi determinar fatores de risco tanto no que se diz respeito a seropositividade do rebanho (nível rebanho) quanto a soropositividade de animais dentro do rebanho (nível animal) numa população selecionada de forma aleatória em rebanhos leiteiros Canadenses.

Material e métodos

Foram coletados 6.662 amostras de soro sanguíneo de vacas provenientes de 240 rebanhos selecionadas de forma aleatória em 6 províncias canadenses. Um critério de inclusão foi a propriedade participar do programa de melhoramento de rebanhos leiteiros (DHI) que mensalmente testam a produção de leite de forma individualizada. As amostras sanguíneas forma armazenadas a -20°C e testados para anticorpos de *Neospora caninum* usando como teste de diagnóstico um teste de ELISA indireto, que possui 88.6% de sensibilidade e 96.5% de especificidade.

Dados provenientes do DHI e dos exames sorológicos para exposição ao vírus da Leucose Bovina (VLB) e *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* formaram o conjunto de variáveis de nível animal. Para o nível rebanho, utilizou-se a exposição para o vírus da Diarréia Bovina a Vírus e dados coletados através de questionários compreendendo informações demográficas, práticas de manejo e biossegurança. Um total de 224 propriedades respondeu o questionário, com uma taxa de resposta de 93%. No total de animais testados 801 (12,78%) vacas testaram positivas para *Neospora caninum* e 183 (81,70%) dos rebanhos testados tiveram no mínimo um animal positivo. Para uma estimativa mais conservadora a prevalência dos rebanhos afetados com no mínimo 10% da amostra (3 em 30 animais amostrados) positiva foi de 106 propriedades ou seja 47,32%.

A análise estatística foi feita utilizando primeiramente uma análise logística incondicional utilizando todas as variáveis, tanto as de nível animal quanto as de nível de rebanho, utilizando como ponto de corte (podendo passar para a próxima fase) um valor de p igual ou menor a 0,15, sendo 41 variáveis de nível rebanho e apenas 3 variáveis de nível animal selecionadas para a próxima fase.

As 44 variáveis foram agrupadas em sub-grupos de acordo com o tema para evidenciar os efeitos das variáveis e suas interrelações. Após formar estes subgrupos, alguns efeitos passaram a não existir mais devido a colinearidade existente entre as variáveis. As variáveis cujo valor de p ficou inferior a 0,05 foram selecionadas para a última etapa da análise que foi o momento que se colocou todas as variáveis em conjunto e verificar os efeitos "real" de cada uma delas. A análise desta última etapa foi utilizada efeitos aleatórios no nível de rebanho com o objetivo de extrair a variância entre rebanhos e demonstrar o efeito dos fatores de risco sem o efeito rebanho.

Resultados e discussão

O resultado no modelo logístico misto construído usando o "status" sorológico para *Neospora caninum* no nível animal como variável resposta, com rebanho como efeito aleatório e província como efeito fixo. O "status" sorológico para VLB foi a única variável no nível animal que permaneceu no modelo com valor de p inferior a 0,05 e uma odds ratio de 1,4. A variável categorica "Presença de cães na fazenda" (nenhum, 1 cão, 2 cães, 3 ou mais cães) e a variável dicotômica "Cães comem restos de placenta e fetos" mostraram uma interação significativa como fator de risco. Outras variáveis que continuaram no modelo final (e se comportaram como fator de proteção) são: "Se o fazendeiro pede exame de BVD negativo antes de introduzir o animal no rebanho", "Número de vacas em lactação na fazenda", "Se vacas secas recebem Rumesin na comida", "Se transferência de embriões e utilizada na propriedade", "Relação da área da fazenda utilizada na produção de forragem e número de vacas" e "Se novilhas tem contato 'nariz-com-nariz' com bezerros".

Estes achados podem ser utilizados como indicativos de fatores de gerenciamento das propriedades que poderiam ser discutidos como controle na propriedade da soroprevalência e seus possíveis impactos.

Conclusão

Foi possível relacionar fatores de risco bem como de proteção para servir de subsídios para futuras pesquisas bem como programas de controle da infecção por *Neospora caninum* nas propriedades.

(14)

Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e cães da Amazônia Ocidental Brasileira, Estado de Rondônia.

Daniel M. Aguiar, Guacyara T. Cavalcante, Willian A. Cañón-Franco, Aline A.R. Rodrigues, Daniela P. Chiebao, Marcelo B. Labruna, Luis M.A. Camargo e Solange M. Gennari.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87. Cidade Universitária, CEP: 05508-900 Email: danmoura@usp.br

Introdução

O protozoário *Neospora caninum* foi primeiramente identificado em cães com encefalite e miosite e atualmente é considerado um importante agente de abortamentos em bovinos em todo mundo. Adicionalmente, também foi descrito em eqüinos, caprinos, ovinos e bubalinos (DUBEY, 2003).

As informações a respeito das doenças que acometem os animais na região amazônica são poucas e os estudos conduzidos abordam apenas doenças relacionadas aos bovinos, espécie de maior importância econômica na região (HOMEM et al., 2000). O estado de Rondônia apresenta características típicas de frente de colonização, onde os habitantes e os animais domésticos e selvagens compartilham o mesmo habitat, facilitando a transmissão de determinados patógenos. Portanto, estudos conduzidos nesta região apresentam-se como um desafio científico inegável.

O objetivo deste estudo foi determinar a frequência de anticorpos anti-*N.caninum* em bovinos, ovinos e cães provenientes do município de Monte Negro, Rondônia, buscando informações sobre possíveis fatores de risco para a ocorrência do agente na região.

Material e Métodos

O estudo foi realizado no município de Monte Negro, Estado de Rondônia, a oeste da Amazônia Brasileira (10° 18' Sul; 63° 14' Oeste) no ano de 2002 (CAMARGO et al., 2002).

Para a amostragem dos animais procedentes da área rural, utilizaram-se dados da Agência de Defesa Sanitária Agrosilvopastoril do Estado de Rondônia (IDARON). No cálculo do número de propriedades a serem examinadas, considerou-se prevalência de propriedades positivas de 50%, precisão mínima de 10% e intervalo de confiança (IC) de 95%. Assim, foram examinadas 86 fazendas, sorteadas aleatoriamente do total de 722 que possuíam bovinos, segundo informações obtidas no IDARON. Dentro de cada propriedade, sorteou-se um número variável de vacas para serem examinadas, como proposto por THRUSFIELD (1995), de modo que a chance de encontrar pelo menos uma vaca positiva na propriedade foi de 95%, considerando-se que ela tivesse no mínimo 5% de vacas positivas. Chegou-se ao número total de 2.109 vacas amostradas e para calcular a prevalência no município de Monte Negro, cada propriedade foi ponderada pelo tamanho do seu rebanho, a fim de se obter uma amostra representativa para todo o rebanho do município, que é de 116.736 bovinos. Todos os cálculos

foram realizados com o auxílio do programa EPIINFO 6.04. Paralelamente, os animais das espécies ovina e canina que estavam presentes na ocasião das visitas também foram amostrados, sendo 141 ovinos e 174 cães. Também foram amostrados 157 de cães da zona urbana e os parâmetros adotados para o estabelecimento do tamanho da amostra foram prevalência esperada de 50%, precisão mínima de 10% e IC de 95%, de um total de 671 cães residentes na área urbana.

Aplicou-se a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para a pesquisa de anticorpos anti-*N.caninum*, utilizando ponto de corte de 25 para os bovinos e 50 para cães e ovinos (SOUZA et al., 2001; GUIMARÃES JUNIOR et al., 2004; FIGLIUOLO et al., 2004)

Em cada fazenda foi aplicado um questionário sanitário, a fim de avaliar possíveis fatores de risco para ocorrência de anticorpos anti-*N.caninum* nas espécies estudadas, utilizando análises uni e multivariada (HOSMER & LEMESHOW, 1989). Adicionalmente compararam-se as frequências encontradas entre os cães de procedência rural e urbana pelo teste do Qui-quadrado (χ^2). O resultado por faixa etária dos cães do meio rural foi analisado pelo teste de Cochran-Armitage. Estes cálculos foram realizados com auxílio do programa SPSS 10.0.

Resultados

Obteve-se 220 (10,4%) vacas reagentes à RIFI com títulos entre 25 e 12.800, provenientes de 62 (72%) fazendas. A tabela 1 apresenta as frequências encontradas por propriedades e animais, segundo as aptidões zootécnicas. A prevalência de anticorpos anti-*N.caninum* em bovinos no município de Monte Negro, RO foi de 8,8% (IC 95% 6,8–10,7%).

Tabela 1. Frequência de vacas soropositivas à anticorpos anti-*N.caninum* segundo aptidão zootécnica, procedentes de 86 propriedades do município de Monte Negro, RO. Monte Negro, RO. 2002

Aptidão	Propriedade			Animal		
	Número	Positivos	%*	Número	Positivos	%
Corte	11	11	100,0 ^a	584	56	9,5 ^a
Leite	50	35	70,0 ^b	1011	114	11,2 ^a
Mista	25	16	64,0 ^b	514	50	9,7 ^a
	86	62	72,1	2109	220	10,4

*Diferentes letras nas mesmas colunas significam diferença significativa $P \leq 0,05$

Dos ovinos estudados, 41 (29,0%) foram positivos, apresentando títulos entre 50 e 25.600 provenientes de nove (60,0%) das 15 fazendas que possuíam ovinos.

Dos cães rurais, 12,6% (22/174) apresentaram anticorpos anti-*N.caninum*, enquanto 8,3% (13/157) dos de origem urbana foram reagentes à RIFI. Estes resultados quando comparados pelo teste do χ^2 não apresentaram diferença significativa ($\chi^2 = 1,23$, $P = 0,267$). Com relação aos títulos de anticorpos detectados, os cães da área rural apresentaram títulos entre 50 e 51.200 enquanto os urbanos entre 50 e 3.200.

Na análise de risco para os bovinos, as propriedades com mais de 25 bovinos apresentaram maior risco ($P=0,0002$, Odds Ratio=9,7; IC 95%=2,9-32,2) para a ocorrência de anticorpos anti-*N.caninum*. A presença de cão nas propriedades e problemas reprodutivos nos bovinos não apresentaram associação com a ocorrência de anticorpos anti-*N.caninum*. Para os ovinos e caninos, não foi identificada variável que se caracterizasse como fator de risco. Os cães rurais apresentaram aumento da soropositividade com o aumento da idade ($P<0,05$).

Conclusões

A infecção pelo *N.caninum* está presente no município de Monte Negro, RO. Para a espécie bovina o tamanho do rebanho nas propriedades constituiu-se como fator de risco para a ocorrência de anticorpos anti-*N.caninum*. Não foi observada associação entre a presença de

anticorpos anti-*N.caninum* nos bovinos e ovinos e a presença de cães nas propriedades, assim como não houve diferença significativa entre a proporção de cães positivos dos ambientes rural e urbano. Ressalta-se neste trabalho, prevalência de anticorpos anti-*N.caninum* em ovinos acima da encontrada em outras regiões do Brasil e do mundo.

Bibliografia

- CAMARGO, L.M.A.; MOURA, M.M.; ENGRACIA, V. et al A rural community in a Brazilian Western Amazonian region: some demographic and epidemiological patterns. Mem. Inst. Osw. Cruz, v.97, n.2, p.193-195, 2002.
- DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. Kor J Parasitol, v.41, p.1-16, 2003.
- FIGLIUOLO, L.P.C.; KASAI, N.; RAGOZO, A.M.A. et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. Vet. Parasitol. v. 123, n.3-4, p. 161-166, 2004.
- GUIMARÃES JUNIOR, J.S., SOUZA, S.L.P., BERGAMASCHI, D.P. et al. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. Vet. Parasitol. 124, 1-8. 2004.
- HOMEM, V. S. F.; HEINEMANN, M. B.; MORAES, Z. M. et al. Leptospirose bovina em Uruará, PA, município da Amazônia Oriental. Arq. Inst. Biol. v. 76, n. 1, p. 1-8, 2000.
- HOSMER JR, D. W., LEMESHOW, S. Applied logistic Regression. New York: Wiley, 1989. 307p.
- SOUZA, S. L. P.; GUIMARÃES JUNIOR, J. S.; FERREIRA, F. et al. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Parana, Brazil. J Parasitol, v.88, p.408-409, 2002.
- THRUSFIELD, M. Veterinary Epidemiology. 2ed. Cambridge: Blackwell, 1995. 479p.

(15)

Fatores de risco associados à presença de anticorpos contra *Neospora caninum* em cães de Araçatuba - SP

Kátia D. S. Bresciani¹, Solange M. Gennari², Cárís M. Nunes¹, Anna Cláudia M. Serrano¹, Anderson B.de Moura³, Neusa S. Stobbe¹, Silvia H. V. Perri¹, Alvimar J. da Costa³, Ricardo A. Dias²

¹ Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP - Araçatuba, São Paulo, SP. Rua Clóvis Pestana, 793 Jardim D. Amélia - CEP 16050-680, Email: katia@fmva.unesp.br.

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, SP.

³ Centro de Pesquisas em Sanidade Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A ocorrência de anticorpos contra *N. caninum* na espécie canina, tem sido motivo de atenção de pesquisadores em todo o mundo (Gringoli et al., 1996; Rasmussen & Jensen, 1996; Barber et al., 1997; Björkman & Ugglá, 1999; Patitucci, et al., 2001; Gennari et al., 2002; Cañón-Franco et al., 2004, Mineo et al., 2004; Azevedo et al., 2005), entretanto ainda são comuns resultados controversos à respeito dos fatores que possibilitam a maior ocorrência deste agente nesta espécie animal. Este trabalho objetivou determinar a ocorrência de anticorpos contra *N. caninum* em cães da zona urbana do município de Araçatuba, SP, bem como a possível associação entre a presença desse agente e as variáveis: raça, sexo, faixa etária, dieta, ambiente e acesso às ruas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi selecionada uma amostra aleatória de 63 domicílios e canis da zona urbana do município de Araçatuba, SP e, em cada uma destas unidades amostrais, todos os cães foram selecionados. Não houve exclusão de animais na amostragem. Ao todo, foram colhidas amostras de sangue de 108 cães. Estes animais foram selecionados de modo a permitir a caracterização destes locais como focos ou livres da presença de *N. caninum*, a fim de possibilitar o cálculo de prevalência e uma posterior análise de fatores de risco para esta infecção. Um local foi considerado foco quando ao menos um cão foi positivo.

Para cada um dos cães, foi confeccionada uma ficha epidemiológica, colhendo-se informações sobre: raça (com e sem raça definida e para aqueles com raça definida pequeno, médio e grande porte), sexo, idade média dos cães por local (medida em meses e, quando desconhecida, estimada através da arcada dentária), dieta (ração comercial, caseira e mista), ambiente (piso cimentado, gramado ou de terra) e acesso do cão à rua. Passeios com o proprietário também foram considerados como acesso às ruas.

Anticorpos contra *N. caninum* foram determinados através da reação de imunofluorescência indireta, sendo utilizados os reagentes do Veterinary Medical Research and Development (INC., Pullman, USA.), segundo as recomendações do fabricante, considerando-se positivas as amostras com reatividade a partir da diluição 1:50. Todos os soros foram testados nas diluições 1:50 e 1:100.

Para a realização da análise de fatores de risco, as variáveis foram manipuladas de modo a apresentarem-se em escala crescente de risco. A categoria de menor risco foi considerada como base para a comparação das demais categorias. A variável idade foi recategorizada em tercís. Inicialmente, foi realizada uma análise univariada (testes qui-quadrado ou Fischer) para verificar-se a associação de cada um dos possíveis fatores de risco com a variável dependente (positividade para *N. caninum*) segundo Zar (1996). O nível de significância adotado foi 20%. As características mais associadas à variável dependente permitiram a identificação dos fatores de risco propriamente, através de uma análise múltipla (regressão logística múltipla) (Hosmer & Lemeshow, 1989). O nível de significância adotado nesta fase foi 5%.

RESULTADOS

Os resultados das associações entre os parâmetros estudados e a ocorrência de anticorpos contra *N. caninum* encontram-se na Tabela 1. Dos 63 domicílios e canis amostrados, 15 (23,8%) continham, ao menos, um cão positivo ao *N. caninum*. Dos 17 cães positivos títulos ≥ 50 foram encontrados em 14 e ≥ 100 em três animais. Dentre os 108 cães examinados, 17 (15,7%) foram soropositivos ao agente. Não foi observada associação entre raça e a presença de anticorpos contra *N. caninum* ($p = 0,64$). Sexo ($p = 0,15$) e idade ($p = 0,35$) também não apresentaram associação. Foi observada associação entre a oferta de comida caseira e a positividade ao *N. caninum* ($p = 0,06$), porém sem confirmação no modelo múltiplo. As variáveis ambiente e acesso à rua não apresentaram associação estatisticamente significativa ($p = 0,34$).

Tabela 1 – Cães examinados (%) e positivos (%) à presença de anticorpos anti-*Neospora caninum* (RIFI \geq 50) e valores de *P* para o teste de associação para as variáveis estudadas.

Variável	Cães examinados	%	Cães Positivos	%	P*
Raça					
definida	33	55,9	6	10,2	0,64
indefinida	26	44,1	6	10,2	
Idade (anos)					
0→2	22	34,9	3	4,8	0,35
2→5	22	34,9	7	11,1	
>5	19	30,2	5	7,9	
Dieta					
comercial	39	63,9	6	9,8	0,06
Caseira/mista	22	36,1	8	13,1	

Ambiente					
cimentado	27	42,9	8	12,7	0,35
gramado/terra	36	57,1	7	11,1	
Acesso à rua					
não	32	50,8	6	9,5	0,34
sim	31	42,9	9	12,3	

* nível descritivo do teste Qui-Quadrado

CONCLUSÃO

Anticorpos contra *Neospora caninum* foram encontrados em cães urbanos e sadios do município de Araçatuba. As variáveis sexo, idade, raça, tipo de alimentação, tipo de ambiente e acesso às ruas não apresentaram associação com a ocorrência da infecção pelo *N. caninum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, S. S. et al. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 79, p.51-56, 2005.
- BARBER, J. S. et al. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. **Journal Parasitology**, v.83, p.1056-1058, 1997.
- BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum*, infection. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1497-1507, 1999.
- CAÑÓN-FRANCO, W. A et al. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.115, p.71-74, 2003.
- GENNARI, S.M. et al. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.106, p.177-179, 2002.
- GRINGOLI, G. F.; CAPUANO, F.; VENECIANO, V. Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* in dog sera. **Parasitologica**, v.38, p.282, 1996.
- HOSMER JR., D. W.; LEMESHOW, S. Applied logistic regression. New York: John Wiley & Sons, 1989. 307 p.
- MINEO, T.W.P. et al. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* serological status of different canine populations from Uberlândia, Minas Gerais. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.3, p.414-417, 2004.
- PATITUCCI, A. N. Neosporosis canina: presencia de anticuerpos séricos en poblaciones caninas rurales y urbanas de Chile. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.33, p.227-232, 2001.
- RASMUSSEN, K.; JENSEN, A. L. Some epidemiologic features of canine neosporosis in Denmark. **Veterinary Parasitology**, v.62, p.345-349, 1996.
- ZAR, J. H. Biostatistical analysis. 3. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1996. 662 p.

(16)

Coeficientes reprodutivos e características de desempenho em bovinos de corte infectados pelo *Neospora caninum*

C. Del Fava^{1*}, E.M. Pituco¹, E. De Stefano¹, L.H. Okuda¹, C.I.L. Ferrari², J.J.A.A. Demarchi², A. Marini², F.P. Oliveira³, J.F. Fonzar³, A.G. Gasparelli Júnior³

¹CPDSA - Instituto Biológico/APTA - Av. Cons. Rodrigues Alves 1252 - CEP. 04014-002, São Paulo/SP/Brasil, delfava@biologico.sp.gov.br; ²PRDTA Extremo Oeste - APTA Regional - Andradina/SP, ³FISMA – Curso de Medicina Veterinária - Andradina/SP.

INTRODUÇÃO

A Neosporose bovina é causada pelo protozoário *Neospora caninum*, parasita disseminado nos rebanhos em todo o mundo e responsabilizado como o principal causador de abortamento na atualidade¹. Embora a forma de transmissão mais importante deste agente

seja a transplacentária, observou-se que, na maioria dos casos, a infecção intra-uterina não causa morte fetal, gerando bezerros congenitamente infectados^{2, 3}. A ausência de dados demonstrando o desempenho reprodutivo e produtivo em matrizes de corte infectadas pelo *N. caninum*, criadas sob manejo extensivo e adaptadas às condições tropicais levou ao delineamento do presente estudo, em uma fazenda na região norte do Estado de São Paulo, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais das raças Guzerá e Nelore foram avaliados durante um ciclo reprodutivo completo, desde a cobertura até a parição. O sorodiagnóstico do *N. caninum* foi realizado pelo ELISA teste (kit Iddex®). As fêmeas foram cobertas por touros aprovados em exame andrológico⁴ e o diagnóstico de gestação⁵ realizado por palpação retal, 60 dias após o término da estação de monta. O peso e escore corporal foram mensurados na saída da estação de monta. A condição corporal foi avaliada por uma escala de um a nove⁶, sendo considerada a condição ideal para reprodução o valor cinco⁷. Os coeficientes de prenhez e parição de matrizes reagentes e não reagentes foram analisados por Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher⁸ ($\alpha = 5\%$ e teste bicaudal). A condição corporal e peso de matrizes reagentes e não reagentes ao *N. caninum* foram avaliadas pelo teste F⁸ ($\alpha = 5\%$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de ocorrência de animais sororeagentes com idade acima de seis meses de vida no rebanho total (animais de cria, recria, matrizes e reprodutores) foi de 5,6% (57/1.024). Devido ao baixo número de matrizes sororeagentes ao *N. caninum*, optou-se por formar o grupo controle não reagente com animais da mesma raça e faixa etária. Não ocorreu diferença significativa entre a proporção de matrizes reagentes e não reagentes quando foram consideradas as faixas etárias: 3 a 7 anos - 18,52% (5/27); 7 a 10 anos - 20,51% (8/39); ≥ 10 anos - 25,81% (8/31) ($p=0,7782$) ou os grupos raciais Nelore - 26,0% (15/57) e Guzerá - 15,0% (6/40) ($p=0,2175$). O *N. caninum* não interferiu no coeficiente de prenhez de matrizes reagentes - 85,7% (18/21) e não reagentes - 73,7% (56/76) ($p=0,3855$) e no coeficiente de parição de matrizes reagentes - 88,8% (16/18) e não reagentes - 82,1% (46/56) ($p=0,7183$), ou seja, as matrizes infectadas não apresentaram perdas reprodutivas. As matrizes reagentes e não reagentes prenhas e vazias (Tab. 1) e paridas e não paridas (Tab. 2) apresentaram escore corporal médio acima de sete ($p>0,05$), confirmando dados da literatura em que a condição corporal acima de cinco favorece o desempenho reprodutivo. O peso médio entre matrizes reagentes e não reagentes prenhas e vazias (Tab. 1) e paridas e não paridas (Tab.2) não diferiram estatisticamente ($p>0,05$). Concluiu-se que o *N. caninum* não afetou os coeficientes de prenhez e parição, independente da raça, faixa etária, peso e condição corporal, porém ressalta-se a importância de realizar este mesmo estudo em rebanhos onde ocorra soroprevalência maior entre as matrizes, para verificar se os resultados obtidos serão concordantes ou discordantes com os apresentados no presente trabalho.

Tabela 1 – diferença entre os valores médios para a condição corporal e peso (kg) das matrizes na saída da estação de monta, para matrizes prenhas e vazias, reagentes e não reagentes ao *Neospora caninum*, pelo Teste F.

Características de desempenho	Reagentes	Não reagentes	P
	Média \pm DP	Média \pm DP	
Condição corporal matrizes prenhas	7,4 \pm 0,7 a	7,4 \pm 0,9 a	0,55
Condição corporal matrizes vazias	7,0 \pm 0,9 a	7,2 \pm 1,1 a	0,94
Peso (kg) Matrizes prenhas	503,4 \pm 53,7 a	513,4 \pm 68,7 a	0,39
Peso (kg) Matrizes vazias	502,7 \pm 76,0 a	504,2 \pm 61,0 a	0,47

* letras diferentes entre colunas denotam diferença estatisticamente significativa

Tabela 2 – diferença entre os valores médios para a condição corporal e peso (kg) das matrizes na saída da estação de monta, para matrizes paridas e não paridas, reagentes e não reagentes ao *Neospora caninum*, pelo Teste F.

Características de desempenho	Reagentes Média ± DP	Não reagentes média ± DP	Valor de F
Condição corporal matrizes paridas	7,3 ± 0,7	7,3 ± 0,8	0,59
Condição corporal matrizes não paridas	7,5 ± 1,4	7,8 ± 1,1	0,39
Peso (kg) matrizes paridas	500,3 ± 56,4	499,8 ± 58,8	0,90
Peso (kg) matrizes não paridas	554,0 ± 42,4	576,3 ± 78,6	0,79

* letras diferentes entre colunas denotam diferença estatisticamente significativa

Agradecimento: à FAPESP pelo auxílio no. 02/10122-1

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. Korean J. Parasitol., v.41, n.1, p.1-16, 2003.
2. MALEY, S.W., BUXTON, D., RAE, A.G. *et al.* The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at Mid-gestation. J. Comp. Path., v.129, p.186-195, 2003.
3. PARÉ, J., THURMOND, M.C., HIETALA, S.K. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. Can. J. Vet. Res., v.60, n.2, p.133-139, 1996.
4. COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49p.
5. GRUNERT, E., GREGORY, R.M. Diagnóstico e terapêutica da infertilidade na vaca. 2.ed. Porto Alegre: Editora Sulina, 1989. 174 p.
6. NICHOLSON, M.J.; BUTTERWORTH, M.H. A guide to condition Scoring of Zebu Cattle. Addis Ababa: International Livestock Centre for Africa, 1986. 29 p.
7. RICE, L.E. The effects of nutrition on reproductive performance of beef cattle. Vet. Clin. North Am. Food Animal Practice, v.7, n.1, p.1-26, 1991.
8. VIEIRA, S. Introdução à bioestatística. 3.ed. Rio de Janeiro: Campus, 1998. 196 p.

(17)

Pesquisa de *Neospora caninum* em sêmen de touros de Centrais de Inseminação Artificial do Brasil

Pituco, E.M.¹, Okuda, L.H.¹, Del Fava, C.¹, Stefano, E.¹, Shimoazono, O.S.¹, Camargo, C.N.¹, Galetti, N.T.C.¹, Oliveira, M.C.T.¹, Rodrigues, L.H.²

¹ Laboratório de Virose de Bovídeos - CPDSA - Instituto Biológico. Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252 – CEP. 04014-002 - pituco@biologico.sp.gov.br,

² Lagoa da Serra Holland Genetics

INTRODUÇÃO

A Neosporose tem sido descrita como importante causa de abortamento em bovinos (DUBEY, 2003). Inquéritos soroepidemiológicos realizados no Brasil relatam elevada ocorrência de *Neospora caninum* em rebanhos de corte e leite (GENNARI & SOUZA, 2002); o agente também foi isolado de fetos abortados (OKUDA *et al.*, 2001) e de cérebro de bezerros com sintomatologia nervosa MEGID *et al.*, (2000). Salienta-se que existem na literatura científica poucos trabalhos em que foi comprovada a eliminação do parasita no sêmen fresco e industrializado de touros sororeagentes de Centrais de Inseminação Artificial (ORTEGA-MORA *et al.*, 2003, SILVA *et al.*, 2004, FERRE *et al.*, 2005). Tendo em vista que no Brasil, estudo realizado revelou a presença de touros soropositivos ao *N. caninum* em Centrais de IA (PITUCO *et al.*, 2003), objetivou-se selecionar os touros sororeagentes e pesquisar o protozoário em partidas de sêmen desses animais, pela técnica da PCR.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para pesquisa de anticorpos foi utilizado soro sanguíneo, colhido em tubo siliconizado tipo Vacutainer e após dessora completa, foi estocado a -20°C até o processamento da amostra. Utilizou-se o teste de ELISA com o Kit comercial (Iddexx®), como prova de triagem. Todos os touros foram avaliados em cinco colheitas, com intervalo semestral, a partir de setembro de 2002.

No período foram detectados 38 touros sororeagentes ao ELISA. Ressaltamos que há rotatividade de touros em regime de coleta de sêmen e por isso alguns animais foram monitorados durante todo o experimento e outros em períodos menores devido ao término do contrato de permanência do touro na central. Foi enviado ao laboratório uma alíquota de 0,5mL de sêmen fresco de todas as partidas colhidas durante o período experimental (setembro de 2002 a setembro de 2004), para pesquisa do protozoário. A técnica utilizada inicialmente para a pesquisa do antígeno foi a PCR com *primers* da região Np-6 e Np-21 do *Neospora caninum* o qual amplifica 337 pb segundo MÜLLER *et al.* (1996). O limiar de detecção desse método é de cerca de 100 taquizoítos/mL de sêmen, um total de 1.124 partidas de sêmen foram analisadas.

Numa segunda etapa utilizou-se hemi-nested PCR, com os pares de primers externos Np4-Np7 e internos Np6-Np7 e o tamanho dos fragmentos amplificado de 275 pb e 227 pb, respectivamente, segundo BASZLER *et al.* (1999), sendo esse o método empregado atualmente na rotina do Laboratório de Vírus de bovídeos para o diagnóstico do *N. caninum*.

RESULTADOS

A prevalência de touros reagentes ao ELISA variou de 20,0% (26/130) a 25,4% (30/118) (Tab. 1). Os resultados soroepidemiológicos obtidos são semelhantes aos relatados por outros autores (GENNARI & SOUZA, 2002) sobre a ocorrência de Neosporose Bovina em rebanhos no Brasil.

Tabela 1 – Soroprevalência de touros sororeagentes de Centrais de Inseminação Artificial ao *N. caninum* pelo ELISA teste.

Resultado Sorologia Neospora	Data de colheita do sangue				
	Setembro 2002	Março 2003	Setembro 2003	Março 2004	Setembro 2004
Não Reagentes	80,0% (104/130)	79,8% (95/119)	74,6% (88/118)	76,0% (98/129)	79,8% (99/124)
Reagentes	20,0% (26/130)	20,2% (24/119)	25,4% (30/118)	24,0% (31/129)	20,2% (25/124)
Total	130	119	118	129	124

Em nenhuma das 1.124 partidas de sêmen analisadas foi identificado o *N. caninum* com o método da PCR, descrito por MÜLLER *et al.* (1996), enquanto que pela hemi-nested PCR, cujo limiar de detecção é de 10 taquizoítos/mL de sêmen foi encontrada uma amostra positiva em 55 analisadas. Este resultado é semelhante ao relatado por ORTEGA-MORA *et al.* (2003), SILVA *et al.* (2004) e FERRE *et al.* (2005), que empregaram a nested PCR e quantificaram pela PCR em tempo real variações de 1 a 10 parasitas/mL de sêmen. Demonstrou-se assim a baixa sensibilidade da PCR quando comparada com a hemi-nested PCR.

ORTEGA-MORA *et al.* (2003) comprovaram que o *N. caninum* pode ser esporadicamente eliminado no sêmen fresco não diluído e em sêmen industrializado de touros sororeagentes, utilizando a técnica da nested-PCR. A frequência de ocorrência de DNA de *N. caninum* em amostras de sêmen fresco foi 10,5% (08/76), enquanto que nas amostras de sêmen industrializado foi de apenas 3,75% (03/80).

SILVA *et al.* (2004) examinaram partidas de sêmen industrializado de 20 touros naturalmente infectados com *N. caninum* colhidas num período de dois anos. Apenas 08 touros apresentaram pelo menos uma partida positiva pela nested PCR. Em um total de 180 partidas de sêmen analisadas, em 14 (7,8%) detectou-se o parasita.

FERRE *et al.* (2004) monitoraram touros de Central de Inseminação Artificial por um período de cinco meses, sendo que de oito animais soropositivos, seis apresentaram DNA de *N.*

caninum em pelo menos uma partida de sêmen fresco investigada, com variação de 1 a 10 parasitas/mL de sêmen pela PCR em tempo real. O *N. caninum* apresentou eliminação intermitente no sêmen em baixo número.

Conclui-se que ocorre eliminação do protozoário pelo sêmen em baixas concentrações, no entanto, não se conhece o papel epidemiológico dessa via de eliminação quanto à infecção em fêmeas inseminadas. Experimentos deverão ser realizados no sentido de se verificar a transmissão venérea desse parasita.

Agradecimento: financiamento FAPESP nº 02/03966-9

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASZLER, T.V., GAY, L.J.C., LONG, M.T., MATHISON, B.A. Detection by PCR of *Neospora caninum* in foetal tissues from spontaneous bovine abortions, **J. Clin. Microbiol.**, v.37, p.4059-4064, 1999.
- DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, v.41, n.1, p.1-16, 2003.
- FERRE, I., ADURIZ, G., DEL POZO, I., CERRILLO, J.R., ATXAERANDIO, R., FERNÁNDEZ, E.C., HURTADO, A., GARAGALZA, C.U., ORTEGA-MORA, L.M. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenol.**, v.63, n.5, p.1504-1518, 2005..
- GENNARI, S.M. & SOUZA, S.L.P. Neosporose. **Vet News**, n.59, p.11-13, 2002.
- GONDIM, L.F.P., SARTOR, I.F., MONTEIRO Jr., L.A, HARITANI, M. *Neospora caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil. **N. Z. Vet. J.**, v.47, p.35, 1999.
- MEGID, J., PITUCO, E.M., OKUDA, L.H, ROCHA, N.S, LIMA, K.C, AGUIAR, D.M, NOZAKI, C.N., RIBEIRO, M.G., BENINE, L.E. Neosporose em bezerros de 5 a 7 meses de idade. In: CONBRAVET, Águas de Lindóia, 2000.
- MÜLLER, N., ZIMMERMANN, V., HENTRICH, B., GOTTSTEIN, B. Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA Hybridization immunoassay. **J. Clin Microbiol.**, v.34, n.11, p.2850-2852, 1996.
- OKUDA, L.H., PITUCO, E.M., STEFANO, E., PERUCINI, L.M. Isolamento de *Neospora caninum* em amostras de fetos bovinos abortados no Brasil. **Rev. Bras. Reprod. Animal**, v.25, n.2, p.248-250, 2001.
- ORTEGA-MORA, L.M., FERRE, I., DEL-POZO, I., SILVA, A.C., FERNÁNDEZ, E.C., CERRILLO, J.R., GARAGALZA, C.U., ADURIZ, G. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Vet. Parasitol.**, v.117, p.301-308, 2003.
- PITUCO, E.M., OKUDA, L.H., DEL FAVA, C., STEFANO, E., SHIMOZONO, O.S., PERUCINI, L.M., TROTTER, C.M., DUARTE, F.C., RODRIGUES, L.H. Ocorrência de neosporose em touros de centrais de inseminação artificial. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.27, n.3, p.545-548, 2003.
- SILVA, A.C., FERRE, I., FERNÁNDEZ, E.C., NAVARRO, V., ADURIZ, G., GARAGALZA, C.U., MORA, L.M.O. Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. **Theriogenol.**, v.62, p.1329-1336, 2004.

(18)

Transmissão vertical de *Neospora caninum* em bovinos da microrregião de Goiânia, Goiás

Suzana Alves Bastos¹; Débora Pereira Garcia Melo², Cybelly Moreno Boaventura², Andréa Caetano da Silva²

¹- Bolsista do PIBIC - Escola de Veterinária UFG; R. Caramuru, Qd. 36, Lt. 10, Cs. 01, Pq. Anhanguera, Goiânia, Goiás – Email: sznbastos@yahoo.com.br

²- Universidade Federal de Goiás

O objetivo desse trabalho foi determinar a transmissão vertical de *N. caninum* em vacas e suas crias, antes da mamada do colostro, em uma propriedade previamente constatada positiva para neosporose; e após isso, realizar a titulação dos animais tidos como positivos. Para isso, a coleta de sangue venoso dos pares mãe-cria foi realizada no momento do parto, evitando resultados falso-positivos decorrentes da aquisição de anticorpos na primeira mamada. A propriedade avaliada está situada no município de Nerópolis, na microrregião de Goiânia, Goiás, e se dedica à criação de animais taurinos voltados para produção leiteira. O sangue foi coletado por punção da veia coccígea em tubos tipo Vacutainer®, sem anticoagulante, sendo devidamente centrifugado para obtenção do soro, então separado em duas alíquotas para cada animal em tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL, identificado e mantido a - 20°C até o momento do exame. A detecção de anticorpos anti- *Neospora caninum* foi feita através de teste sorológico utilizando-se a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Como antígenos foram empregados taquizoítos inteiros cultivados em células Vero, do isolado NC-1 de *N. caninum*. Os taquizoítos foram utilizados como substrato antigênico em lâminas demarcadas, próprias para RIFI (Cultek®), sendo que em cada lâmina foram adicionados controles positivo e negativo, constituídos por soros de bovinos provenientes da Universidade Complutense de Madrid e previamente examinados por RIFI e Western Blotting. Inicialmente foram feitas apenas diluições de 1:125 e 1:250, sendo a reação considerada positiva quando observada fluorescência em toda a parede do taquizoíto a uma diluição do soro de 1:250. Posteriormente, foram feitas as titulações de animais tidos como positivos (tanto mães como filhas) utilizando a mesma técnica, porém nas diluições de 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1600, como forma de se visualizar a interferência dos títulos na transmissão vertical. Ao todo foram analisadas 42 fêmeas, sendo 21 vacas com suas 21 crias respectivamente, no período de um ano. Ao final dos exames foram encontrados 13 animais positivos a RIFI (30,95% de prevalência da propriedade para neosporose), sendo desses oito vacas e cinco bezerras, todas filhas de mães igualmente positivas. A prevalência encontrada entre os animais adultos foi de 38,09% e de 23,80% entre as bezerras. Analisando os pares mãe-cria, percebemos 62,50% de positividade entre as crias de vacas positivas, enquanto apenas 37,50% dessas filhas foram negativas, mostrando que as mães soropositivas tiveram maior porcentagem de filhas positivas que negativas. Nenhuma das filhas de mães negativas apresentou resultado positivo para neosporose, comprovando a ausência da transmissão vertical nesses casos. Quanto à titulação, das oito vacas positivas, seis foram tituladas, e de dois desses animais não foi possível a obtenção de resultado para o teste, sendo que duas apresentaram título de 1:400 e quatro desses animais apresentaram título de 1:800. Dentre as bezerras, das cinco positivas, foi realizada a titulação de três delas, também não sendo possível a titulação das demais. Os títulos observados nesses três animais foram os seguintes: duas com 1:400, e uma com 1:800. É importante verificar que das cinco mães que tiveram filhas positivas, três apresentaram título de 1:800. Por outro lado as bezerras filhas de mães com título 1:800, possuíam titulações entre 1:400 e 1:800. Uma das vacas com alto título (1:800) sofreu aborto durante a gestação. Não houve transmissão vertical de *Neospora caninum* nas duas vacas que apresentaram título de 1:400. Isso revela que a quantidade de anticorpos anti-*N. caninum* pode ser fator importante na ocorrência da transmissão vertical, sendo que títulos maiores provavelmente determinem maior risco de transmissão e ainda possa interferir na probabilidade de ocorrência de aborto, um dos maiores problemas causados pela neosporose. Os resultados confirmam, portanto, a importância da transmissão vertical nas infecções por *Neospora caninum*, mostrando a possibilidade de o título da mãe influenciar na transmissão para a filha. Apesar de não prever com exatidão a sorologia das bezerras, os testes em vacas utilizadas para reprodução e a posterior seleção desses animais já reduziram a ocorrência de problemas reprodutivos e prejuízos ao produtor naquelas propriedades em que previamente já foram diagnosticados abortos por ocorrência da neosporose.

(19)

Prevalência de *Neospora caninum* em cães na cidade de Campo Grande, MS

1. DPA/CCBS- Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Caixa Posta 549 – CEP 79070-900 – Campo Grande, MS – Email: *fernando@nin.ufms.br*
2. Embrapa Gado de Corte

No Brasil, a *Neospora caninum* tem sido notificada em diferentes Estados, indicando que a neosporose possui ampla distribuição geográfica, independente das diferenças ecofisiográficas. No Estado de Mato Grosso do Sul, exames sorológicos em amostras de sangue de vacas criadas no planalto, sem e com histórico de aborto, revelaram prevalências de 7,7 (91/7) e 43 % (90/38), respectivamente. Na região pantaneira, exames sorológicos de sangue colhidos em novilhas apresentaram prevalência de 30% (60/18) para *N. caninum*. Em cães, inquéritos sorológicos foram realizados em animais de quatro distritos sanitários da cidade de Campo Grande, apresentando uma prevalência de 26,53% (245/65). Frente a estas informações, justifica-se a pesquisa sobre a eliminação de oocistos de *N. caninum* na população de cães; visto que estes estariam contribuindo para a disseminação desta protozoose no ambiente.

Foram colhidas 380 amostras de fezes de cães capturados ou recebidos pelo Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura municipal de Campo Grande (CCZ/PMCG), de ambos os sexos e agrupados, quando da coleta, em dois grupos: adultos e jovens, definidos pelas características que estimavam a idade aparente. As amostras foram coletadas diretamente do reto ou quando expelidas voluntariamente de forma que o animal pudesse ser identificado; eram imediatamente acondicionadas em frascos e resfriadas a 10 °C até o processamento. A técnica empregada foi da centrifugo-flutuação em açúcar (CFA) modificada, na qual 3 g de fezes eram dissolvidas em água, tamizadas e centrifugadas em tubos tipo Falcon, 15 mL, por 10 minutos a 2000 rpm (60 G). Após a centrifugação o sobrenadante era desprezado e o sedimento gradativamente misturado, sob agitação em Vortex, com solução saturada de açúcar a 60% (p/v) e centrifugada a mesma velocidade e tempo; após este processo, o volume dos tubos era completado, se necessário, com a solução saturada e posicionados na vertical, e neles colocada uma lamínula. Após transcorridos dez minutos, a lamínula era retirada e depositada sobre lâmina, para exame imediato ao microscópio óptico; quando detectados os oocistos, estes eram medidos e caracterizados. Amostras com oocistos, apresentando características de *N. caninum*, eram separadas e dissolvidas em solução de bicromato de potássio a 1%, para esporulação. E ainda, as amostras com oocistos esporulados compatíveis, morfológicamente, com a *N. caninum* eram processados pela técnica do PCR, usando como *primers* Np21: 5'- gggtgtgctcaatcctgtaac - 3' e Np6: 5' -ctgccagtcacctacgtcttct- 3' e, como amostra controle da reação, empregou-se taquizoítos de NC-1. Animais identificados como portadores da infecção por *N. caninum*, quando possível, foram isolados e mantidos em gaiolas para concentração de oocistos, a serem utilizados em estudos futuros.

Do total de amostras processadas, 4% (380/15) foram positivas para *Neospora caninum*; sendo as prevalências de 1,9% (157/3), nos animais adultos, e 16,7% (60/10) nos animais jovens. Sugerindo que a eliminação dos oocistos ocorre, com mais frequência, nos animais jovens, inclusive alguns com idade inferior a 30 dias de vida. Nestes animais foram observadas diarreia mucosa, de cor acinzentada e persistente, desidratação moderada, anorexia e apatia. Alguns recuperaram as condições e a eliminação de oocistos cessou; dois deles foram a óbito e necropsiados para estudos histopatológicos. Não foram observados sintomas nervosos nestes animais. A partir desses resultados pretende-se trabalhar no isolamento e caracterização de isolados regionais e relacioná-los com os antígenos disponíveis para diagnóstico.

(20)

Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos das microrregiões de Goiânia e Anápolis, Goiás

Débora Pereira Garcia Melo¹; Suzana Alves Bastos¹; Cybelly M. Boaventura¹; Luis Miguel Ortega-Mora², Andréa Caetano da Silva³

¹- Universidade Federal de Goiás

²- Universidad Complutense de Madrid

³- Instituto de Patologia Tropical e Saude Pública – Universidade Federal de Goiás – Caixa Postal 131 – Goiânia, GO. Email: andrea@iptsp.ufg.br

A prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos foi determinada em 21 fazendas das microrregiões de Anápolis e Goiânia, Goiás. Destas, 11 eram rebanhos leiteiros (Holandesa e cruzados Holandês-Zebu), nove rebanhos de corte (Nelore) e um rebanho de exploração mista (Simental), situadas nos municípios de Anápolis (três propriedades), Inhumas (três propriedades), Goiânia (três propriedades), Nerópolis (duas propriedades), Itaguarí (duas propriedades), Caturai (uma propriedade), Itaberaí (duas propriedades), Jaraguá (uma propriedade), Terezópolis (uma propriedade), Guapó (duas propriedades) e Hidrolândia (uma propriedade). Foram colhidas 930 amostras individuais, de sangue venoso, em tubos tipo Vacutainer®, sem anticoagulante, o soro obtido foi separado e mantido a -20°C até o momento do exame. As amostras de soro foram examinadas através da reação de imunofluorescência indireta, usando como antígeno, taquizoítos do isolado NC-1 de *N. caninum*. Em todas as lâminas examinadas foram adicionados controles positivos e negativos, constituídos por soros de bovinos previamente examinados por RIFI e Western Blotting, provenientes da Universidade Complutense de Madrid. A reação foi considerada positiva quando foi observada fluorescência, em toda parede do taquizoíto, em uma diluição do soro $\geq 1:250$. A análise estatística dos resultados de prevalência obtidos, relacionando o tipo de exploração e a categoria animal foi feita pelo teste do Chi-quadrado (χ^2), utilizando o programa estatístico Epi Info v.3.3. Anticorpos anti-*N. caninum* foram observados em 283 (30,4%) das 930 amostras de sangue examinadas. Todas as fazendas foram positivas, com a prevalência para *N. caninum* variando de 10,3% a 89,7%. A prevalência para bovinos de corte foi de 29,6% (10,3% a 89,7%), para bovinos de leite 30,4% (14,5% a 83,3%) e para o rebanho de exploração mista, a prevalência encontrada foi de 43,3%. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os rebanhos de carne, leite e misto. Considerando os dados soropidemiológicos de *N. caninum* escassos no estado de Goiás e que, a neosporose tenha sido relatada recentemente no Brasil, estes resultados indicam que a infecção por *N. caninum* está amplamente distribuída no rebanho bovino das microrregiões de Goiânia e Anápolis. Mais estudos são necessários para investigar a prevalência de *N. caninum* em outras regiões goianas e associar a soropositividade e a ocorrência de abortos bovinos entre estas regiões e os outros estados do país. Portanto, os resultados deste estudo contribuem para a caracterização da importância desta enfermidade em rebanhos do estado, uma vez que Goiás é o segundo produtor de leite e quarto de carne do país.

(21)

Soroprevalência da infecção por *Neospora caninum* em ovinos reprodutores oriundos de rebanhos comerciais do Distrito Federal

Ueno, T. E. H.^{*1}; Heinemann, M. B.²; Gonçalves, V. S. P.²; Rodrigues, A. A. R.¹; Gennari, S. M.¹; Dilli, T. L. B.²; Akimoto, B. M.²; Soares, R. M.¹

1. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Universidade de São Paulo-Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87-Cidade Universitária. CEP: 05508-900. E-mail: tueno@usp.br
 2. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária-Universidade de Brasília
- * Bolsista Fapesp Mestrado – Processo 03/10219-8

Introdução

O *Neospora caninum* foi nomeado e descrito em 1988 (Dubey et al., 1988) e é um parasito conhecido como causador de encefalomielite e miosite em cães e abortamento em bovinos (Anderson et al., 1991; Dubey et al., 1988). Em ovinos, infecções naturais e experimentais têm demonstrado a ocorrência de transmissão vertical e falhas reprodutivas nesta espécie, como morte e reabsorção embrionária, abortamentos, fetos mumificados, natimortos, nascimento de filhotes fracos ou nascimento de filhotes aparentemente saudáveis, mas congenitamente infectados, dependendo do período de gestação em que a fêmea é infectada (Hässig et al., 2003; Buxton et al., 1998; Buxton et al., 1997; McAllister et al., 1996). Abortamentos repetidos podem acontecer, a exemplo do que ocorre com vacas (Jolley et al., 1999). Dados a respeito da prevalência da infecção no Brasil e no mundo em ovinos são escassos.

Objetivos

Devido à ausência de trabalhos sobre a prevalência desta enfermidade em propriedades produtoras de ovinos no Distrito Federal e, como um primeiro passo na compreensão de suas características epidemiológicas nesta região, objetivou-se com o presente trabalho estimar, pela reação de imunofluorescência indireta, a prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em ovinos reprodutores machos e fêmeas de rebanhos comerciais do Distrito Federal.

Material e métodos

De março a junho de 2004 foram colhidas amostras de sangue de 1028 animais pertencentes às 32 propriedades do Distrito Federal que possuíam criação comercial de ovinos e ao menos 20 matrizes no rebanho. Essas propriedades possuíam um total de 4615 reprodutores e estavam localizadas nos Núcleos Rurais do Gama, PAD-DF (Plano de Assentamento Dirigido do DF), Jardim, Tabatinga, Rio Preto, Taquara, Pípiripau, Planaltina e Sobradinho. Foram colhidas amostras de todos os carneiros existentes nas propriedades e, em relação às matrizes, foi feita uma amostragem por agrupamento (Bennett et al., 1991).

Os soros dos animais foram submetidos à reação de imunofluorescência indireta segundo Dubey et al. (1988), adotando-se como ponto de corte a diluição 1:50.

Em cada visita às propriedades também foi aplicado um questionário junto ao produtor a respeito de aspectos sanitários e de manejo que poderiam ser potencialmente incriminados como fatores de risco para as infecções por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*.

Resultados

A prevalência observada foi de 8,81% (7,08% a 10,53%, para um intervalo de confiança de 95%).

Entre as 32 propriedades, 28 (87,50%) possuíam ao menos um animal positivo para *N. caninum* e apenas quatro (12,50%) eram negativas.

Os títulos variaram de 50 a 51200, sendo que os títulos mais frequentes foram 50 (21,11%), 1600 (14,44%), 3200 (12,22%) e 100 (12,22%).

Não foi possível a análise dos fatores de risco devido ao pequeno número de propriedades controle em relação ao de propriedades caso.

Conclusões

Com base nos resultados, conclui-se que a infecção por *N. caninum* está presente e disseminada no rebanho ovino do Distrito Federal, sendo que a prevalência foi semelhante à encontrada por outros autores em rebanhos ovinos do estado de São Paulo (Figliuolo et al., 2004) e Guarapuava, Paraná (Romanelli, 2002), que observaram prevalências de 9,2% e 9,51%, respectivamente.

Referências Bibliográficas

- ANDERSON, M. L. et al. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 198, p. 241-244, 1991.
- BUXTON, D et al. Experimental infection of non-pregnant and pregnant sheep with *Neospora caninum*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 117, p. 1-16, 1997.
- BUXTON, D. et al. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v. 118, p. 267-279, 1998.
- DUBEY, J. P. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 192, p. 1269-1285, 1988.
- FIGLIUOLO, L. P. C. et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 161-166, 2004.
- HÄSSIG, M. et al. *Neospora caninum* in sheep: a herd case report. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 213-220, 2003.
- JOLLEY, W. R. et al. Repetitive abortion in *Neospora*-infected ewes. **Veterinary Parasitology**, v. 82, p. 251-257, 1999.
- MCALLISTER, M. M. et al. Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. **Veterinary Pathology**, v. 33, p. 647-655, 1996.
- ROMANELLI, P. R. Avaliação soropidemiológica de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em ovinos do município de Guarapuava – Paraná. 2002. 53 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2002.
-

(P1)

Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper e Uggla, 1988), em ovinos e caprinos do Estado de São Paulo

Figliuolo, L.P.C.^a; Kasai, N.^a; Ragozo, A.M.A.^a; de Paula, V.S.^a; Dias, R.A.^a; Souza, S.L.P.^a; Rodrigues A.A.R.^a; Viana, R.B.^b; Aguiar, D.M.^a; Gennari, S.M.^a

^a Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Med. Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, São Paulo CEP 05508-000, SP, Brazil

^b Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brazil

Neospora caninum é um parasito do filo Apicomplexa, o qual é estruturalmente é muito similar, mas antigenicamente distinto ao *Toxoplasma gondii*. A neosporose é a causa de distúrbios neuromusculares, paralisia e morte em cães, abortamentos e nascimento de animais prematuros em bovinos, ovinos e caprinos¹. A ocorrência de abortamentos naturalmente induzidos pelo agente já foi relatada em caprinos da Pensilvânia e Califórnia^{1,2}. Nas infecções experimentais em caprinos tem sido observada a ocorrência de nascimento de animais prematuros, morte fetal e abortamentos e o protozoário isolado da placenta de todos os animais inoculados com o agente⁸. Dubey e colaboradores (1996) relatam que infecção experimental, em ovinos, é clinicamente e histopatologicamente similar a neosporose bovina. A transmissão pode ser pela via transplacentária⁹ ou pela ingestão de oocistos eliminados pelos hospedeiros definitivos, o cão⁷ ou o coiote⁵. Há poucos levantamentos sorológicos da ocorrência de anticorpos anti-*N.caninum* em ovinos e caprinos. Romanelli (2002) no Estado do Paraná observou a ocorrência de 9,5% em ovinos. Em relação aos caprinos, relatos de soroprevalência não foram encontrados. Devido aos poucos dados da ocorrência do agente em pequenos ruminantes, o estudo teve como objetivo estudar a prevalência de anticorpos anti-*N.caninum* em ovinos e caprinos do Estado de São Paulo.

Material e Métodos

A área estudada foi o centro-oeste do Estado de São Paulo, local detentor da maior concentração de criadores de ovinos; entre os caprinos a distribuição apresenta-se aleatoriamente, uma vez que os criadores estão distribuídos pelas diferentes regiões. O número de amostragem foi baseado na população desses animais no Estado, de 233.000 e 70.000 ovinos e caprinos respectivamente⁶, assumindo uma prevalência de 50% para maximizar o tamanho da amostra com confiança mínima de 95% e utilizando o programa estatístico Win Episcope 2.0. Foram contemplados 597 ovinos e 394 caprinos e analisados sorologicamente para detectar a presença de anticorpos anti-*N.caninum* através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI \geq 50).

Os ovinos, de ambos os sexos, porém com predominância de fêmeas, eram de aptidão de carne e/ou lã, com idade variada, sendo esta estimada pela dentição. Já os caprinos eram todas fêmeas de idade variada, fornecida pelos proprietários.

Resultados

Ovinos

Das 597 amostras testadas, 9,2% (55) apresentavam anticorpos anti-*N.caninum* e a porcentagem da soropositividade nas propriedades variou de zero a 22,7% das amostras testadas. Foi observado pelo menos um animal soropositivo em 86,7% das propriedades

visitadas e em 73,4 e 90% delas foi relatada a presença de canídeos silvestres e cães domésticos respectivamente, entretanto associação entre a presença desses animais e a soropositividade dos ovinos não foi observada. Não houve associação entre a idade dos animais e a prevalência de anticorpos contra o agente ($P = 0,343$) (Tabela 1).

Caprinos

Dentre as 394 amostras analisadas, 6,4% (25) foram soropositivas para o agente. Em 42,1% dos caprinos foi observado pelo menos um animal positivo. Os títulos de anticorpos variaram de 50 a 12.800, sendo a diluição 1:800 a mais freqüente. A presença de canídeos silvestres e cães domésticos foi observada, respectivamente em 47,4 e 73,9% das propriedades, porém a análise estatística não mostrou associação entre a presença desses animais e a prevalência de anticorpos anti-*N.caninum* ($P = 0,341$). A análise dos dados revelou que não houve associação entre a idade e a soropositividade dos animais ($P = 0,277$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Prevalência da anticorpos anti-*Neospora caninum*, em ovinos e caprinos pela RIFI (Títulos ≥ 50), por faixa etária - São Paulo - 2003

Faixa etária	Ovinos		Caprinos	
	Examinados	Positivos(%)	Examinados	Positivos(%)
< 1 ano	118	07 (5,93)	87	04 (4,59)
1 – 4 anos	185	17 (9,18)	161	08 (4,96)
≥ 4 anos	294	31(10,54)	146	13 (8,91)
Total	597	9,21	394	6,34

Fonte: FIGLIUOLO, et al. 2004

Conclusões

A prevalência de anticorpos anti-*N.caninum* foi de 9,2 e 6,3% respectivamente em rebanhos ovinos e caprinos. A soropositividade do agente não aumentou com a idade dos animais. Não houve associação entre propriedades com caprinos ou ovinos soropositivos para o agente e presença de cães. A idade não apresentou associação com a presença do agente, indicando distribuição homogênea entre os animais das propriedades.

Referências Bibliográficas

- 1- 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 for Parasitology**, v. 83, n. 6, p. 1056-1058, 1997.
- 2- DUBEY, J. P.; ACLAND, H. M.; HAMIR, A. N. *Neospora caninum* (apicomplexa) in a stillborn goat. **Journal Parasitology**, v. 78, n. 3, p. 532 - 534, 1992.
- 3- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 67, n. 1-2, p. 1-59, 1996.
- 4- FIGLIUOLO, L.P.C.; KASAI, Nobuko; RAGOZO, Alessandra Mara Alves; PAULA, Vania Socorro Ortega de; DIAS, Ricardo Augusto; SOUZA, S. L. P. de; GENNARI, S. M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 161-166, 2004.
- 5- GONDIM, L.F.P.; McALLISTER, M.M.; PITT, W.C.; ZEMLICKA, D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**. v. 34, n. 2, p.159-161, 2004.
- 6- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Bancos de Dados Agregados. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/acervo/default.asp?z=t&o=2>>. Acesso em: 10 de janeiro 2003.
- 7- LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; DUNCAN, R.B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 82, n. 4, p.327-333, 1999.
- 8- 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 Veterinary Research**, v. 56, n. 9, p. 1176 - 1180, 1995.
- 9- 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, n. 6, p. 647 - 655, 1996.
- 10- ROMANELLI, P.R. **Avaliação soropidemiológica do *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em ovinos do município de Guarapuava – Paraná**. 2002. 53 f. Tese (Mestrado em Sanidade Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2002.
-

(P2)

Soroprevalência e fatores associados a *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em ovinos e cães de propriedades do município de Guarapuava, Paraná, Brasil

Paulo Roberto Romanelli¹, Roberta Lemos Freire¹, Odilon Vidotto¹, Elisabete Regina Marangoni Marana¹, Liza Ogawa², Vânia S. Ortega de Paula³, Italmar Teodorico Navarro¹

1 Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina – DMVP, UEL, Postal Box 6001, 86050-970, Londrina, PR, Brasil. *e-mail: italmar@uel.br*

2 Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Bandeirantes, PR, Brasil

3 Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Universidade de São Paulo, USP, SP, Brasil

O estudo objetivou verificar a prevalência de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em ovinos e cães de propriedades rurais e os fatores predisponentes a estas enfermidades. Colheu-se 305 amostras de soro ovino e 24 de soro canino em nove propriedades de Guarapuava-Paraná. O diagnóstico sorológico utilizado foi a imunofluorescência indireta e ponto de corte para *N. caninum* em ovinos e cães foi de 1:50; para *T. gondii* o ponto de corte foi de 1:64 e 1:16, respectivamente. A prevalência de *N. caninum* em ovinos foi de 9,51% e de 29,1% em cães; para *T. gondii* 51,47% dos ovinos e 20,83% dos cães foram sororreagentes. A frequência de anticorpos aos dois coccídeos, em ovinos, foi de 5,24%. As variáveis relacionadas à neosporose ovina não foram significativas. O acesso dos gatos aos depósitos de alimentos (p=0.0310; OR=1.95), a presença de roedores em depósitos de alimentos (p=0.0001; OR=6.3), o tamanho médio da propriedade (p=0.0026), a atividade agrícola (p=0.0052), a criação semi-intensiva (p=0.0001), a ração produzida na propriedade (p=0.0114), a água de represa, açude ou córrego (p=0.0188) e os problemas neurológicos em cordeiros (p=0.0001) foram fatores predisponentes para a toxoplasmose ovina, entre outros. Não foram encontradas diferenças significativas para as variáveis relacionadas à neosporose e à toxoplasmose canina.

(P3)

Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães da microrregião da Serra de Botucatu, Estado de São Paulo

Carla Cristina G. de Moraes¹, Jane Megid^{1*}, Edviges Maristela Pituco², Líria Hirome Okuda², Cláudia Del Fava², Eliana de Stefano².

^{1*}- Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública - FMVZ/Unesp/Botucatu.
CEP 18618-000 *email:jane@fmvz.unesp.br

²Laboratório de Vírus de Bovídeos - Instituto Biológico São Paulo/SP.

Considerando o isolamento de *Neospora caninum* e a sorologia freqüente em bovinos em nossa região os objetivos do presente trabalho foram avaliar a ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães da Microrregião da Serra de Botucatu, Estado de São Paulo correlacionados ao sexo, idade, e procedência quanto à zona urbana (exclusivamente cidade), rural (somente chácaras e sítios) e mista (acesso à zona urbana e rural) dos cães estudados.

Foram estudados 963 cães, com ou sem raça definida, de ambos os sexos e de diferentes idades, sem apresentação de qualquer sintomatologia clínica. Os animais foram selecionados aleatoriamente durante campanha de vacinação anti-rábica da microrregião da Serra de Botucatu, no período de maio a setembro de 1998. O soro obtido dos animais foi avaliado por meio da reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) utilizando como antígeno suspensão de *N. caninum*, cepa padrão NC-1.

Observou-se 25,65% de positividade (247 animais) sendo 164 (17%) machos e 83 (8,6%) fêmeas. Dos animais da zona urbana, rural e mista 147 (16,99%), 65 (16,92) e 33 (30%), respectivamente, foram reagentes à prova de RIFI. Todos os municípios apresentaram cães soropositivos em percentuais de positividade que variaram de 53,5% a 8,8%. Observou-se percentual de positividade crescente com a idade dos animais sendo a maior positividade observada em animais entre 2 a 4 anos de idade (25,1%).

Os resultados obtidos caracterizaram soropositividade para *N. caninum* em cães pertencentes a todos os municípios da microrregião da Serra de Botucatu demonstrando a ampla distribuição do agente na região.

(P4)

Aspectos epidemiológicos da infecção pelo *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em cães do município de Campina Grande, Paraíba*

S.S. Azevedo^a, A. A. R. Rodrigues^a, C.S.A. Batista^b, S.A. Vasconcellos^a, D. M. Aguiar^a, A.M.A. Ragozo^a, C.J. Alves^b, S. M. Gennari^a

^aDepartamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP

^bDepartamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB

Introdução

Toxoplasma gondii e *Neospora caninum* são dois parasitas responsáveis por distúrbios neurológicos em cães. Estudos recentes, realizados no Brasil, demonstraram que há uma variação na prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* em cães de diferentes estados brasileiros^{5, 6, 8, 10, 11}. Esse estudo foi realizado para determinar a prevalência e os fatores de risco associados com a presença de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* em cães da cidade de Campina Grande, Paraíba.

Material e Métodos

O estudo foi conduzido na cidade de Campina Grande durante a campanha de vacinação realizada em setembro de 2003. A amostra foi de 286 cães calculada utilizando o EpiInfo 6.0, com intervalo de confiança de 95%, prevalência de 50% e erro de 6%. Um questionário foi administrado aos proprietários, focando fatores de risco para toxoplasmose e neosporose. As informações coletadas incluíam idade, sexo, raça, tipo de criação, contato com fêmeas e presença de felinos e roedores.

* Azevedo, S. S., Batista, C. S. A., Vasconcellos, S. A., Aguiar, D. M., Ragozo, A. M. A., Rodrigues, A. A. R., Alves, C. J., Gennari, S. M. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. **Research in Veterinary Science**, 79: 51-56, 2005.

Anticorpos anti-*T. gondii* e anti- *N. caninum* foram detectados pela reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) com ponto de corte de 16 e 50 respectivamente. A prevalência foi estimada com a taxa de animais positivos pelo número de animais examinados com intervalo de confiança de 95% (EpiInfo 6.0). Correlação da associação entre soroprevalência de anticorpos anti-*N. caninum* e anti- *T. gondii* em cães e exposição a fatores de risco pré selecionados foi feito por regressão logística em dois passos: análise univariada e as variáveis selecionadas encaminhadas para a análise multivariada.

Resultados

Dos 286 animais testados, 177 (61,9%) eram machos e 109 (38,1%) fêmeas; 212 (74,1%) eram de raças cruzadas e 74 (25,9%) raças puras; 216 (75,5%) permaneciam exclusivamente em ambiente doméstico e 70 (24,5%) eram mantidos em ambiente externo ao domicílio; 24 (8,4%) tinham contato com fêmeas e 262 (91,6%) não tinham contato. Com relação à idade, 70 (24,5%) tinham idade inferior a um ano, 157 (54,9%) entre 1 e 5 anos, 32 (11,2%) entre 5 e 10 anos e 27 (9,4%) eram de idade superior a 10 anos. A presença de gatos na casa foi relatada por 52 (18,2%) proprietários e a presença de roedores foi relatada por 161 (56,3%) proprietários e 125 (43,7%) deles nunca observaram roedores na residência.

Dos 286 cães testados, 129 apresentaram anticorpos anti-*T. gondii* com título > 16, com prevalência de 45,1%. Dos positivos 16 (12,4%) apresentaram título 16; 23 (17,8%) título 32; 40 (31%) título 64; 28 (21,7%) título 128; 14 (10,9%) título 512 e oito (6,2%) título 1024.

A prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* foi de 8,4% com 24 dos 286 animais soropositivos, 12 (50%) com título 50; quatro (16,7%) título 100; dois (8,3%) título 200; dois (8,3%) título 400; um (4,2%) título 3200 e três (12,5%) título 12800. Quatorze dos 286 cães apresentaram anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* e 147 animais foram soronegativos para os dois agentes.

Os fatores de risco para a presença de anticorpos anti-*T. gondii*, na análise univariada e oferecidos para a análise multivariada foram, idade, contato com fêmeas e presença de gatos. A análise multivariada demonstrou que os fatores de risco associados com a presença de anticorpos anti-*N. caninum* foram idade, com cães mais velhos que um ano apresentaram mais alta prevalência do que animais mais jovens e cães com contato com gatos também apresentaram valores mais altos de prevalência. Em relação ao *N. caninum* o único fator de risco que mostrou uma possível associação na análise univariada foi cães que tiveram acesso a ambientes externos ao domicílio.

Discussão

A prevalência de 45,1% de anticorpos anti-*T. gondii* encontrada nesse estudo foi maior que a descrita em cães da Suécia (30%)⁴, Israel (35,5%)² e Trindade e Tobago (32%)¹. No Brasil, um valor inferior, 21,3% foi encontrado na região Sul e Sudeste¹⁰ e prevalência maior (76,4%) na região Norte⁵.

A prevalência de 8,4% para anticorpos anti-*N. caninum* em cães nesse estudo foi mais baixa do que a relatada de cães da região Sul e Sudeste (21,6%)¹¹ e da cidade de São Paulo (18%)⁸, porém valor similar foi encontrado na região amazônica (8,3%)⁶. Em outros países, valores mais baixos ocorreram na Suécia (0,5%)⁶, EUA e Canadá (7%)⁷ e valores mais altos na Bélgica (11%)³ e Japão (11,8%)⁹.

Essas diferenças podem ser explicadas pelo uso de diferentes técnicas de laboratório, tamanho da amostra e tipo de população canina amostrada.

Bibliografia

- 1 – Ali, C. H.; Gaafar, S. M.; Weirich, W. E.; Kanitz, C. L. Relationship of toxoplasma infection to other diseases in dogs. *Veterinary Parasitology*, v. 12, p. 199-223, 1983.
- 2 – Baneth, G.; Varda; Shkap; Savitsky, I.; Pipano, E. The prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in dogs in Israel. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, v. 51, p. 31-33, 1996.
- 3 – Barber, J.S.; Van Han, L.; Polis, I.; Trees, A.J. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in Belgian dogs. *Journal of Small Animal Practice*, v. 38, p. 15-16, 1997.

- 4 – Bjorkman, C.; Lunden, A.; Uggla, A.L. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in Swedish dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 35, p. 445-447, 1994.
- 5 – Canon-Franco, W.A.; Bergamaschi, D.P.; Labruna, M.B.; Camargo, L.M.A.; Silva, J.C.R.; Pinter, A.; Gennari, S.M. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dogs in the urban area of Monte Negro, Rondonia, Brazil. *Veterinary Research Communications*, v. 28, p. 113-118, 2004.
- 6 – Canon-Franco, W.A.; Bergamaschi, D.P.; Labruna, M.B.; Camargo, L.M.A.; Souza, S.L.P.; Silva, J.C.R.; Pinter, A.; Dubey, J.P.; Gennari, S.M. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 115, p. 71-74, 2003.
- 7 – Cheadle, M.A.; Lindsay, D.S.; Blagburn, B.L. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs. *Veterinary Parasitology*, v. 85, p. 325-330, 1999.
- 8 – Gennari, S.M.; Yai, L.E.O.; D'Áuria, S.N.R., Cardoso, S.M.S.; Kwok, O.C.H.; Jenkins, M.C.; Dubey, J.P. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 106, p. 177-179, 2002.
- 9 – Sawada, M.; Park, C.H.; Kondo, H.; Morita, T.; Shimada, A.; Yamane, I.; Umemura, T. Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 60, p. 853-854, 1998.
- 10 – Souza, S.L.P.; Gennari, S.M.; Yai, L.E.O.; D'Áuria, S.R.N., Cardoso, S.M.S.; Guimarães-Junior, J.S.; Dubey, J.P. Occurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from dogs of the urban and rural areas from Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, v. 12, p. 1-3, 2003.
- 11 – Souza, S.L.P.; Guimarães-Junior, J.S.; Ferreira, F.; Dubey, J.P.; Gennari, S.M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Paraná, Brazil. *Journal of Parasitology*, v. 88, p. 408-409, 2002.

(P5)

Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães de Goiânia, Goiás

Cybelly Moreno Boaventura^{1,2}, Suzana Alves Bastos², Débora Pereira Garcia Melo², Andréa Caetano da Silva²

¹ - Escola de Veterinária UFG, Goiânia, Goiás – Email: belly_vet@yahoo.com.br

² - Universidade Federal de Goiás

Objetivos:

Este trabalho teve como objetivo determinar a prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães na microrregião de Goiânia-Goiás, através da imunofluorescência indireta (RIFI).

Metodologia:

Sangue venoso, sem anticoagulante foi colhido de 197 cães de várias regiões da cidade provenientes de capturas pelo Centro de Controle de Zoonoses de Goiânia e de atendidos pelo Hospital Veterinário da Universidade Federal de Goiás – UFG. As amostras de sangue venoso foram colhidas, em tubos do tipo Vacutainer®, sem anticoagulante, para obtenção do soro, que foi separado por centrifugação, identificado e mantido a -20°C até o momento do exame. A detecção de anticorpos foi feita utilizando-se a reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Para isso foi feita uma diluição dos soros de 1:50. Esses foram adicionados à lâmina previamente antigenada com taquizoítos de *Neospora caninum* e incubadas em câmara úmida, a 37°C por 40 minutos. Em todas as lâminas foram adicionados como controle, soros caninos positivos e negativos. Depois de incubadas, as lâminas foram lavadas, foi adicionado o conjugado anti-cão e uma nova incubação foi feita, seguida de lavagem e montagem com glicerina tamponada e lamínula. A leitura foi feita em microscópio de imunofluorescência do taquizoítos na diluição de 1:50.

Resultados:

Foram examinadas amostras de 197 animais, sendo 100 fêmeas e 97 machos de diferentes idades e raças, provenientes de diferentes setores da cidade. Entre os machos foram encontrados resultados positivos em 38 (39,1%) animais e entre as fêmeas 27 (27%) animais positivos para *Neospora caninum*. Dos 197 soros examinados, 65 (32,9%) foram positivos à RIFI, com títulos ≥ 50 . Sendo que dos 72 animais provenientes do centro de zoonoses de Goiânia, 26 (36,1%) apresentaram resultados positivos à imunofluorescência e dentre os 125 cães atendidos no Hospital Veterinário da UFG, 39 (31,2%) foram positivos para *Neospora caninum*. Estes resultados são importantes para a avaliação da real prevalência do parasita em cães de Goiânia e contribuir para um controle maior dos fatores de risco na transmissão horizontal da neosporose além de ser mais um item para auxiliar os clínicos no diagnóstico diferencial de doenças neurológicas em cães da cidade.

Conclusões:

Anticorpos anti-*Neospora caninum* estão presentes em parcela significativa dos cães de Goiânia.

(P6)

Ocorrência de anticorpos contra *Neospora caninum* em soros de felinos naturalmente infectados do Município de Araçatuba, SP

Kátia D. S. Bresciani¹, Anna Cláudia M. Serrano¹, Sílvia H. V. Perri¹, Alessandro F. T. do Amarante², Solange M. Gennari³

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal (DAPSA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA), UNESP, Araçatuba, São Paulo (SP.). Órgão Financiador FUNDUNESP. Rua Clóvis Pestana, 793 Jardim D. Amélia - CEP 16050-680 Telefone: (018) 36363200 R. 3642 Fax: (018) 36226487 e-mail: katia@fmva.unesp.br

² Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu.

³ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, SP.

Este estudo foi executado com o intuito de avaliar o nível sérico de anticorpos para *N. caninum* em gatos domésticos naturalmente infectados no Município de Araçatuba, SP, bem como correlacionar a frequência de animais soropositivos com a idade dos animais, sexo e raça. Foram examinados 400 felinos, domiciliados, de ambos os sexos, de diferentes raças e idades, doados por seus proprietários ao Centro de Controle de Zoonoses do Município de Araçatuba, SP, para serem eutanasiados. Para a verificação da presença de anticorpos contra *Neospora*, foram colhidas amostras de sangue de todos os gatos. Os soros obtidos foram processados pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), de acordo com a técnica de CAMARGO et al. (1964). A análise estatística consistiu no Teste Qui-Quadrado para verificar associação entre a ocorrência de anticorpos contra o referido coccídio em relação as variáveis raça, sexo e idade dos animais analisados. Observou-se uma proporção de 24,5% (98/400) de sororeagentes para *N. caninum* nas amostras examinadas. A ocorrência de anticorpos contra *N. caninum* nos gatos com raça definida foi de 28,6% e nos sem raça definida de 24,2%, sendo esta diferença não significativa ($P > 0,05$). Não houve influência do sexo na proporção de reagentes para *N. caninum* ($P > 0,05$). A ocorrência de gatos soropositivos para *N. caninum* apresentou associação com a idade ($\chi^2 = 8,8$; $P < 0,01$). Dos 219 felinos com menos de um ano de vida, 18,7% mostraram-se positivos, enquanto que nos 181 gatos com mais de doze meses a positividade foi de 31,5%, indicando maior possibilidade de aquisição pós-natal da infecção pelo *N. caninum* nesses animais.

(P7)

Avaliação dos parâmetros reprodutivos e transmissão vertical de *Neospora caninum* em central de transferência de embriões em Goiás

Vanessa Silvestre Ferreira de Oliveira¹, Débora Pereira Garcia Melo², Bruno César Ferreira Gonzaga,² Lucas Jacomini Abud², Andréa Caetano da Silva².

¹- Aluna do Curso de mestrado – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás.

vansilvestre05@yahoo.com.br.

²- Universidade Federal de Goiás

Objetivos:

Verificar casos de *Neospora caninum* em doadoras e receptoras de embriões em uma Central de Transferência de Embriões em Nerópolis, Goiás. Será averiguada a ocorrência de transmissão congênita entre as receptoras e suas crias, a relação entre a titulação de anticorpos maternos durante a gestação e a capacidade de transmissão congênita. Serão avaliados parâmetros reprodutivos, como repetição de cio, dose de sêmem/prenhez, quantidade de inovulação/receptora, intervalo entre partos, presença de abortos e/ou reabsorção embrionária e quantidade de embriões produzidos. As receptoras são mestiças (sem raça definida) e as doadoras são todas da raça Nelore.

Metodologia:

Será colhido sangue venoso na veia coccígea em tubos vacutainer sem anticoagulante para obtenção de soro, que será acondicionado em eppendorf e mantido a -20°C até o momento do exame. O sangue será colhido mensalmente após a confirmação de prenhez das receptoras durante toda a gestação e do bezerro ao nascimento, antes da ingestão do colostro. Nas doadoras o sangue será colhido antes de cada programa de transferência de embriões. Para a verificação da ocorrência de transmissão vertical de *Neospora* e da relação entre a transmissão vertical e a titulação de anticorpos maternos, a propriedade será acompanhada por um período de quinze meses (abril de 2005 a julho de 2006). A detecção de anticorpos será feita utilizando-se de técnica de imunofluorescência indireta (IFI). O antígeno será preparado através da multiplicação de taquizoítos de *N. caninum* (amostra Nc-1) em cultivos de célula Marc 145. Os taquizoítos serão obtidos, lavados, contados, fixados em formol e utilizados para antigenar lâminas demarcadas, para IFI. A reação será realizada de acordo com ÁLVAREZ-GARCIA et al. (2002). Em todas as lâminas a serem examinadas serão adicionados controles positivos e negativos. A reação será considerada positiva quando for observada fluorescência em uma diluição do soro $\geq 1:200$, e será feita titulação dos animais positivos.

Resultados parciais:

Até o momento, foi colhido sangue de 105 receptoras (nos meses de maio, junho e julho de 2005) e 55 doadoras. Das receptoras, foi realizada a sorologia em 58, todas estavam prenhes, sendo que 30 (51,7%) foram positivas à IFI. Destes animais foi feita a titulação dos anticorpos (Tabela 1). Cinco vacas tinham histórico de aborto, sendo que destas, duas foram negativas ao exame sorológico três foram positivas. Das 55 doadoras que participaram do programa de transferência de embriões, 19 (34,5%) foram positivas à diluição de 1:200 (IFI).

Conclusões:

Ainda não há resultados a respeito da transmissão vertical e titulação de anticorpos maternos, pois está sendo feito o acompanhamento da gestação dos animais, que ainda se encontra no início. Entretanto, já foi verificado que uma grande quantidade de receptoras (51,7%) está

positiva, podendo constituir em risco para a transmissão vertical de *Neospora* para os animais, comprometendo assim o processo de transferência de embriões.

Tabela 1: Títulos de anticorpos anti-*Neospora caninum*, obtidos através da reação de imunofluorescência indireta, em 30 receptoras de embriões prenhes, em Central de Transferência, Nerópolis, Goiás.

Receptoras positivas	Titulação (IFI)	Receptoras positivas (continuação)	Titulação (IFI)
1	1/400	16	1/200
2	1/800	17	1/200
3	1/200	18	1/400
4	1/400	19	1/400
5 *	1/200	20	1/200
6 *	1/1600	21	1/200
7	1/400	22	1/200
8	1/400	23	1/200
9	1/200	24	1/400
10	1/400	25	1/200
11	1/1600	26	1/400
12	1/400	27	1/200
13	1/200	28	1/200
14 *	1/400	29	1/200
15	1/400	30	1/200

* reabsorção embrionária ocorrida aos 80 dias de gestação avaliada por ultra-sonografia, no momento da coleta de sangue.

(P8)

Isolamento de *Neospora caninum* em amostras de fetos bovinos abortados no Brasil

Okuda, L.H.¹; Pituco, E.M.¹; Stefano, E.¹; Perucini, L.M.¹.

¹Laboratório de Virose de Bovídeos, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Instituto Biológico, São Paulo. Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252. V. Mariana, Cep: 04014-002, São Paulo. E-mail: okuda@biologico.sp.gov.br.

INTRODUÇÃO

Nos últimos oito anos, a Neosporose emergiu como uma das principais enfermidades reprodutivas em bovinos. A doença está associada a quadros de encefalite em animais jovens e a problemas reprodutivos, tais como, repetição de cio, reabsorção fetal, morte embrionária e abortamentos. No Brasil, levantamentos sorológicos indicam a presença de *N. caninum* nos rebanhos nacionais, no entanto, poucos trabalhos de isolamento e identificação têm sido realizados.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi pesquisar a presença de *N. caninum* em seis fetos bovinos abortados, provenientes de diferentes propriedades dos Estados de São Paulo e Minas Gerais, recebidos no Núcleo de Reprodução Animal (NURAIB) do Instituto Biológico, para isolamento e identificação do possível agente causal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo celular:

Utilizou-se células da linhagem de rim de macaco verde africano (VERO CCL-81), acrescidas de 10% de soro eqüino (SE) para o cultivo e manutenção dos taquizoítos.

Preparo da amostras:

Foram analisadas seis amostras de cérebros bovinos, das quais foram pesadas 15 gramas, cortadas em pequenos pedaços e digeridas com tripsina 0,25% em estufa a 37° C por trinta minutos. Após este período foram lavadas, três vezes, com solução salina tamponada (PBS), centrifugadas a 1.500 rotações por minuto (r.p.m.) por 10 minutos e ressuspensas em 10 mL de meio Eagle-MEM contendo 1% de antibióticos.

Isolamento e identificação:

Foram inoculados 2 mL de cada suspensão em garrafas plásticas de 25 cm² contendo a monocamada pré-formada de células VERO CCL-81 e incubadas em estufa a 37° C por 2 horas. Após este período, os inóculos foram descartados e as monocamadas lavadas 3 vezes com PBS e adicionados 08 mL de meio Eagle-MEM contendo 2% de SE e 1% de antibióticos. As amostras foram diariamente observadas em microscópio óptico invertido, para verificar a presença de taquizoítos e cistos de *N. caninum*. A cada três dias, trocava-se o meio de manutenção.

A identificação dos taquizoítos foi realizada pela técnica de Imunofluorescência (IF), utilizando soros controles positivos e negativos para *N. caninum* e *T. gondii*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, das seis amostras analisadas, quatro apresentaram estruturas semelhantes à taquizoítos, 20 dias após inoculação em linhagem de células VERO. O resultado da IF revelou apenas fluorescência específica frente ao soro padrão anti-*Neospora caninum*. Foi também realizado diagnóstico diferencial para enfermidades virais, como HVB-1 e BVDV, com resultados negativos. Três das amostras positivas para *N. caninum* pertenciam ao Estado de Minas Gerais, enquanto que a quarta pertencia ao Estado de São Paulo (Tabela 01). Todos os isolados foram de cérebro.

As propriedades em questão apresentavam problemas reprodutivos, como repetição de cio e abortamentos, que ocorreram entre 05 a 07 meses de gestação, compatíveis com os obtidos por DUBEY & LINDSAY (1996). No caso do feto 03, localizado no município de Muzambinho, a mãe era uma vaca com histórico de abortamentos repetidos, sugestivo de neosporose, conforme relato de PARÉ *et al* (1997).

O sucesso do isolamento de *N. caninum* em cultivo celular depende da qualidade do material, o qual não pode ser submetido à temperatura de congelamento, não apresentar sinais de autólise e da quantidade do parasita presente nos tecidos (YAMANE *et al.*, 1997).

A técnica de isolamento em cultivo celular para fins de diagnóstico de *N. caninum* é demorada, uma vez que a detecção do parasita pode levar de 20 dias a 02 meses. Desta forma, as técnicas de biologia molecular, como a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), eliminariam esses problemas, além de apresentarem uma elevada sensibilidade e especificidade. Desta forma, pretende-se padronizar e implementar o PCR na rotina diagnóstica de neosporose e realizar estudos destas cepas isoladas.

Tabela 01. Isolamentos de *N. caninum* a partir de fetos bovinos abortados, segundo localidade. São Paulo, 2001.

FETO	LOCALIDADE	RESULTADO
1	Carmo do Rio Claro - MG	Positivo
2	Uberaba - MG	Positivo
3	Muzambinho - MG	Positivo
5	Angatuba - SP	Negativo
6	Nhandeara - SP	Positivo

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. Vet. Parasitology, 67, 1-59, 1996.
- PARÉ, J., THURMOND, M.C., HIETALA, S.K. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. J. Parasitol 83, 82-87, 1997.
- YAMANE, I., KOKUHO, T., SHIMURA, K. In vitro isolation and characterization of bovine *Neospora* species in Japan. Res. Vet. Sci 63, 77-80, 1997.
-

(P9)

Anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães e bovinos de propriedades rurais produtoras de leite tipo B da região norte do Estado do Paraná: Estudo da prevalência e de fatores de risco

Silvio L. P. Souza^a; José S. Guimarães^a; Denise P. Bergamaschi^b; Solange M. Gennari^a

^a Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, São Paulo CEP 05508-000, SP, Brazil, Email: sgennari@usp.br

^b Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, S.Paulo, Brazil

Introdução

O protozoário *Neospora caninum* é um importante parasito intracelular que foi primeiramente descrito em cães com alterações neurológicas, sendo considerado atualmente como o responsável por uma das mais importantes enfermidades causadoras de abortamentos em bovinos leiteiros³. O cão e o coitote são as únicas espécies reconhecidas que podem se comportar como hospedeiro definitivo, no qual ocorre o desenvolvimento sexual do protozoário resultando na eliminação de oocistos nas fezes⁴. Assim o cão vem assumir um importante papel na cadeia epidemiológica desta infecção, sendo considerado um disseminador do agente no meio ambiente, podendo contaminar os alimentos e a água. As pesquisas realizadas no decorrer dos últimos anos demonstram que a presença e o número de cães nas propriedades seria um importante fator de risco para a infecção e a ocorrência de abortamentos nos bovinos, indicando uma associação entre a infecção em ambas as espécies^{1,7}. O abortamento é a principal evidência clínica observada em vacas infectadas podendo ocorrer repetidas vezes em um mesmo animal, em qualquer estágio da gestação, sendo freqüentes entre o quinto e o sexto mês de gestação³. O forte impacto econômico causado pela neosporose proporciona prejuízos pelos abortamentos e custos indiretos, estimados em 35 milhões de dólares por ano na Califórnia. Na Austrália, o valor encontra-se em torno de 85 milhões para a indústria leiteira e 25 milhões de dólares para a produção de carne, por ano². No Brasil, país detentor de um rebanho bovino com aproximadamente 153 milhões de cabeças, onde a ocorrência de perdas fetais é um fato relativamente comum e o cão está presente na maioria das propriedades rurais, o presente estudo apresenta como objetivos estimar a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* nos bovinos e cães provenientes de propriedades rurais da região norte do Estado do Paraná e analisar a presença do cão e outros possíveis fatores de risco associados a infecção nos bovinos.

Material e Métodos

As amostras sanguíneas dos cães e bovinos avaliados no presente estudo foram procedentes de 23 propriedades rurais produtoras de leite tipo B localizadas em nove municípios da região norte do Estado do Paraná. A amostragem de bovinos foi obtida a partir de um rebanho composto por 3058 fêmeas, predominantemente da raça Holandesa Preta e Branca, sendo 24,8% novilhas (12–24 meses) e 75,2% vacas (acima de 24 meses). Amostras de todos os cães habitantes dessas propriedades foram colhidas. No intuito de determinar a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* e fatores de risco associados, 623 amostras de soros de fêmeas bovinas leiteiras e 134 amostras de cães foram analisadas mediante o emprego da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) com ponto de corte de 25 para bovinos e 50 para cães. Questionário contendo tópicos relacionados a neosporose foi aplicado em todas as propriedades. Para o cálculo de associação entre o estado sorológico dos bovinos e variáveis ligadas ao ambiente e manejo, utilizou-se o Coeficiente de Correlação de Pearson e Regressão logística.

Resultados

O questionário abordou aspectos epidemiológicos relacionados ao agente, presença de cães na propriedade, histórico de abortamento, sistema de manejo, alimentação de bovinos e cães. Os resultados obtidos a partir da pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* nas amostras de soro sanguíneo dos cães e bovinos estão representados na Tabela 1. Em relação aos cães anticorpos anti-*N. caninum* foram encontrados em 29 (21,6%) das 134 amostras e os cães soropositivos estavam presentes em 14 (63,6%) das 22 propriedades estudadas. Na população de bovinos constatou-se 89 (14,4%) animais positivos distribuídos por 21 (91,3%) das 23 propriedades avaliadas. A análise de associação entre a prevalência de anticorpos na população de bovinos e em caninos indicou a existência de uma correlação positiva fraca. Os animais acima de 24 meses apresentaram uma maior proporção de positivos, constituindo um fator de risco para a infecção.

Tabela 1 – Prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em soros de bovinos e cães provenientes de propriedades produtoras de leite tipo B da região norte do Estado do Paraná

PROPRIEDADES	CÃES (RIFI \geq 50)		BOVINOS (RIFI \geq 25)	
	Examinados	Positivos (%)	Examinados	Positivos (%)
1	4	1 (25,0)	28	3 (10,7)
2	7	2 (28,5)	35	3 (8,6)
3	1	0 (0)	30	2 (6,7)
4	5	0 (0)	26	5 (19,2)
5	17	3 (17,6)	25	5 (20,0)
6	5	1 (20,0)	25	5 (20,0)
7	0	0 (0)	24	0 (0)
8	5	1 (20,0)	28	6 (21,4)
9	6	0 (0)	26	1 (3,8)
10	3	2 (66,6)	27	8 (29,6)
11	3	1 (33,3)	23	3 (13,0)
12	13	2 (15,3)	34	4 (11,8)
13	6	3 (50,0)	26	3 (11,5)
14	11	2 (18,1)	26	1 (3,8)
15	4	3 (75,0)	25	7 (28,0)
16	14	3 (21,4)	34	1 (2,9)
17	19	4 (21,0)	28	6 (21,4)
18	2	0 (0)	27	4 (14,8)
19	3	0 (0)	22	6 (27,3)
20	1	0 (0)	26	0 (0)
21	2	0 (0)	25	2 (8,0)
22	3	1 (33,3)	28	9 (32,1)
23*			25	5 (20,0)

TOTAL	134	29 (21,6)	623	89 (14,3)
--------------	-----	-----------	-----	-----------

* A propriedade foi incluída posteriormente ao delineamento, não sendo colhidas amostras de cães.

Conclusões

A partir da análise dos resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que anticorpos anti-*N. caninum* estão presentes nos rebanhos bovinos e nos cães das propriedades produtoras de leite tipo B da região norte do Estado do Paraná. A presença de cães soropositivos nas propriedades demonstrou uma correlação positiva em relação à ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* na população de bovinos. A idade das fêmeas constitui-se um fator de risco para a presença de anticorpos anti-*N. caninum* com as fêmeas de 24 meses ou mais apresentando maior prevalência. A alimentação à base de silagem e concentrado produzidos na propriedade constituiu-se em fatores de proteção com os animais assim alimentados apresentando menor soropositividade ao agente^{5,6}.

Agradecimentos

FAPESP: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo.

Referências Bibliográficas

1. BARTELS, C. J.; WOUDA, W.; SCHUKKEN, Y.H. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology*, v. 52, n.2, p. 247-257, 1999.
2. DUBEY, J.P. Recent advances in *Neospora* and Neosporosis. *Veterinary Parasitology*. v. 84, n. 3-4, p. 349-367, 1999.
3. DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, v. 67, n. 1-2, p. 1-59, 1996.
4. GONDIM, LFP; MCALLISTER, M.M.; PITT, W.C.; ZEMLICKA, D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, v. 34, n. 2, p.159-161, 2004.
5. GUIMARÃES, J.S.; SOUZA, S.L.P.; BERGAMASCHI, D.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 124, n.1-2, p.1-8, 2004.
6. SOUZA, S.L.P.; GUIMARÃES, J.S.; FERREIRA, F.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Parana, Brazil. *Journal of Parasitology*, v.88, n.2, p. 408-409, 2002.
7. WOUDA, W.; DIJKSTRA, T.; KRAMER, A. M. H.; VAN MAANEN, C.; BRINKHOF, J. M. A. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *International Journal for Parasitology*, v.54, n. 10, p. 1579-1584, 1993.

(P10)

Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis Estados brasileiros

Ragozo, A.M.A.^a; de Paula, V.S.O.^a; Souza, S.L.P.^a; Bergamaschi, D.P.^b; Gennari, S.M.^a

^a Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina, Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, São Paulo, CEP 05508-000, SP, Brasil

^b Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, S.Paulo, Brasil

A neosporose é causada por um protozoário formador de cistos teciduais, *Neospora caninum*, o qual até 1988 era confundido com *Toxoplasma gondii*, porém são agentes distintos

em sua ultraestrutura, imunogenicidade e patogenicidade ao hospedeiro. Este agente, desde sua descoberta é freqüentemente diagnosticado no mundo todo em várias espécies animais, como os bovinos¹, nos quais é responsável por abortamentos, nascimento de animais prematuros além de problemas neuromusculares⁴. Devido à alta prevalência nos bovinos, *N.caninum* está emergindo mundialmente como uma das maiores causas de abortamentos nessa espécie, sendo reconhecido como responsável por perdas econômicas na pecuária⁴. A transmissão pode ocorrer pela via vertical, transplacentária ou horizontal, através da ingestão de oocistos eliminados pelos hospedeiros definitivos, o cão⁶ e o coiote⁵. Há vários relatos da ocorrência de anticorpos anti-*N.caninum* no Brasil, com valores que variam de 7,7%² a 67,85%³, porém em levantamentos sorológicos nem sempre é possível serem feitas comparações dos estudos devido ao uso de diferentes pontos de corte/ou técnicas sorológicas. Devido a grande importância do *N.caninum* em rebanhos bovinos no mundo inteiro e pelo conhecimento limitado da prevalência do agente no Brasil, este trabalho teve como objetivo, conhecer a ocorrência de anticorpos anti-*N.caninum* em bovinos oriundos de rebanhos de seis Estados brasileiros.

Material e Métodos

As amostras utilizadas pertenciam a um banco de soros constituído por 2336 fêmeas bovinas, colhidas entre os anos de 1996 a 2000 de propriedades com pecuária de corte e leite dos Estados do Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo. Os Estados foram contemplados por 10 propriedades cada um, exceto Minas Gerais e Paraná que foram compostos por nove e seis propriedades respectivamente. A amostragem foi baseada numa prevalência de 50%, intervalo de confiança de 95%, precisão de 3% e acrescido de 10% para eventuais perdas, utilizando o programa estatístico Epi-Info. O tamanho da amostra, 802 soros, representa 34% do total de soros disponíveis no banco original, o mesmo percentual foi utilizado para o cálculo do número da amostra por Estado e por aptidão animal (corte ou leite) e obtidos do banco de soro de forma aleatória por propriedade. Os animais estudados apresentavam idades variando de três a 180 meses com idade média de 65,5 meses (5,5 anos). O diagnóstico foi realizado pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ponto de corte utilizado foi de 25. As amostras positivas foram diluídas na base dois até o título final no qual a fluorescência era observada.

Resultados

Do total de 802 amostras, 189 apresentaram-se positiva (RIFI \geq 25), com ocorrência de anticorpos anti-*N.caninum* de 23,6%. Caso fossem utilizados pontos de corte de 100 e 200, os valores seriam, respectivamente, 13,7% (110/802) e 10,2% (82/802). Os títulos variaram de 25 a 3200 (Tabela 1). Com relação a aptidão, 519 (64,7%) eram de leite e 283 (35,3%) de corte, sendo observado entre os animais de leite, 26,2% de soropositivos comparados com 19,1% dos de corte. A maior proporção de resultados positivos foi observada nos estados do Mato Grosso do Sul e Minas Gerais. Os estados do Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Paraná apresentam ocorrência de soropositivos inferior à média geral, 23,6% (Tabela 2). Observou-se 12,5% de soropositivos nos animais com menos de 24 meses e nos acima dessa idade a proporção de soropositivos foi superior a 20% (Tabela 3). Entretanto não houve diferença na proporção de animais positivos nas diferentes faixas etárias estudadas. Em relação aos bovinos de leite, Minas Gerais apresentou o maior percentual de soropositivos (34,4%) e Rio Grande do Sul, o menor (18,6%). No rebanho de corte, maiores percentuais de soropositivos são observados entre os animais de Mato Grosso do Sul, Paraná e Rio Grande do Sul, ficando Rio de Janeiro e Minas Gerais com os menores valores.

Conclusões

Considerando os dados obtidos neste estudo pode-se concluir que bovinos positivos à presença de anticorpos anti-*N.caninum* estão presentes nos seis estados brasileiros estudados (Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo). A maior ocorrência ocorreu no Estado do Rio de Janeiro e dentre os bovinos com aptidão leiteira. Os estados do Mato Grosso do Sul e Paraná apresentaram as maiores ocorrências entre os bovinos de corte e Minas Gerais entre os de leite. A diferença na proporção de animais positivos e negativos nas diferentes idades não foi observada.

Tabela 1 – Distribuição da frequência de bovinos soropositivos, segundo títulos de anticorpos anti-*N.caninum*, de seis estados brasileiros

Título	Número de bovinos positivos	%
25	46	24,3
50	33	17,5
100	28	14,8
200	35	18,5
400	18	9,5
800	14	7,4
1600	11	5,8
3200	4	2,1
Total	189	100

Fonte: RAGOZO et al., 2003.

Tabela 2 – Distribuição da frequência de bovinos soropositivos a anticorpos anti-*N.caninum* segundo a Unidade da Federação

Unidade da Federação	Animais testados	Animais positivos	(%)
Mato Grosso do Sul	110	31	28,2
Minas Gerais	162	47	29,0
Paraná	90	20	22,2
Rio de Janeiro	150	22	14,7
Rio Grande do Sul	140	28	20,0
São Paulo	150	41	23,6
Total	802	189	23,6

Fonte: RAGOZO et al., 2003

Tabela 3 – Distribuição da frequência de bovinos soropositivos a anticorpos anti-*N.caninum* procedentes de seis estados brasileiros segundo idade

Idade (meses)	Examinadas	Positivos	%
0 --24	24	3	12,5
24 --48	168	34	20,2
48 --72	277	71	25,6
72 --181	324	78	24,1
Total	793*	186	23,5

* somente 793 dos 802 bovinos sorteados tinham a idade declarada

Fonte: RAGOZO et al. (2003)

Referências Bibliográficas

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

2. ANDREOTTI, R.; PINCKNEY, R.; GOMES, A. Diagnóstico sorológico de um rebanho bovino de corte de Mato Grosso do Sul. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11., Salvador, 1999. Anais.... Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999. p. 226.
3. BELO, M. A. A.; REZENDE, L. M.; COSTA, A. J. Presença de anticorpos contra *Neospora caninum* em bovinos com histórico de abortos não diagnosticados etiologicamente. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11., Salvador, 1999. Anais.... Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999. p. 229.
4. DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, v. 67, n. 1-2, p. 1-59, 1996.
5. GONDIM, LFP; MCALLISTER, M.M.; PITT, W.C.; ZEMLIKA, D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*. V. 34, n. 2, p.159-161, 2004.
6. 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, n. 6, p. 647 - 655, 1996.
7. RAGOZO, Alessandra Mara Alves; GENNARI, Solange Maria; PAULA, V S O de; SOUZA, S L P de; BERGAMASCHI, D P. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos procedentes de seis Estados brasileiros. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 12, n. 1, p. 33-37, 2003.

(P11)

Obtención y estudio de la variabilidad biológica de nuevos aislados de *Neospora caninum*

Javier Regidor-Cerrillo¹, Luis Miguel Ortega-Mora², Andréa Caetano da Silva³

¹- Becario post-doctoral - Departamento de Sanidad Animal – Facultad de Veterinaria- Universidad Complutense de Madrid, España. javiregi@yahoo.es

²- Universidad Complutense de Madrid

³- Universidade Federal de Goiás

Durante la última década, desde la descripción del parásito *Neospora caninum* en 1988 (Dubey et al., 1988) y su implicación como agente causal del fallo reproductivo en el ganado bovino desde 1989 (Thilsted & Dubey, 1989), numerosos grupos de investigación han abordado el estudio de la epidemiología y patogenia de la neosporosis, así como, el desarrollo de métodos de diagnóstico adecuados y de estrategias de control efectivas frente a esta infección. Sin embargo, hasta la fecha muy pocos grupos de investigación han abordado de forma exhaustiva el estudio de la variabilidad biológica existente dentro de la especie *N. caninum*. Queda claro, por tanto, la necesidad de emprender nuevas investigaciones conducentes a profundizar en el conocimiento de la heterogeneidad intraespecie de *N. caninum* y conocer su implicación en la epidemiología y patogenia de la neosporosis, enfermedad de elevada prevalencia y gran repercusión económica. Tanto en estudios con modelos de infección experimental como en estudios “*in vitro*” se ha confirmado la existencia de diferencias significativas en la patogenicidad y virulencia de los aislados analizados (Atkinson et al., 1999, Schock et al., 2001, Collantes-Fernandez et al., 2005), así como la diversidad genética intraespecie existente en *N. caninum* mediante la utilización de la técnica de RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA analysis*) (Davison et al., 1999, Atkinson et al., 1999, Spencer et al., 2000; Schock et al., 2001). Si bien debemos destacar que el reducido número de aislados de laboratorio analizados en los estudios mencionados y la limitación de la técnica empleada para la caracterización genética restringida únicamente a aislados de laboratorio, impide conocer con exactitud la implicación de la virulencia con la presentación de la enfermedad en el modelo natural y la identificación de

posibles marcadores genéticos ligados a la procedencia geográfica, hospedador de origen o virulencia.

En este sentido, dentro del Proyecto de Cooperación Internacional CAPES-Brasil/Ministerio de Educación y Ciencia-España, **NEOSPOROSIS BOVINA: PREVALENCIA, TRANSMISIÓN Y VARIABILIDAD BIOLÓGICA ENTRE AISLADOS**, se contempla el estudio de la variabilidad biológica presente en diferentes aislados de origen español y brasileño. Para ello, el proyecto propone la obtención de nuevos aislados de *N. caninum* de diferentes hospedadores, procedentes de distintas regiones de España y del estado de Goias, que serán sometidos al estudio comparativo de distintas variables biológicas, centrándose principalmente en las diferencias existentes en patogenicidad y en los perfiles genéticos estudiando las posibles relaciones entre marcadores genéticos diferenciales y patrones de comportamiento de la neosporosis en el modelo natural. Hasta el día de hoy hemos obtenido varios aislados de procedencia española y actualmente hemos iniciado la obtención de nuevos aislados brasileños.

La caracterización patogénica de los diferentes aislados de *N. caninum* se realizará mediante infecciones en un modelo experimental murino (Collantes-Fernandez et al., 2005). Para ello diferentes grupos de ratones BALBc serán inoculados intraperitonealmente con una dosis de 10^6 taquizoítos de los diferentes aislados, que se sacrificarán secuencialmente los días 1, 2, 4, 8, 16 y 32 postinoculación. A lo largo de este estudio longitudinal se evaluarán la morbilidad y mortalidad y, tras el sacrificio, se recogerá sangre y diferentes órganos (encéfalo y pulmón) donde se valorará mediante estudio histológico la presencia y grado de las lesiones compatibles con neosporosis (Pereira-Bueno et al., 2003), mediante PCR-cuantitativa (Collantes-Fernández et al., 2002) la presencia y cantidad de ADN del parásito con el fin de evaluar su tropismo orgánico y, finalmente, mediante una prueba de ELISA específica para IgG1 e IgG2a la respuesta inmunehumoral desarrollada frente a la infección.

En cuanto a la caracterización genética, se llevará a cabo mediante el estudio de secuencias microsatélites altamente polimórficas identificadas recientemente en el genoma de *N. caninum* (Pedraza-Díaz et al., 2005, Regidor-Cerrillo et al., 2005). Micro- y minisatélites están constituidos por secuencias nucleotídicas sencillas de 2 a 5 nucleótidos que se repiten en tandem y que se caracterizan por un elevado polimorfismo, principalmente en función del número de repeticiones del motivo nucleotídico que presente. Este tipo de secuencias han sido descritas en multitud de organismos, incluyendo protozoos, y han sido extensamente utilizadas para el genotipado de diferentes parásitos apicomplejos incluyendo a *Toxoplasma gondii* (Ajzenberg et al., 2002). Estudios preliminares desarrollados por nuestro grupo de investigación basados en el estudio de 13 microsatélites en 9 aislados con distinto origen geográfico y de hospedador, han revelado el elevado polimorfismo presente en algunos de los microsatélites estudiados permitiendo la identificación y discriminación de los 9 aislados analizados. Debemos destacar que debido a su aplicabilidad a muestra clínica se constituyen en una herramienta útil para identificar los aislados circulantes en el campo, base de los estudios de epidemiología molecular a una mayor escala y del diseño de vacunas.

Bibliografía

- Ajzenberg DAL, Banuls L, Tibayrenc M, Darde ML. 2002. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int.J.Parasitol.* 32:27-38.
- Atkinson R, Harper PA, Ryce C, Morrison DA, Ellis JT. 1999. Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology* 118 (Pt 4):363-370.
- Collantes-Fernandez E, Lopez-Perez I, Alvarez-Garcia G, Ortega-Mora LM. 2005. Temporal Distribution and Parasite Load Kinetics in Blood and Tissues during *Neospora caninum* Infection in Mice. *Infeccion and Inmunity*, In Press.
- Collantes-Fernandez E, Zaballos A, Alvarez-Garcia G, Ortega-Mora LM. 2002. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 4:1194-8.
- Davison HC, Guy F, Trees AJ, Ryce C, Ellis JT, Otter A, Jeffrey M, Simpson VR, Holt JJ. 1999. In vitro isolation of *Neospora caninum* from a stillborn calf in the UK. *Res Vet Sci* 67(1):103-105.

- Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS, Topper MJ. 1988. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. JAVMA 193(10): 1259-1263.
- Pedraza-Díaz, S., Regidor-Cerrillo, J., Gómez-Bautista, M., Ortega-Mora, L. M. (2005). Multilocus microsatellite análisis reveals extensive genetic diversity in *Neospora caninum*. 2nd Annual COST meeting 857 "Apicomplexa biology in the post-genomic era". May, Beatenberg, Switzerland.
- Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozalo A, Pérez-Pérez V, Espi-Felgueroso A, Álvarez-García G, Collantes-Fernández E, Ortega-Mora LM. 2003. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. Vet Parasitol 111: 143-152
- Regidor-Cerrillo J, Pedraza-Díaz D, Gómez-Bautista M, Ortega-Mora LM. Multilocus microsatellite analysis reveals extensive genetic diversity in *Neospora caninum*. (En Prensa).
- Schock A, Innes EA, Yamane I, Latham SM, Wastling JM. 2001. Genetic and biological diversity among isolates of *Neospora caninum*. Parasitology 123(Pt 1):13-23.
- Spencer JA, Witherow AK, Blagburn BL. 2000. A random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction technique that differentiates between *Neospora* species. J Parasitol 86(6):1366-1368.
- Thilsted JP, Dubey JP, 1989. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. J Vet Diagn Invest 1: 205-09.

(P12)

Projeto de cooperação internacional CAPES-MECD Espanha: "Neosporose bovina: prevalência, transmissão e variabilidade biológica entre isolados"

Andréa Caetano da Silva¹, Luis Miguel Ortega Mora²

¹- Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – Universidade Federal de Goiás – Caixa Postal 131 – Goiânia, GO. andrea@iptsp.ufg.br

²- Universidad Complutense de Madrid

Este projeto tem como objetivos determinar a freqüência de neosporose em bovinos da região de Goiânia, assim como avaliar a importância de *Neospora caninum* em abortos bovinos. Estudar a transmissão de *N. caninum*, tanto vertical como horizontal, em infecções naturais e experimentais de bovinos. Obter novos isolados de *N. caninum*, autóctones do Brasil e da Espanha, para realizar a sua caracterização patogênica, antigênica e genética, com a finalidade de estabelecer e diferenciar padrões genéticos e antigênicos relacionados à virulência e à capacidade imunogênica do isolado. O plano de trabalho, incluído no projeto original, foi realizado propondo atividades para quatro anos de duração (2004-2007).

Prevalência da neosporose em bovinos de Goiânia

Em relação a este objetivo foram colhidas 930 amostras de soro de animais pertencentes a 21 rebanhos, sendo 11 leiteiros, 9 de carne e um de exploração mista. Os soros foram analisados pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI). A prevalência encontrada foi de 30,4%, sendo muito semelhante para bovinos de leite e corte (30,4% e 29,6% respectivamente). Este estudo foi parte da dissertação de mestrado da aluna Débora Pereira Garcia Melo e o artigo com os resultados obtidos está escrito e sendo submetido à publicação. Soros colhidos de bovinos de todo o estado de Goiás, pela Agência Rural (em torno de 7000 soros), serão analisados pela técnica de ELISA e os resultados serão analisados e submetidos à publicação ainda em 2005.

Importância de N. caninum em abortos bovinos

Dos fetos bovinos que são enviados para diagnóstico à Escola de Veterinária/UFG estão sendo colhidas amostras de cérebro, fígado, coração e se possível líquidos fetais para o diagnóstico molecular (PCR) e sorológico (IFI) de *N. caninum*.

Estudo da transmissão vertical em rebanhos bovinos de Goiânia

Foram colhidas amostras pareadas das mães e dos bezerros, no momento do parto, em uma exploração leiteira de Nerópolis. Foi observada neste estudo, até o momento, a existência de 62,5% de transmissão vertical da infecção. Esta porcentagem é semelhante às obtidas em estudos na Europa e Estados Unidos. Este estudo será continuado em 2005/2006 em um rebanho da EMBRAPA em Goiânia e em receptoras de transferência de embriões em uma central de transferência localizada em Nerópolis, Goiás. Este objetivo é parte da dissertação de mestrado da Aluna Vanessa Silvestre, do curso de mestrado em Ciência Animal da UFG.

Infecção experimental de touros bovinos

Este estudo foi iniciado e touros foram infectados no mês de novembro de 2004. No momento estão sendo colhidas amostras de sêmen e sangue para análise laboratorial das mesmas.

Isolamento de cepas de *N. caninum*

O estudo patogênico dos diferentes isolados obtidos está sendo realizado em um modelo experimental murino. Desta forma, mediante estudos comparativos serão estudadas as diferenças existentes, que poderão ser extrapoladas ao modelo bovino natural onde poderão ser identificadas cepas avirulentas. A avaliação do perfil antigênico e patogênico dos diferentes isolados será um fator chave para o desenvolvimento de novos produtos de diagnóstico e vacinais, eficazes para a neosporose. No laboratório espanhol já foram obtidos quatro novos isolados de *N. caninum* a partir de amostras colhidas de bezerros infectados congenitamente. A caracterização patogênica, molecular e antigênica destes isolados está sendo realizada. A aluna de Doutorado em Ciência Animal da Escola de Veterinária/UFG, Débora Pereira Garcia Melo, obteve uma bolsa de doutorado sanduíche através do projeto, para participar da caracterização patogênica dos isolados espanhóis e aprender técnicas para serem desenvolvidas com as cepas isoladas no Brasil. Também se encontra atualmente, na Universidade Federal de Goiás, o Dr. Javier Regidor Cerrillo, bolsista de pós-doutorado espanhol, com bolsa obtida pelo presente projeto, para realizar isolamento de novas cepas no Brasil. Já estão sendo realizados isolamentos de novas cepas, à partir de cérebro de bezerros congenitamente infectados, que foram inoculados em camundongos IFN- γ ko.

Além da qualificação de pessoal, através dos intercâmbios realizados até o momento está sendo possível a implementação de novas técnicas de diagnóstico e pesquisa em neosporose bovina em nosso laboratório, que poderão ser utilizadas tanto no âmbito da Universidade, quanto pela comunidade e produtores rurais de Goiás.

(P13)

Avaliação da frequência de anticorpos para *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper e Ugglá, 1988) e para *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1908) Nicolle e Manceaux, 1909, em pessoas soropositivas para o vírus da imunodeficiência humana (HIV)

Paula Gonçalves Filippon, Camille Pâmela Benatti, Cristina Fialho, Lorena Eva Bigatti, Flávio Antônio Pacheco de Araujo, João Henrique Correa Kanan, Neusa Saltiel Stobbe.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Rua Sarmiento Leite, nº 500, sala 158. Bairro Centro. Porto Alegre/RS. CEP 90.050-170.

Email: neusa.stobbe@ufrgs.br .

Embora a presença de anticorpos para *Neospora caninum* já tenha sido observada em doadores de sangue, pouco se sabe sobre os reais riscos deste protozoário para a saúde humana. Tendo em vista que a toxoplasmose é a segunda causa de morte imediata em aidéticos, os autores julgam importante investigar a possibilidade da neosporose constituir parasitose oportunista neste tipo de paciente. O presente projeto, que se encontra em andamento, tem como objetivos verificar a presença de anticorpos contra *Neospora caninum*, assim como contra *Toxoplasma gondii*, e relacionar a sua ocorrência com a condição de soropositividade para o vírus da imunodeficiência adquirida em seres humanos. Foram constituídos dois grupos experimentais; o primeiro (grupo I) com 250 amostras de soro de pessoas soropositivas para o vírus HIV, constatadas pelos testes de ELISA e imunofluorescência indireta, e o segundo (grupo II) com 250 amostras de soro de pessoas soronegativas para o mesmo vírus, constatadas pela técnica de ELISA. Em ambos os grupos será verificada a presença de anticorpos das classes IgG e IgM para *N. caninum* e *T. gondii* através da reação de imunofluorescência indireta, considerando-se positivas aquelas reações com fluorescência periférica completa dos taquizoítas. Os soros serão testados nas diluições 1:25 e 1:50 frente ao antígeno de *N. caninum* e 1:64 frente ao antígeno de *T. gondii*. A análise estatística dos resultados será feita através do teste Qui-quadrado para verificar associação entre presença ou ausência de anticorpos para *N. caninum* e *T. gondii* e os grupos experimentais, ao nível de significância de 5%. Até o presente momento, foram coletadas 131 amostras do grupo I e todas as amostras do grupo II, as quais foram testadas para a presença de anticorpos da classe IgG contra *T. gondii*. Os resultados encontrados até então mostram que foram positivas 60,3% (79/131) e 47,2% (118/250) das amostras dos grupos I e II, respectivamente. Embora ainda não tenha sido realizada a análise estatística, observa-se uma tendência, já esperada, de maior frequência de anticorpos para *T. gondii* nas pessoas soropositivas para o vírus da imunodeficiência adquirida.

(P14)

**Projeto de pesquisa:
Quantificação da expressão gênica de citocinas em tecidos de bovinos infectados
com *Neospora caninum***

Sandra M. Nishi¹, Solange M. Gennari¹, Rodrigo M. Soares¹, Paulo C. Maiorka²,
Elisabeth Innes³

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, ²Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo

³ Moredun Research Institute, Edinburgh, Scotland

Email: smnishi@usp.br

A infecção pelo *Neospora caninum* é apontada como um dos principais responsáveis por abortamentos e por natimortalidade em rebanhos bovinos em diversos países. Desde a sua descrição em 1988, importantes avanços foram feitos na elucidação de suas características biológicas e epidemiológicas. Atualmente o estudo dos mecanismos envolvidos na interação entre o hospedeiro e parasita é foco de inúmeras investigações.

Do ponto de vista do hospedeiro, sabe-se que a ativação dos mecanismos específicos de proteção do sistema imunológico é capaz de reduzir as perdas por abortamentos e diminuir a transmissão vertical do parasita. De modo similar à observada na resposta contra diversas infecções intracelulares, a resposta mediada por células envolvendo linfócitos T helper do tipo 1 (Th1) é um importante evento no controle da infecção pelo *N. caninum*.

A ativação desta resposta Th1 ocorre de forma gradativa e conta com a participação de diversos tipos celulares que se comunicam por meio da produção e secreção de diversas citocinas, agindo de forma local ou sistemicamente. São inúmeros os mediadores que são

ativados no decorrer da infecção, entretanto, alguns destes como a interleucina-12 (IL-12), o interferon-gama (IFN- γ), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o IL-10 se destacam por levar a infecções fatais quando do bloqueio da atividade ou da repressão dos genes responsáveis pela codificação destas proteínas.

Em camundongos as diferenças na resistência à infecção pelo *N. caninum* é observada em diferentes linhagens e está associada a diferentes padrões de produção de citocinas. Na espécie bovina, por sua vez, está bem documentada a maior resistência das raças zebuínas quando comparados às raças taurinas em relação à infecção por helmintos e ectoparasitos. Não existem, entretanto, registros de diferenças na resposta contra o *N. caninum*.

O presente projeto tem como objetivo determinar a expressão gênica de citocinas em bovinos zebuínos e taurinos infectados por *N. caninum*, verificando possíveis diferenças no padrão de resposta entre as raças.

Serão utilizadas as técnicas da Real-Time RT-PCR para quantificação de variações na expressão gênica de IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-4, TGF- β e iNOS e a imunistoquímica para a identificação de células T CD4⁺, CD8⁺, macrófagos e *N. caninum* em diferentes amostras de tecido.

Até o presente momento, a seleção dos animais de produção é realizada com base no fenótipo dos animais e índices de produtividade como ganho de peso, conversão alimentar, produção leiteira e qualidade de carcaça. O estudo da genômica funcional possibilitará uma melhor compreensão dos mecanismos de resistência a doenças e desta maneira poderá contribuir para a identificação de possíveis genes candidatos para programas de seleção animal, assim como contribuir para o direcionamento no desenvolvimento de imunostimulantes e de adjuvantes de vacinas.

Referências bibliográficas:

- ALMERIA, S.; DE MAREZ, T.; DAWSON, H.; ARAUJO, R.; DUBEY, J.P.; GASBARRE, L.C. Cytokine gene expression in dams and fetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. **Parasite Immunology**, v. 25, n. 7, p. 383-392, 2003.
- BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 169-193, 2000.
- DAWSON, H.D.; ROYAE, A.R.; NISHI, S.M.; KUHAR, D.; SCHNITZLEIN, W.M.; ZUCKERMANN, F.A.; URBAN JR, J.F.; LUNNEY, J.K. Identification of key immune mediators regulating T helper 1 responses in swine. **Vet. Immunology and Immunopathology**, v. 100, n. 1-2, p. 105-111, 2004.
- GONZÁLEZ, L.; ANDERSON, I.; DEANE, D.; SUMMERS, C.; BUXTON, D. Detection of immune system cells in paraffin wax-embedded ovine tissues. **Journal of Comparative Pathology**, v. 125, n. 1, p. 41-47, 2001
- INNES, E.A.; PANTON, W.R.M.; MARKS, J.; TREES, A.J.; HOLMDAHL, J.; BUXTON, D. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of ³H uracil. **Journal of Comparative Pathology**, v. 113, n. 95-100, 1995.
- LONG, M.T., BASZLER, T.V., MATHISON, B.A. Comparison of intracerebral parasite load, lesion development and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, v.84, p.316-320, 1998.
- LUNDÉN, A.; MARKS, J.; MALEY, S.W.; INNES, E.A. Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. **Parasite Immunology**, v. 20, n. 519-526, 1998.
- SONSTEGARD, T.S., GASBARRE, L.C. Genomic tools to improve parasite resistance. **Veterinary Parasitology**, v.101, p.387-403, 2001
- STASKA, L.M., MCGUIRE, T.C., DAVIES, C.J., LEWIN, H.A., BASZLER, T.V. *Neospora caninum*-infected cattle develop parasite CD4⁺ cytotoxic T lymphocytes. **Infection and Immunity**, v.71, p. 3272-3279, 2003.
- ZARLENGA, D.S.; HIGGINS, J. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. **Vet. Parasitology**, v.101, p.215-230, 2001.

(P15)

Inquérito soroepidemiológico do *Neospora caninum* em bovinos criados na região semi-árida do Estado da Bahia

Jesus, E. E. V.; Uzêda, R. S.; Pinheiro, A. M.; Menk, J. C. F.; Almeida, M. A. O.

Universidade Federal da Bahia / Escola de Medicina Veterinária / Laboratório de Diagnóstico das Parasitoses dos Animais - Av Ademar de Barros, 500, Ondina. CEP: 40170-110 e-mail: rouzeda@ufba.br

A neosporose é uma importante causa de abortamentos e mortalidade neonatal em bovinos. Apesar da existência de vários estudos sorológicas sobre a neosporose em bovinos no país, nenhum deles contemplou a região semi-árida. Desta forma, objetivou-se estimar a soroprevalência de anticorpos IgG anti-*N. caninum* em bovinos criados em quatro municípios da região semi-árida do Estado da Bahia. Para tanto, foram colhidas 844 amostras sorológicas oriundas de 44 rebanhos localizados em quatro municípios baianos. A técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI) foi utilizada para a detecção de anticorpos IgG anti-*N. caninum*. Utilizou-se como antígeno, taquizoítos da cepa NC-Bahia, mantida em cultura celular no Laboratório de Diagnóstico das Parasitoses dos Animais da Escola de Medicina Veterinária da UFBA. Os soros foram testados adotando-se como ponto de corte a diluição sérica de 1:200. Do total de animais testados, 88 animais (10,4%) apresentaram reação positiva com títulos que variaram de 1:200 a superiores a 1:800. Esse resultado é indicativo de que bovinos do semi-árido estão expostos ao parasita.

(P16)

Ocorrência de anticorpos IgG anti-*Neospora caninum* em rebanho de ovinos no Estado da Bahia

Otero, A.R.S.; Uzêda, R. S.; Jesus, E. E. V.; Pinheiro, A.M.; Almeida, M. A. O

Universidade Federal da Bahia / Escola de Medicina Veterinária
Laboratório de Diagnóstico das Parasitoses dos Animais
Av. Ademar de Barros, 500, Ondina. CEP: 40170-110, e-mail: rouzeda@ufba.br

A neosporose, causada pelo protozoário coccídeo *Neospora caninum*, tem sido reconhecida como uma doença economicamente importante, por provocar distúrbios reprodutivos em várias espécies. Este estudo verificou a ocorrência de anticorpos IgG anti-*N. caninum*, pelo teste de Imunofluorescência Indireta e identificou frações imunorreativas no Immunoblotting de 282 amostras séricas de ovinos de 10 rebanhos do Estado da Bahia. Observou-se 7,4% (21/282) de reações positivas com ponto de corte de 1:50 e títulos variando de 1:50 a 1:800. Dos rebanhos examinados, seis apresentaram ovinos sororreagentes, com positividade variando de 2,5 a 32,0%. No Immunoblotting, foram selecionadas aleatoriamente 16 amostras, divididas em dois grupos: soros positivos e soros negativos para anticorpos anti-*N. caninum*. O grupo positivo reconheceu determinantes antigênicos de 10 a 18 polipeptídios, da cepa NC-Bahia de *N. caninum*, entre 11 e 93 KDa, sendo observada maior reatividade com as proteínas 27 - 31 KDa e 36 - 41 KDa, relatadas como Nc-SAG-1 e Nc-SRS-2, respectivamente. Os anticorpos IgG, presentes no soro negativo de um ovino, reconheceram os peptídeos de *N. caninum* de 21, 23, 67, 83 e 110 KDa, não relacionadas com proteínas importantes do parasito. A determinação da evidência sorológica da infecção por *N. caninum* e o seu reconhecimento antigênico nos ovinos é necessária para o estudo da resposta imune humoral e para os modelos epidemiológicos da neosporose.

(P17)

Inquérito sorológico do *Neospora caninum* em caprinos do Estado da Bahia.

Uzêda, Rosângela Soares; Jesus, E.E.V.; Pinheiro, A.M.; Almeida, M.A.O.; Gondim, L.F.P.;
Barbosa Jr, H.V.

Universidade Federal da Bahia / Escola de Medicina Veterinária
Laboratório de Diagnóstico das Parasitoses dos Animais
Av Ademar de Barros, 500, Ondina. Cep: 40170-110
e-mail: rouzeda@ufba.br

Neospora caninum, protozoário coccídeo, é causador de uma importante doença que constitui a principal causa de abortamentos em bovinos leiteiros do mundo. Com relação à espécie caprina, há poucos relatos acerca do parasita na literatura mundial, o primeiro deles ocorreu em 1992, e no Brasil, a primeira evidência se deu no ano de 2001. A caprinocultura constitui uma atividade de fundamental importância para o nordeste brasileiro, sobretudo para a Bahia que detém cerca de 40% do rebanho nacional. Desta forma é imprescindível o estudo de doenças que possam acometer o desempenho desses rebanhos e que podem determinar prejuízos econômicos. Objetivando conhecer a prevalência de anticorpos da classe G em rebanhos de caprinos leiteiros baianos, 384 amostras sorológicas pertencentes a soroteca do Laboratório de Diagnóstico das Parasitoses dos Animais da Universidade Federal da Bahia, oriundas de quatro microrregiões homogêneas do Estado, foram testadas por meio da técnica de Imunofluorescência Indireta com lâminas sensibilizadas com taquizoítos da cepa NC-Bahia, e deste total, 58 (15%) reagiram positivamente para *N. caninum*, apresentando títulos que variaram de 1:100 a 1:3200. Esse resultado demonstra que o parasita pode estar disseminado nos rebanhos avaliados e pode constituir importante agente infeccioso para os caprinos.

Lista dos participantes

Nome	Instituição / E-mail
Alessandra Mara Alves Ragozo	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (FMVZ – USP) ragozo@yahoo.com.br
Aline Aparecida Rezende Rodrigues	Vallée S.A. aline@vallee.com.br
Andréa Caetano da Silva	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás andrea@iptsp.ufg.br
Andressa Karina Piacenti	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul akp@terra.com.br
Antônio Marcos Guimarães	Universidade Federal de Lavras amg@ufla.br
Caroline Argenta Pescador	Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFRGS carolpescador@yahoo.com.br
Clarisse Neves Camargo	Instituto Biológico camargocn@terra.com.br
Cláudia Del Fava	CPDSA - Instituto Biológico/APTA delfava@biologico.sp.gov.br
Cybelly Moreno Boaventura	Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás belly_vet@yahoo.com.br
Daniel Moura de Aguiar	FMVZ - USP danmoura@usp.br
Daniele Cristine Silveira Hoffmann	Universidade Federal do Paraná dani_vet2000@yahoo.com.br
Edviges Maristela Pituco	Instituto Biológico pituco@biologico.sp.gov.br
Eliana De Stefano	Instituto Biológico stefano@biologico.sp.gov.br
Eliana Villalobos	Instituto Biológico villalobos@biologico.sp.gov.br
Elisabeth A. Innes	Moredun Research Institute, Edinburg, Escócia Lee.Innes@moredun.ac.uk
Fernando Paiva	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul fernando@nin.ufms.br

Nome	Instituição / E-mail
Gilcinéa de Cássia Santana	Depto de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras santana@ufla.br
Hilda Fátima de Jesus Pena	FMVZ – USP hfpena@usp.br
Italmar Teodorico Navarro	Universidade Estadual de Londrina italmar@uel.br
Jane Megid	Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública - FMVZ/Unesp/Botucatu jane@fmvz.unesp.br
Javier Regidor Cerrillo	Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinária, Universidad Complutense de Madrid, España javiregi@yahoo.es
João Paulo Amaral Haddad	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, UFMG, jphaddad@vet.ufmg.br
José Márcio Sbruzzi Cardoso	FMVZ – USP jmcardoso@marnorte.com.br
José Roberto Mineo	Universidade Federal de Uberlândia jrmineo@ufu.br
Katia Denise Saraiva Bresciani	DAPSA, FOA, Unesp Araçatuba katia@fmva.unesp.br
Leonardo José Richtzenhain	FMVZ – USP leonardo@usp.br
Líria Hiromi Okuda	Instituto Biológico okuda@biologico.sp.gov.br
Lúcia Eiko Oishi Yai	Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores, Prefeitura do Município de São Paulo oishiyai@yahoo.com
Luís Fernando Pita Gondim	Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia pita@ufba.br
Mark Jenkins	United States Department of Agriculture, Beltsville – EUA mjjenkins@anri.barc.usda.gov
Milton M. McAllister	Dept. of Veterinary Pathobiology, University of Illinois, EUA mmmcalli@uiuc.edu

Nome	Instituição / E-mail
Miriam de Andrade Pereira	Universidade Federal de Lavras mirinhavet@yahoo.com.br
Neusa Saltiel Stobbe	Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul neusa.stobbe@ufrgs.br
Paula Rogério Fernandes	Universidade Federal de Goiás
Renata Molina Monteiro	FMVZ - USP renatamm@usp.br
Renato Andreotti	Embrapa Gado de Corte andreott@cnpqg.embrapa.br
Roberta Lemos Freire	Universidade Estadual de Londrina rlfreire@uel.br
Rodrigo Martins Soares	FMVZ - USP rosoares@usp.br
Rosângela Soares Uzêda	Laboratório de Diagnóstico das Parasitoses dos Animais, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia rouzeda@ufba.br
Rosângela Zacarias Machado	Departamento de Patologia Veterinária, FCAV/UNESP, Jaboticabal zacarias@fcav.unesp.br
Sandra Mayumi Nishi	FMVZ - USP smnishi@usp.br
Solange Maria Gennari	FMVZ - USP sgennari@usp.br
Suzana Alves Bastos	Universidade Federal de Goiás sznbastos@yahoo.com.br
Tarcilla Corrente Borghesan	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul tarcillacb@pop.com.br
Tatiana Evelyn Hayama Ueno	FMVZ - USP tueno@usp.br
Tiago W. P. Mineo	Departamento de Patologia Veterinária, FCAV/UNESP, Jaboticabal tmineo@fcav.unesp.br
Vanessa Silvestre Ferreira de Oliveira	Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, vansilvestre05@yahoo.com.br

Nome	Instituição / E-mail
Willem Wouda	Animal Health Service, Holanda w.wouda@gdvdieren.nl
