

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ISOLAMENTO DE *NEOSPORA CANINUM* DE BOVINOS E CARACTERIZAÇÃO
BIOLÓGICA DE ISOLADOS EM CAMUNDONGOS BALB/c.**

Débora Pereira Garcia Melo
Orientador: Profa. Dra. Andréa Caetano da Silva

GOIÂNIA
2008



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFV

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás-UFV a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações - BDTD/UFV, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, este documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor(a):		
CPF:	E-mail:	
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
Vínculo Empregatício do autor		
Agência de fomento:	Sigla:	
País:	UF:	CNPJ:
Título:		
Palavras-chave:		
Título em outra língua:		
Palavras-chave em outra língua:		
Área de concentração:		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)		
Programa de Pós-Graduação:		
Orientador(a):		
CPF:	E-mail:	
Co-orientador(a):		
CPF:	E-mail:	

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ total parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

Capítulos. Especifique: _____

Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação. O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Assinatura do(a) autor(a)

Data: ____ / ____ / ____

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

DÉBORA PEREIRA GARCIA MELO

ISOLAMENTO DE *NEOSPORA CANINUM* DE BOVINOS E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE ISOLADOS EM CAMUNDONGOS BALB/c.

Tese apresentada para obtenção do grau de
Doutor em Ciência Animal junto à Escola de
Veterinária da Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:
Sanidade Animal

Orientador:

Profa. Dra. Andréa Caetano da Silva

Comitê de Orientação

Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares

Profa. Dra. Lígia Miranda Ferreira Borges

GOIÂNIA
2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

M528i Melo, Débora Pereira Garcia.
Isolamento de *Neospora Caninum* de bovinos e caracterização biológica de isolados em camundongos Balb/c. [manuscrito] / Débora Pereira Garcia Melo. – 2008.
ix, 58f. : il. ; figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Caetano da Silva; Co-Orientadores: Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares, Profa. Dra. Lígia Miranda Ferreira Borges.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, 2008.

Bibliografia: f.46-58.
Inclui listas de figuras e de tabelas.

1. *Neospora caninum* 2. Neosporose bovina 3. Bovino – Caracterização patológica 4. Camundongo – Caracterização biológica I. Silva, Andréa Caetano da II. Linhares, Guido Fontgalland Coelho III. Borges, Lígia Miranda Ferreira IV. Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária. V. Título.

CDU: 619:616: 636.2

DÉBORA PEREIRA GARCIA MELO

Tese defendida e aprovada em **14/08/2008** pela Banca Examinadora constituída pelos professores:


Prof. Dra. Andréa Caetano da Silva
(ORIENTADOR (A))


Prof. Dr. Luis Fernando Pita Gondim - UFBA/BA


Prof. Dra. Joanna Darc A. C. Herzog Soares - IPSTP/UFG


Prof. Dra. Valéria de Sá Jayme


Prof. Dra. Maria Lúcia Gambarini Meirinhos

À minha família

AGRADECIMENTOS

Primeiramente como não deveria deixar de ser, devo agradecer a Deus por haver escrito todos os dias de minha vida, inclusive o dia de hoje em que com o coração cheio de gratidão expresso minha alegria de poder servir a um Deus tão amoroso e cuidadoso, que me permitiu chegar até aqui e ainda posso sonhar para onde desejo ir. Senhor tudo foi muito bom, está sendo muito bom e ainda será bom. O meu socorro vem de Ti, que fez o céu e a terra e tudo que neles há, obrigada Senhor.

Meu agradecimento especial a Prof. Dra. Andréa Caetano da Silva, por sua confiança, por facilitar tantas portas de crescimento para mim e por ainda permitir que eu continue trabalhando com ela. Pela amizade, companheirismo e ensinamentos.

À Prof. Dra. Lígia Miranda Ferreira Borges, pela amizade e ensinamentos.

Aos demais professores da Escola de Veterinária da UFG que me ajudaram e me receberam com alegria.

À Sandra Queiroz Porto de Mesquita e à Prof. Dra. Maria Auxiliadora Andrade que me ajudaram com os testes realizados nas células de cultivo celular.

Ao Prof. Dr. Luis Ortega, Esther, Aurora, Inma, Vanesa, Verônica e os demais “Chicos y chicas” do Laboratório de Sanidad Animal da Universidad Complutense de Madrid, que me receberam, me ensinaram, me ajudaram e me levaram ao médico.

Às minhas amigas e amigos do Laboratório de Parasitologia Veterinária da Faculdade de Veterinária da UFG, por serem tão divertidos e dispostos a me ajudar.

Ao CNPq e Capes, por fornecerem apoio financeiro essencial para que pudesse dedicar integralmente às atividades de pós-graduação.

Em especial, deixo meus sinceros agradecimentos ao meu esposo José Nilvan que nunca deixou de acreditar em mim e me estimular a seguir em frente pelo caminho acadêmico. Aos meus pais que seguem me apoiando e acreditando em minha capacidade.

Meus sinceros agradecimentos...

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Biologia	3
2.2. Transmissão.....	5
2.3. Neosporose no rebanho bovino	7
2.3.1. Infecção clínica	7
2.3.2. Patogenia	8
2.3.3. Diagnóstico	12
2.3.3.1. Diagnóstico histopatológico.....	12
2.3.3.2. Diagnóstico sorológico	14
2.3.3.3. Diagnóstico baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR) ...	15
2.3.3.4. Isolamento e cultivo de <i>Neospora caninum</i>	16
2.3.3.5. Caracterização de isolados	22
3. OBJETIVOS	25
3.1. Geral	25
3.2. Específicos	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1. Propriedade e animais	26
4.2. Isolamento de nova cepa de <i>Neospora caninum</i> em Goiás-Brasil	26
4.2.1. Colheita de materiais para isolamento	26
4.2.2. Isolamento de <i>Neospora caninum</i> em camundongos interferon- γ knock-out (IFN- γ KO).....	27
4.2.3. Isolamento em cultivo celular	27
4.3. Caracterização biológica em camundongos BALB/c.....	28
4.3.1. Desenho experimental	28
4.3.3. Avaliação da distribuição do parasito no organismo	30
4.3.3.1. Extração de DNA de sangue e tecidos.....	30
4.3.3.2. <i>Nested</i> -PCR para a detecção de DNA de <i>Neospora caninum</i> no sangue e tecidos de camundongos.....	30
4.3.3.3. Quantificação de DNA.....	31

4.3.4. Detecção de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i>	32
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
6. RESULTADOS	34
6.1. Isolamento de nova cepa de <i>Neospora caninum</i> em camundongos IFN- γ KO e em cultivo celular em Goiás-Brasil	34
6.2. Caracterização biológica de isolados em camundongos BALB/c.....	35
6.2.1. Mortalidade e sinais clínicos da neosporose	35
6.2.2. Distribuição orgânica do parasito	35
6.2.3. Carga parasitária.....	37
6.2.4. Resposta imune humoral	38
7. DISCUSSÃO	40
8. CONCLUSÕES	45
9. BIBLIOGRAFIA	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Oocistos de <i>Neospora caninum</i> eliminados por coiotes (<i>Canis latrans</i>). (A) Oocisto não esporulado. (B) Oocisto esporulado contendo dois esporocistos (GONDIM et al., 2004b). Barra = 10µm.....	4
Figura 2 – Taquizoítos de <i>Neospora caninum</i> em cultivo celular (MARC 145). Observar taquizoítos dentro de vacúolos parasitóforos, livres e em divisão (SETAS).....	4
Figura 3 - Cisto tecidual em amostra de tecido nervoso de bezerro (DUBEY et al., 2006). A seta aponta para a parede do cisto.	5
Figura 4 - Carga média de taquizoítos/µg de DNA do hospedeiro, observada por PCR Quantitativa, em tecido cerebral de camundongos infectados por diferentes isolados de <i>Neospora caninum</i>	37
Figura 5 - Produção de IgG1 frente a <i>Neospora caninum</i> em camundongos infectados com diferentes isolados e do grupo controle não infectado.	38
Figura 6 - Produção de IgG2a frente a <i>N. caninum</i> em camundongos infectados com diferentes isolados e do grupo controle não infectado.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Isolamento de novas cepas de <i>Neospora caninum</i> e <i>Neospora hughesi</i> obtidos a partir de hospedeiros intermediários e definitivos, país de origem e tecido em que foram obtidos.	17
Tabela 2 - Porcentagem de camundongos inoculados com taquizoítos de <i>Neospora caninum</i> de diferentes isolados, positivos por PCR, na fração celular sanguínea, ao longo da infecção.	35
Tabela 3 - Porcentagem de camundongos inoculados com taquizoítos de <i>Neospora caninum</i> de diferentes isolados, positivos por PCR, no tecido pulmonar, ao longo da infecção.	36
Tabela 4 - Porcentagem de camundongos inoculados com taquizoítos de <i>Neospora caninum</i> de diferentes isolados, positivos por PCR, no tecido cerebral, ao longo da infecção.	36

RESUMO / ABSTRACT

A neosporose bovina foi reconhecida inicialmente em 1989 e a partir de seu reconhecimento e descrição da nova espécie *Neospora caninum*, a neosporose emergiu como uma séria enfermidade de bovinos e cães. Este trabalho teve como objetivo obter novos isolados de *N. caninum* e realizar a caracterização patogênica dos mesmos. Em Nerópolis (Goiás, Brasil) dois bezerros machos de quatro meses de idade, da raça Holandês, positivos por Imunofluorescência indireta para *Neospora* com título de 1:400 e 1:800, foram utilizados para isolamento. Dois novos isolados denominados NC-Goiás 1 e NC-Goiás 2 foram obtidos porém, o isolado NC-Goiás 2 foi perdido devido a contaminação por fungos. Além da caracterização do isolado NC-Goiás 1 foram feitas caracterizações biológicas de seis isolados espanhóis em camundongos fêmeas, da linhagem BALB/c. Foi verificada a sintomatologia e mortalidade provocada pelos isolados, a parasitemia, detecção de DNA do parasito no cérebro e pulmão e determinada a carga parasitária no cérebro ao longo do experimento. Além disso, também se verificou o desenvolvimento da resposta imune humoral dos animais. A análise estatística foi realizada para verificar a influência do isolado e a fase da infecção. As diferenças entre as porcentagens encontradas pela nested-PCR foram analisadas aplicando o teste de Qui-quadrado. Quando observadas diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$), os grupos foram comparados dois a dois. A diferença entre as cargas parasitárias, valores de densidade óptica para IgG1, IgG2a e a razão IgG1/IgG2a entre os isolados foram analisadas pela prova de Kruskal-Wallis. Quando observadas diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$), os grupos foram comparados dois a dois pelo teste de U de Mann-Whitney. No sangue e pulmão o parasito foi detectado principalmente na fase aguda ($P < 0,05$). Quanto ao cérebro, foi detectado DNA de *N. caninum* principalmente na fase crônica ($P < 0,05$). Ao comparar as cargas parasitárias entre os isolados, foram observadas diferenças estatisticamente significativas na fase crônica ($P < 0,005$). Anticorpos da classe IgG1 e IgG2a foram detectados a partir do dia 16 P.I. e 4 P.I. respectivamente, aumentando gradualmente e se mantendo elevados até o dia 64 P.I. A análise da relação de IgG1/IgG2a mostrou predominância de IgG2a nos dias 8 e 16 P.I. e os níveis de IgG1 mais elevados foram detectados nos dias 32 e 64 P.I. O isolado NC-Goiás 1 é o primeiro isolado de *N. caninum* obtido em Goiás e o primeiro isolado obtido de um bezerro infectado porém clinicamente saudável relatado na América do Sul. Esses resultados são o início do estudo da diversidade do protozoário *N. caninum* e indicam que esses isolados são de baixa patogenicidade em camundongos quando comparados com outros isolados conhecidos.

ABSTRACT

The objective of this work was to obtain new isolates of *N. caninum* and characterize the same pathogenically. In Nerópolis (Goiás, Brazil), two Holstein-Friesian male calves, aged four months, positive for indirect immunofluorescence for *Neospora* with a titre of 1:400 and 1:800 were utilized for the isolation. Two new isolates, NC- Goiás 1 and NC-Goiás 2, were obtained. NC-Goiás 2 was discarded, however, due to fungal contamination. In addition to characterization of isolate NC-Goiás 1, pathogenic characterizations were done for six Spanish isolates in female mice of the lineage Balb/c. Symptomatology and mortality caused by the isolates, parasitaemia, detection of parasite DNA in the brain and lungs were verified, as well as parasite load in the brain throughout the experiment. Further, the development of humoral immune response of the animals was verified. Statistical analysis was carried analysing the effect of isolate and the infection phase. Differences between percentages encountered through nested-PCR were analysed using the Chi-square test. When significant differences were observed ($P < 0,05$), the groups were compared two by two. The difference between parasite loads, optical density values for IgG1, IgG2a and the relation IgG1/IgG2a between the isolates were analysed by the Kruskal-Wallis test. When statistically significant differences were observed ($P < 0,05$), the groups were compared two by two using the Mann-Whitney U test. In blood and lungs, the parasite was detected mainly in the acute phase ($P < 0,05$). The DNA of *N. caninum* was also detected in the brain mainly in the chronic phase ($P < 0,05$). On comparing parasite loads between isolates, statistically significant differences were observed between them in the chronic phase ($P < 0,05$). Antibodies of class IgG1 and IgG2a were detected starting from day 16 P.I. and 4 P.I. respectively, increasing gradually and remaining high until day 64 P.I. An analysis of the relation IgG1/IgG2a demonstrated predominance of IgG2a on day 8 e 16 P.I. and highest levels of IgG1 were detected on day 32 and 64 P.I. The isolate NC-Goiás 1 is the first isolate obtained in Goiás and the first obtained from an infected calf, though clinically healthy, reported from South América. These results are the first of a study of the diversity of the protozoon, *N. caninum*, and indicate that these isolates are of low pathogenicity in mice as compared with other known isolates.

1. INTRODUÇÃO

A neosporose bovina foi reconhecida inicialmente em 1989 (THILSTED & DUBEY, 1989) e a partir de seu reconhecimento e descrição da nova espécie *Neospora caninum*, a neosporose emergiu como uma séria enfermidade de bovinos e cães (DUBEY, 2003a). Atualmente é descrita como a principal causa infecciosa de falha reprodutiva em rebanhos bovinos do mundo inteiro (DUBEY & SCHARES, 2006).

As perdas econômicas causadas pela neosporose no rebanho bovino são estimadas em milhões de dólares, uma vez que 42% de vacas podem abortar devido à mesma. O impacto econômico dependerá do custo direto dos fetos perdidos. Custos indiretos incluem a ajuda profissional e custos associados com o estabelecimento de diagnóstico, diminuição de produção de leite e custos com reposição de vacas soronegativas (HERNÁNDEZ et al., 2001).

Apesar de serem escassos os dados epidemiológicos para o estado de Goiás, sabe-se que *N. caninum* está amplamente distribuída no rebanho bovino das microrregiões de Goiânia e Anápolis, com a prevalência de anticorpos variando entre 10,3% e 89,7%, tanto em rebanhos leiteiros como de corte (MELO et al., 2006). Ao se analisar a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em rebanhos da raça Curraleiro neste mesmo estado, encontrou-se uma prevalência de 37,6% (JULIANO, 2006). Em outro estudo realizado em uma central de transferência de embriões também em Goiás, foram analisadas amostras sorológicas de 101 receptoras, 61 doadoras e 90 bezerros, tendo sido encontrado 32,67%, 26,22% e 6,66% respectivamente de positividade para *N. caninum* (OLIVEIRA, 2007). SCHULZE (2008) encontrou uma prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* de 42,92% dentre explorações de corte, leite e mista do estado de Goiás. Esses dados demonstram que *N. caninum* está presente em nosso estado e que pode ser causa de grandes perdas econômicas.

O conhecimento da diversidade biológica e genética que pode existir dentro da espécie pode ser a chave para a compreensão da epidemiologia e patogenicidade do *N. caninum* (SCHOCK et al., 2001). Atualmente, não há nenhum tratamento para a neosporose bovina, e para o desenvolvimento de vacinas é essencial o estudo da variabilidade genética, infectividade, virulência e

resposta imune frente aos diferentes isolados (DUBEY & SCHARES, 2006).
Novos isolados de *N. caninum* atenuados poderão ser incluídos em estudos experimentais para o desenvolvimento de vacina frente a neosporose prevenindo a infecção ou o aborto.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biologia

N. caninum (Apicomplexa-Eimeriina-Sarcocystidae) foi identificado pela primeira vez em 1988 (DUBEY et al., 1988) em cães com encefalomielite e miosite e mais tarde foi descrito em várias espécies. Entretanto, mais importante ainda, é a evidência atual indicando a forte associação entre *N. caninum* e aborto bovino (HEMPHILL et al., 2004).

Cão doméstico e o coiote (*Canis latrans*) são os únicos hospedeiros definitivos de *N. caninum* conhecidos e também atuam como hospedeiros intermediários (GONDIM et al., 2004b; DUBEY, 2003a) sendo que outros animais como bovinos, ovelhas, búfalos, cavalos, cervos, rinoceronte, raposas vermelhas e roedores (*Rattus norvegicus* e *Mus musculus*), também já foram identificados como hospedeiros intermediários (DUBEY et al., 2007).

O parasito apresenta ciclo biológico heteroxeno, que envolve três estágios infecciosos: taquizoítos, bradizoítos e oocistos.

Os oocistos são eliminados na forma não esporulada pelas fezes dos hospedeiros definitivos, contaminando o meio ambiente (GONDIM et al., 2004b, DUBEY, 2003a). São esféricos ou subesféricos (GONDIM et al., 2004b) e esporulam no meio ambiente (Figura1). Os oocistos de *N. caninum* são morfológicamente similares aos oocistos de *Toxoplasma gondii* e de *Hammondia hammondi* presentes nas fezes de gatos e assemelham-se aos oocistos de *Hammondia heydorni* também presentes em fezes de cães (DUBEY et al., 2002). Pouco se sabe sobre a frequência de eliminação de oocistos de *N. caninum* pelos hospedeiros definitivos e da sobrevivência destes oocistos no ambiente (DUBEY, 2003a). Os taquizoítos e bradizoítos são as formas intracelulares encontradas nos hospedeiros intermediários (DUBEY et al., 2002). Dividem-se por endodiogenia (Figura 2) e nos animais infectados, são encontrados em muitas células incluindo células nervosas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais vasculares, miócitos,

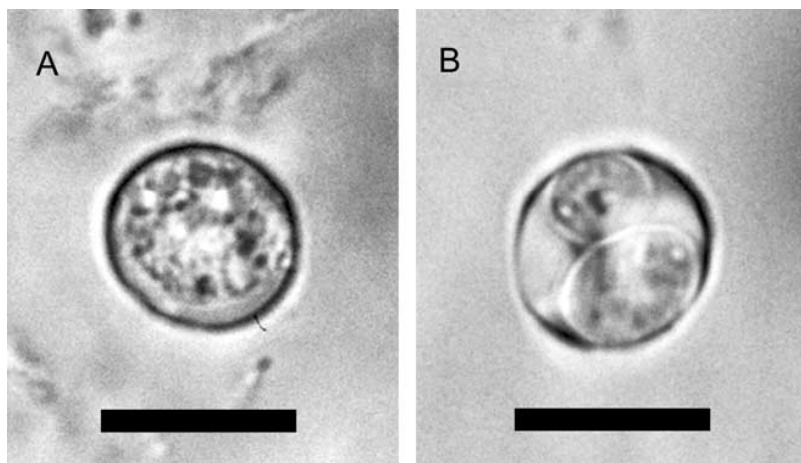


Figura 1- Oocistos de *Neospora caninum* eliminados por coiotes (*Canis latrans*). (A) Oocisto não esporulado. (B) Oocisto esporulado contendo dois esporocistos (GONDIM et al., 2004b). Barra = 10µm

células epiteliais tubulares renais e hepatócitos (DUBEY & LINDSAY, 1996).

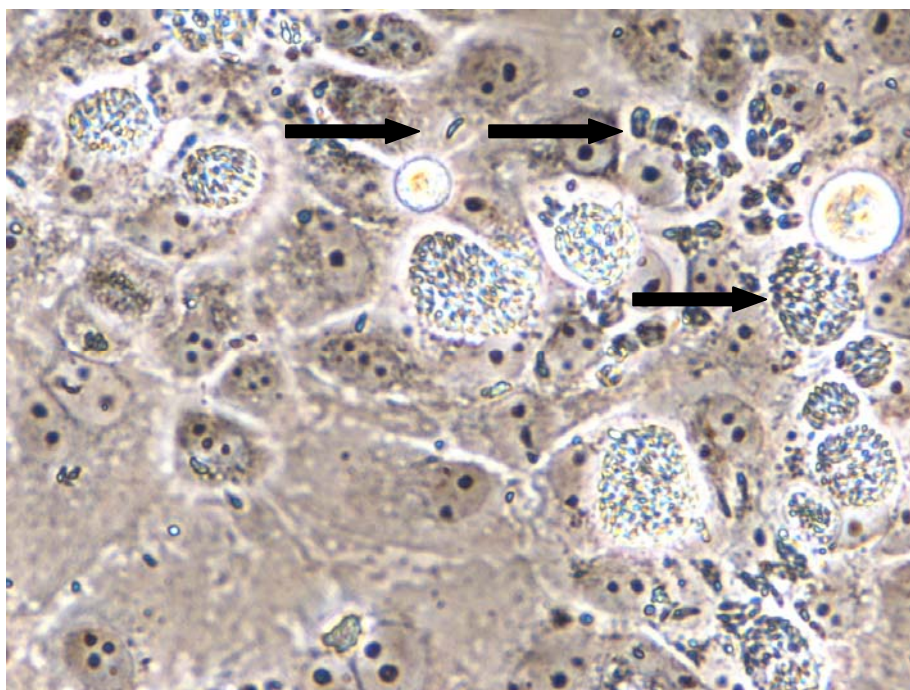


Figura 2 – Tachizoítos de *Neospora caninum* em cultivo celular (MARC 145). Observar tachizoítos dentro de vacúolos parasitóforos, livres e em divisão (SETAS).

Os bradizoítos são envoltos pela parede cística (Figura 3), se multiplicam lentamente e são encontrados em cistos no sistema nervoso central (SNC), representando uma forma de infecção persistente e quiescente, contida pela imunidade do hospedeiro (BUXTON et al., 2002). No animal imunocompetente os bradizoítos podem sobreviver em latência por muitos anos, sem causar nenhum sintoma clínico (HEMPHILL et al., 2004).

Os cistos teciduais geralmente possuem forma circular ou oval (BUXTON et al., 2002). A parede cística é lisa e possui até 4 μ m de espessura. Os cistos foram relatados quase que exclusivamente no sistema nervoso central, com poucas exceções (DUBEY & LINDSAY, 1996).

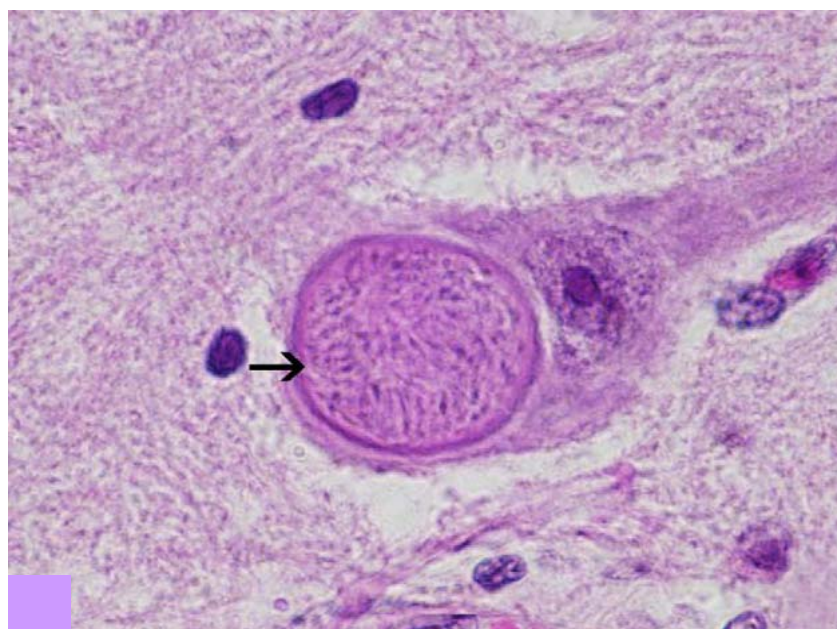


Figura 3 - Cisto tecidual em amostra de tecido nervoso de bezerro (DUBEY et al., 2006). A seta aponta para a parede do cisto.

2.2. Transmissão

A transmissão pode ocorrer por via horizontal e vertical (transplacentária), sendo que ambas possuem um papel importante e são essenciais para a sobrevivência do parasito (DUBEY et al., 2006).

Os bovinos são susceptíveis à infecção induzida por oocistos de *N. caninum* eliminados pelo hospedeiro definitivo que contaminam alimentos e/ou

água, caracterizando a transmissão horizontal (De MAREZ et al., 1999). Porém, é aceito amplamente que infecções de rebanho pelo parasito são mantidas principalmente através de transmissão transplacentária (ROSYPAL & LINDSAY, 2005), sendo que essa parece ser a rota principal de transmissão da neosporose bovina (DUBEY, 1999). A transmissão vertical pode permanecer em determinados rebanhos por diversas gerações (DAVISON et al., 1999a) e uma das principais formas de limitar perdas econômicas no rebanho bovino causadas pela neosporose é a prevenção da infecção transplacentária (LIDDELL et al., 1999).

A transmissão vertical pode ocorrer durante gestações consecutivas, e a fêmea infectada congenitamente também pode transmitir o parasito à sua prole (SCHARES et al., 1998). Assim, em um rebanho infectado, o parasito pode persistir por muito tempo sem a participação de um hospedeiro definitivo (BJORKMAN et al., 2003), estabelecendo a infecção endêmica, que em muitas vezes pode ocorrer sem nenhuma manifestação clínica (ZINTL et al., 2006).

Recentemente, os termos “transmissão transplacentária exógena” e “transmissão transplacentária endógena” foram propostos para descrever mais precisamente a origem da infecção transplacentária do feto. A transmissão transplacentária exógena ocorre quando o animal gestante se infecta ao ingerir oocistos de *N. caninum*, enquanto que a transmissão transplacentária endógena ocorre por uma reativação (recrudescência) da infecção durante a gestação (TREES & WILLIAMS, 2005).

Historicamente, a transmissão vertical da neosporose foi reconhecida primeiramente em cães (BJERKÅS et al., 1984, DUBEY et al., 1990). De acordo com BARBER & TREES (1998), a transmissão vertical em cães provavelmente não persista na ausência da infecção horizontal. Os hospedeiros definitivos adquirem a infecção pela ingestão de tecidos infectados por cistos contendo bradizoítos (DUBEY, 2003a). Já foi demonstrado que tecidos placentários de vacas naturalmente infectadas podem ser uma importante fonte de infecção para cães. Este fato é de significado epidemiológico considerável uma vez que os carnívoros têm acesso fácil a restos placentários (DIJKSTRA et al., 2001; DUBEY et al., 2006).

Teoricamente, *N. caninum* pode ser eliminado pelo leite ou descargas uterinas de vacas. A transmissão de taquizoítos pelo leite ou pela ingestão de

membranas ou fluidos uterino contendo taquizoítos, podem contribuir para infecção (DAVISON et al., 2001), mas parece que essas rotas são de pouca importância (DUBEY et al., 2006).

Embora o DNA de *N.caninum* tenha sido encontrado em sêmen de touros naturalmente infectados (CAETANO-DA-SILVA et al., 2004), os resultados sugerem que organismos viáveis ocorram de forma não freqüente e, quando presentes, estão em pouco número. Porém, a transmissão venérea de *N. caninum* no rebanho bovino ainda não foi confirmada (DUBEY et al., 2006).

2.3. Neosporose no rebanho bovino

2.3.1. Infecção clínica

Embora a infecção pelo parasito em fêmeas não gestantes seja geralmente latente e assintomática, as conseqüências da recrudescência ou de uma primo - infecção em vacas gestantes podem ser o abortamento, nascimento de bezerros débeis, ou nascimento de bezerros clinicamente saudáveis, mas persistentemente infectados (LOPEZ PÉREZ et al., 2006). Vacas de todas as idades podem abortar a partir do terceiro mês até o fim da gestação, sendo que a maioria dos abortamentos ocorre entre o quinto e sexto mês de gestação (DUBEY & SCHARES, 2006). A ausência de abortamento por neosporose nos últimos meses de gestação pode ser explicada pelo desenvolvimento de uma resposta imune eficaz do feto contra *N. caninum* (CORBELLINI et al., 2006). Os fetos podem ser reabsorvidos, mumificados, autolisados, podendo também ocorrer natimortalidade (DUBEY, 2003a).

Os sinais clínicos, à exceção do abortamento, têm sido relatados somente em bezerros menores de quatro meses de idade, e incluem sinais neurológicos, incapacidade de levantar-se e baixo peso médio ao nascer. Os membros traseiros podem estar flexionados ou hiperestendidos e à avaliação neurológica pode revelar ataxia, reflexos patelares diminuídos e exoftalmia (DE MEERSCHMAN et al., 2005).

É mais provável que ocorra abortamentos em vacas soropositivas para *N. caninum* do que em vacas soronegativas e isso ocorre tanto em rebanho leiteiro

quanto em rebanho de carne (WALDNER, 2005). Até 95% de bezerros nascidos de vacas soropositivas poderão ser congenitamente infectados e clinicamente normais (DUBEY & SCHARES, 2006).

CORBELLINI et al. (2006) demonstraram que a prevalência da infecção por *N. caninum* é mais elevada em vacas com histórias precedentes de abortamento (44%) do que em vacas sem precedentes (24.4%).

Abortamentos associados à neosporose podem ter ocorrência epidêmica ou endêmica. Estudos epidemiológicos evidenciam que abortamentos epidêmicos associados a neosporose são causados pela infecção pós-natal do rebanho, provavelmente devido à exposição a alimentos ou água contaminados por oocistos. As manifestações de aborto são definidas como epidêmicas se 10% a 15% das vacas abortam dentro de quatro a oito semanas (SCHARES et al., 2002). Em rebanhos onde o aborto associado a neosporose é do tipo endêmico a principal rota de transmissão é vertical. Neste caso, a recrudescência da infecção latente durante a gestação é responsável pelo aumento do risco de aborto (DUBEY & SCHARES, 2006).

2.3.2. Patogenia

Geralmente a infecção de um hospedeiro imunocompetente com oocistos esporulados não resultará em doença clínica, mas os esporozoítos liberados infectam o tecido intestinal, atravessam o epitélio, alcançam a circulação sangüínea e linfática e infectam outras células, incluindo macrófagos e linfócitos. Nessa fase inicial da infecção os parasitos disseminam-se por todo organismo, e transformam-se rapidamente no estágio de rápida multiplicação: os taquizoítos (HEMPHILL et al., 2004).

A atividade de multiplicação resulta no rompimento das células e desenvolvimento de lesões. Na ausência de resposta imune do hospedeiro, os taquizoítos continuam a se multiplicar causando destruição celular progressiva até a morte do hospedeiro (HEMPHILL et al., 2004). A ocorrência da destruição celular e conseqüentemente da enfermidade, depende do equilíbrio mantido entre a capacidade de penetração e multiplicação na célula hospedeira e a habilidade do hospedeiro em inibir essa multiplicação.

Na patogenia da neosporose, a invasão celular é um elemento chave e os complexos processos envolvidos são semelhantes aos encontrados entre as espécies apicomplexas. Estes processos incluem a presença de receptores de superfície e uma variedade de proteínas produzidas em micronemas, róptrias e grânulos densos. A fixação inicial do parasito na célula do hospedeiro ocorre sem nenhuma orientação consistente e envolve antígenos de superfície. Após o contato inicial, o parasito se reorienta de forma que sua terminação anterior se limita com o plasmalema do hospedeiro, o conóide é exposto, a membrana hospedeira é retraída e várias proteínas são secretadas para formar o Vacúolo Parasitóforo (VP). Uma zona de adesão firme entre membrana do parasito e plasmalema do hospedeiro é formada, esse processo é mediado por proteínas de adesão liberadas por micronemas. Esta zona de adesão forma uma junção móvel (JM) que desliza até a porção posterior do parasito e exerce uma tração no parasito de forma que seja completamente interiorizado no VP. A membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) é formada pela inversão do plasmalema do hospedeiro. Essa junção móvel é formada por citoesqueleto do parasito, logo esse processo não utiliza energia celular do hospedeiro (BUXTON et al., 2002).

Com o desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro, os taquizoítos se diferenciam em bradizoítos (HEMPHILL et al., 2004). Os bradizoítos, envoltos pela parede cística, multiplicam-se lentamente e são encontrados em cistos no sistema nervoso central (SNC).

É razoável pensar que todas infecções fetais seguem a uma parasitemia materna, contudo a maioria ocorre em rebanho que já abrigava uma infecção persistente antes que a gestação fosse estabelecida (BUXTON et al., 2002).

A razão da ocorrência do aborto ainda não é esclarecida, mas existem diversos fatores que podem influenciar o aborto, dentre eles está o estágio da gestação em que a vaca transmite a infecção ao feto, fato ditado pelo recrudescimento da infecção maternal, a idade do feto, a quantidade de parasito e as características particulares da cepa de *N. caninum* que provocou a infecção (BUXTON et al., 2002).

Em situações especiais, tais como a gestação, os bradizoítos podem se reativar. Durante a gestação existe uma perda de resposta imune eficiente que mantém a inibição de proliferação de taquizoítos. Isto contribui para reativação

dos bradizoítos e sua conversão em taquizoítos, podendo então conduzir à infecção transplacentária do feto por taquizoítos. Assim, *N. caninum* pode se utilizar dessa rota de transmissão explorando a ruptura transitória de imunidade do hospedeiro para invadir o feto, geralmente sem causar a enfermidade clínica na vaca. A transmissão de *N. caninum* da mãe ao feto dentro do útero é altamente eficiente, e a neosporose fetal aguda é a causa principal de abortamento, natimortos, ou pelo menos de doença clínica ou subclínica em bezerros recém-nascidos (HEMPHILL et al., 2004).

A gestação cria um desequilíbrio na relação hospedeiro-parasito, que pode ajudar na explicação da patogenia da neosporose. A resposta imune desenvolvida frente à infecção é capaz de influenciar o sucesso da gestação e comprometer a habilidade do animal em levar a gestação adiante (INNES et al., 2002).

Em mamíferos, mecanismos imunológicos complexos são envolvidos para permitir que a fêmea mantenha o feto e não o rejeite como estranho (ENTRICAN, 2002), em ruminantes estes mecanismos são mediados através da interface materno-fetal, constituída de 100 pontos de contato (placentomas). Cada placentoma é composto por um cotilédone da placenta fetal, projetado para dentro da superfície do útero, intimamente conectado com a carúncula materna. Transferência de nutrientes e oxigênio da mãe para o feto acontece por meio dessas estruturas, através da união entre a carúncula materna e a placenta fetal.

Como parte do equilíbrio imunológico da placenta, citocinas maternas benéficas do tipo Th2 como a interleucina (IL) 10 e TGF- β são predominantes, enquanto potentes citocinas destrutivas do tipo Th1 como a IL-2, IL-12, interferon (IFN) γ e fator de necrose tumoral (TNF) α são restritos (ENTRICAN, 2002). Conseqüentemente, este equilíbrio imunológico envolvido que permite à mãe manter a gestação, pode favorecer a invasão da placenta e infecção do feto por certos microrganismos, inclusive *N. caninum* (INNES et al., 2001).

Se as vacas são infectadas experimentalmente com *N. caninum* no início da gestação, as conseqüências podem ser severas, resultando em morte do feto. A causa precisa do aborto é assunto de debate. Se o feto se torna infectado, é pouco provável que seja capaz de organizar uma resposta imune efetiva devido à imaturidade do sistema imune. Senão, é sabido que, no início da gestação, a

mãe é capaz de montar uma forte resposta de proliferação celular com produção de INF- γ em resposta ao antígeno do parasito. Conseqüentemente, é possível que o aborto seja causado pela presença de citocinas pro-inflamatórias tipo 1 (Th1) na interface materno fetal, quando o sistema imune materno combate a infecção. Significante imunomodulação de células de proliferação e INF- γ ocorre ao meio da gestação, quando pode ser desencadeado por recrudescência da infecção, através da existência de parasitos contidos dentro dos cistos teciduais. Nesse estágio da gestação, as conseqüências da infecção podem ser morte fetal ou o bezerro pode nascer congenitamente infectado e mostra sintomas ao nascimento (INNES e al., 2002).

Infecções experimentais controladas em bovinos têm demonstrado que infecções no primeiro trimestre de gestação têm conseqüências mais graves para o feto que infecções tardias (BARR et al. 1994; BUXTON et al. 1998; WILLIAMS et al. 2000; MALEY et al. 2003; MACALDOWIE et al. 2004). No entanto, o risco de transmissão para o feto aumenta em relação à idade gestacional (INNES, 2007; McCANN et al., 2007).

Em bovinos, a gestação dura 280 dias e o sistema imune fetal se torna eficaz progressivamente até o nascimento, quando o bezerro torna-se imunologicamente competente. O feto é particularmente vulnerável durante o primeiro terço gestacional, quando o timo, baço e nódulos linfáticos ainda estão sendo formados. Durante o segundo terço gestacional, estes tecidos começam a reconhecer e responder aos microrganismos. Assim, no primeiro trimestre, o feto é excepcionalmente vulnerável a infecção por *N. caninum*, e é pouco provável que sobreviva. No terço médio de gestação, o feto pode lançar mão de uma resposta imune rudimentar a qual ainda não é suficiente para conservá-lo com vida, é neste período que a maioria dos abortamentos ocorre. No terceiro trimestre, ele é capaz de uma defesa cada vez mais competente em relação ao patógeno, conduzindo à sobrevivência (BUXTON et al., 2002).

Estudos sobre o efeito de baixas doses de parasitos, inoculados experimentalmente em camundongos, conseguiram reproduzir uma enfermidade crônica (LINDSAY et al., 1995). GOTTSTEIN et al. (2001) destacaram uma associação evidente entre doses elevadas de taquizoítos empregadas na infecção

e o incremento da taxa de mortalidade e presença de lesões graves nos diferentes tecidos estudados.

A diversidade genética e biológica do parasito e as variações na patogenicidade dos diferentes isolados poderiam estar relacionadas com as diferentes manifestações clínicas que têm sido encontradas no rebanho bovino (SCHOCK et al., 2001).

2.3.3. Diagnóstico

Determinar a causa de aborto no rebanho bovino é uma tarefa difícil uma vez que os abortamentos são causados por numerosos fatores infecciosos e não infecciosos (CORBELLINI et al., 2006). Dentre os agentes infecciosos, *N. caninum* foi implicado como a causa mais importante de aborto bovino em muitos países (DUBEY, 2003b).

2.3.3.1. Diagnóstico histopatológico

O estudo das alterações patológicas é um procedimento diagnóstico fundamental para o diagnóstico da neosporose uma vez que existem lesões típicas encontradas em diversos tecidos (DUBEY & SCHARES, 2006). Para se fazer um diagnóstico de neosporose, cérebro, coração, fígado e placenta são as amostras mais indicadas. É recomendável o exame de múltiplos tecidos para se ter um diagnóstico mais confiável (DUBEY, 2003a).

A identificação do parasito em tecidos bovinos pela histologia convencional é difícil mesmo em fetos preservados, devido a sua semelhança morfológica com *T. gondii* e *Sarcocystis* spp. e, geralmente, o número de parasitos (taquizoítos e/ou cistos) presentes nas amostras é escasso (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003). DUBEY et al. (2006) explicaram que as reações *pós-mortem* que danificam as células do hospedeiro também o faz ao parasito, conseqüentemente é raro encontrar taquizoítos preservados em fetos abortados. Apesar de a maioria dos fetos abortados provavelmente encontrar-se autolisada, mesmo assim tecido cerebral semi-líquido, deve ser fixado em formol 10% para histologia convencional (DUBEY, 2003a).

Sendo assim, torna-se necessária a realização da imunoistoquímica para se concluir um diagnóstico de neosporose (BOGER & HATTEL, 2003). Anticorpos monoclonais e policlonais específicos para *N. caninum* podem ser usados e ambos são comercialmente disponíveis (COLE et al., 1994).

A observação de lesões histológicas degenerativas e inflamatórias ("lesões compatíveis"), típicas das infecções por protozoários, localizadas no cérebro e coração permite emitir um diagnóstico presuntivo de aborto por neosporose (DUBEY et al., 2006). A sensibilidade das técnicas histológicas utilizadas para o diagnóstico pode variar em função do número de cortes histológicos analisados e do grau de autólise dos tecidos (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003).

As lesões microscópicas podem ser encontradas em uma variedade de tecidos fetais, mas as observações mais freqüentes são encefalite e miocardite multifocal. Em fetos e em neonatos bovinos, áreas de necrose multifocal cercadas por células inflamatórias são observadas geralmente no sistema nervoso central, medula espinhal, coração, músculo esquelético, fígado, pulmão, e placenta (BARR et al., 1991), embora o cérebro seja o órgão mais consistentemente afetado (DUBEY, 2003a).

A autólise ou mumificação, freqüentemente observadas, provocam a ocorrência de descoloração nos cotilédones placentários (FIORETTI et al., 2003).

A lesão característica da neosporose no sistema nervoso central consiste em foco de infiltração de células mononucleares em torno de uma área central de necrose. A proliferação de células da Glia é mais comum em fetos abortados no terceiro trimestre (DUBEY et al., 2006). Ocasionalmente, pode haver uma calcificação (BOULTON et al., 1995).

Tipicamente, as lesões miocárdicas consistem em infiltração focal de células mononucleares com mínimo de necrose (DUBEY & SCHARES, 2006).

As lesões hepáticas consistem em infiltrações periportais de células mononucleares e focos variáveis de necrose hepatocelular. A hepatite periportal é mais severa em epidemias do que em abortamentos endêmicos (DUBEY & SCHARES, 2006).

Camundongos BALB/cAJcl-nu infectados intraperitonealmente com cérebro e cordão espinhal de um bezerro abortado por neosporose bovina, apresentaram à necropsia aumento de volume dos nódulos linfáticos, moderada infiltração de

neutrófilos, macrófagos e degeneração do axônio e mielina, poliradiculoneurite, focos de necrose no SNC e moderada inflamação do músculo esquelético (SAWADA et al., 1997).

2.3.3.2. Diagnóstico sorológico

Em contraste com a detecção direta ou indireta de *N. caninum* em tecidos fetais, os métodos sorológicos podem ser usados para o exame de animais *in vivo* e para fornecer desse modo alguma informação do estágio da infecção (JENKINS et al., 2002).

As técnicas sorológicas apresentam uma elevada sensibilidade e especificidade, porém, no diagnóstico da neosporose bovina existem diferenças entre laboratórios devido às propriedades da técnica empregada e aos diferentes pontos de corte utilizados. Por outra parte, a sensibilidade e a especificidade dessas provas diagnósticas podem variar por diversos fatores como a idade do animal ou a fase da infecção. Assim, um resultado sorológico positivo ajuda a identificar um animal adulto infectado, mas um resultado negativo não descarta definitivamente a infecção porque os anticorpos séricos frente a *N. caninum* podem flutuar com a idade e o estado da gestação (PEREIRA-BUENO et al., 2000; QUINTANILLA-GOZALO et al., 2000).

Diversos testes sorológicos podem ser usados para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum*, dentre eles vários testes de ensaio imuno-enzimático (EIE), imunofluorescência indireta (IFI) e aglutinação direta (NAT). O western blot (WB) também é útil para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum*. Tem-se utilizado EIE de avidéz, para distinguir infecções recentes e infecções crônicas no rebanho, e os resultados parecem ser promissores uma vez que parecem distinguir aborto endêmico e epidêmico (DUBEY, 2003a).

Todos os ensaios para detecção de anticorpos são baseados em antígenos de taquizoítos. Os testes baseados em antígenos de bradizoítos ou esporozoítos não estão ainda disponíveis (DUBEY & SCHARES, 2006).

Os títulos de anticorpos são geralmente mais elevados em rebanhos com problemas de aborto devido à neosporose do que aqueles com gestação normal,

entretanto, os títulos não podem determinar a etiologia dos abortamentos (DUBEY, 2003a).

2.3.3.3. Diagnóstico baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR)

A detecção do DNA parasitário nos tecidos suspeitos mediante PCR, é uma das opções mais utilizadas no diagnóstico de abortamento bovino nos últimos anos. As razões da ampla utilização desta técnica são óbvias e se sustentam na tolerância com a qualidade da amostra, gasto relativamente baixo e facilidade de realização em um laboratório de diagnóstico. Na prática, a técnica de PCR tem sido utilizada principalmente no diagnóstico de abortamento bovino além dos estudos epidemiológicos, de patogenia e filogenéticos (COLLANTES-FERNÁNDEZ, 2003).

A PCR tem um papel importante no diagnóstico da infecção por *N. caninum*. A maioria dos protocolos de PCR é usada para detectar o DNA do parasito nos tecidos do feto abortado ou dos hospedeiros intermediários. Entretanto, outras amostras também podem ser utilizadas, como o líquido amniótico (HO et al., 1997) e fezes de cão ou coiole contaminadas por oocisto de *N. caninum* (GONDIM et al., 2004b). Recentemente, foi relatado, ser possível identificar DNA de *N. caninum* no leite de vacas (MOSKWA et al., 2003) e no sêmen de touros (CAETANO-DA-SILVA et al., 2004).

Nos últimos anos foram desenvolvidos vários métodos de PCR que utilizam diferentes seqüências do genoma do parasito (principalmente a região ITS1 e a seqüência Nc-5 de *N. caninum*), incrementando-se sensibilidade e especificidade da técnica (COLLANTES-FERNÁNDEZ, 2003).

Se o exame por PCR for positivo, o aborto pode estar associado a *N. caninum*, mas é importante excluir outras causas potenciais. Deve-se destacar a importância da associação da PCR ao exame histopatológico. Se as lesões no cérebro e corações são severas e taquizoítos de *N. caninum* são demonstráveis nas lesões pode-se dizer que parasito é provavelmente a causa do aborto (DUBEY & SCHARES, 2006).

A eficiência do diagnóstico por PCR depende do laboratório, estágio da autólise da amostra e procedimentos seguidos na amostragem. O DNA de *N. caninum* pode ser identificado em tecidos fixados em formol ou parafina (DUBEY, 2003a).

Protocolos de PCR foram desenvolvidos não somente para detectar DNA de *N. caninum*, mas também para quantificar DNA do parasito nas amostras. O PCR quantitativo tem se tornado uma metodologia chave para se estudar a patogenia da neosporose em bovinos (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2004).

2.3.3.4. Isolamento e cultivo de *Neospora caninum*

Apesar da demonstração de anticorpos específicos no feto ser uma ferramenta importante no diagnóstico de neosporose associada a aborto, um resultado sorológico negativo não exclui infecção (DUBEY & SCHARES, 2006). Portanto, o isolamento ou demonstração de *N. caninum* em tecidos fetais é considerada uma prova confiável que apóia o diagnóstico de neosporose relacionado com aborto (DUBEY et al., 2007).

Os primeiros isolados de *N. caninum* foram obtidos de cultura de tecidos de cães e bovinos, e embora o isolamento seja difícil e demorado, atualmente *N. caninum* tem sido isolado a partir de tecidos de outros animais em vários países (Tabela 1) (SCHOCK et al., 2001). Além disso, outra espécie, *Neospora hughesi* já foi isolada a partir de tecidos de cavalos (DUBEY et al., 2001).

Tabela 1 - Isolamento de novas cepas de *Neospora caninum* e *Neospora hughesi* obtidos a partir de hospedeiros intermediários e definitivos, país de origem e tecido em que foram obtidos.

HOSPEDEIRO	LOCALIZAÇÃO	TECIDO/ORIGEM	Nº DE ISOLADOS ^a	REFERÊNCIAS
Hospedeiro intermediário-Bovino (<i>Bos- taurus</i>)	Austrália	Cérebro e medula espinhal de bezerro neonato	1	MILLER et al., 2002
	Brasil	Cérebro de um feto e um bezerro de três meses	2	LOCATELLI-DITTRICH et al., 2003; 2004
	Itália	Cérebro de bezerro de 45 dias	1	MAGNINO et al., 1999; 2000
	Japão	Cérebro e medula espinhal de bezerros neonatos	5	YAMANE et al., 1997; 1998
	Coréia	Cérebro de feto e bezerro neonato	2	KIM et al., 1998; 2000
	Malásia	Cérebro de bezerro neonato	1	CHEAH et al., 2004
	Nova Zelândia	Cérebro de bezerros neonatos	2	OKEOMA et al., 2004
	Portugal	Cérebro de feto	1	CANADA et al., 2002
	Espanha	Cérebro de feto	1	CANADA et al., 2004

TABELA 1 - Isolamento de novas cepas de *Neospora caninum* e *Neospora hughesi* obtidos a partir de hospedeiros intermediários e definitivos, país de origem e tecido em que foram obtidos.

					(Continuação)
HOSPEDEIRO	LOCALIZAÇÃO	TECIDO/ORIGEM	Nº DE	REFERÊNCIAS	
			ISOLADOS ^a		
Hospedeiro intermediário-	Suécia	Cérebro de bezerro neonato	1	STENLUND et al., 1997	
Bovino (<i>Bos taurus</i>)	Reino Unido	Cérebro de feto e bezerro neonato	2	DAVISON et al., 1999b; TREES & WILLIAMS, 2000	
	Estados Unidos	Cérebro de feto e bezerros neonatos	8	CONRAD et al., 1993; GONDIM et al., 2002; MARSH et al., 1995; MCALLISTER et al., 1998; MCALLISTER et al., 2000; MCALLISTER et al., 2005	
	Países Baixos	Placenta	3	DIJKSTRA et al., 2001	
	Itália	Cérebro de bezerros de oitos meses	1	FIORETTI et al., 2000	
	Japão	Cérebro de fêmea adulta	1	SAWADA et al., 2000	
	Nova Zelândia	Cérebro de fêmea adulta	1	OKEOMA et al., 2004	

TABELA 1 - Isolamento de novas cepas de *Neospora caninum* e *Neospora hughesi* obtidos a partir de hospedeiros intermediários e definitivos, país de origem e tecido em que foram obtidos.

(Continuação)				
HOSPEDEIRO	LOCALIZAÇÃO	TECIDO/ORIGEM	Nº DE ISOLADOS ^a	REFERÊNCIAS
Ovelha (<i>Ovis ovis</i>)	Brasil	Ovelha de quatro meses	1	PENA et al., 2007
	Japão	Ovelha adulta	1	KOYAMA et al., 2001
Búfalo água (<i>Bubalus bubalis</i>)	de Brasil	Animal adulto	5	RODRIGUES et al., 2004
Eqüino (<i>Equus caballus</i>)	Estados Unidos	Tecido nervoso de animal adulto	3 ^t	CHEADLE et al., 1999; DUBEY et al., 2001; MARSH et al., 1998
Cervo branco (<i>Odocoileus virginianus</i>)	Estados Unidos	Cérebro de animal adulto	3	VIANNA et al. 2005
		Cérebro de animal adulto	1 ^t	GONDIM et al., 2004 a
Cão (<i>Canis familiaris</i>)	Alemanha	Filhote infectado congenitamente, tecido nervoso	1	PETERS et al., 2000
	Reino Unido	Filhote infectado congenitamente, tecido nervoso	1	BARBER et al., 1995

TABELA 1 - Isolamento de novas cepas de *Neospora caninum* e *Neospora hughesi* obtidos a partir de hospedeiros intermediários e definitivos, país de origem e tecido em que foram obtidos.

(Continuação)

HOSPEDEIRO	LOCALIZAÇÃO	TECIDO/ORIGEM	Nº DE ISOLADOS ^a	REFERÊNCIAS
Hospedeiro definitivo (<i>Canis familiaris</i>)	Estados Unidos	Filhotes infectados congenitamente, tecido nervoso	10	CUDDON et al., 1992; DUBEY et al., 1988; DUBEY et al., 1998; DUBEY et al., 2004; HAY et al., 1990; MARSH et al., 1998;
	Australia	Pele de animal adulto	1	MCINNES et al., 2006
	Brasil	Cérebro de animal adulto	1	GONDIM et al., 2001
Hospedeiro definitivo (<i>Canis familiaris</i>)	Argentina	Fezes	1	BASSO et al., 2001
	Alemanha	Fezes	5	SCHARES et al., 2005

^aSímbolos: †*Neospora hughesi*; ‡ oocistos obtidos a partir e fezes de cães alimentados com cérebros de cervo infectados, não foi obtido parasito viável em cultivo celular ou em camundongos.

Grande parte das tentativas de isolamento de *N. caninum* em camundongos ou em cultura de células é mal sucedida. Isso pode ser explicado pelo fato de que em muitas destas tentativas o parasito pode morrer juntamente com o hospedeiro (DUBEY, 2003a). As técnicas de isolamento de *N. caninum*

mais utilizadas incluem inoculação de tecidos infectados em cultivo celular ou em camundongos imunossuprimidos ou imunodeficientes (YAMANE et al., 1998).

Numerosas linhagens celulares de mamíferos são utilizadas para crescimento de *N. caninum* em cultivo celular (LINDSAY & DUBEY, 1989). Embora a maioria de pesquisadores utilize células VERO para cultivo de *N. caninum* a partir de tecidos bovinos, esse parasito não tem nenhuma preferência celular reconhecida no cultivo *in vitro* (LEI et al., 2005).

Em procedimentos de isolamento relatados anteriormente, o período entre a introdução do material suspeito na cultura de célula até a detecção de *N. caninum* nas culturas variou entre cinco dias (MCINNES et al., 2006) e 9,5 semanas (PASTUSIAK et al., 2005). De acordo com DAVISON et al. (1999b), a observação mais tardia de parasito em cultura celular está associada diretamente com o número e a viabilidade dos parasitos usados para a infecção inicial.

VIANNA et al (2005) descreveram que métodos de isolamento são completamente dependentes da presença de parasitos viáveis capazes da penetração e propagação nas células do hospedeiro. Os autores observaram taquizoítos pela primeira vez em cultivo celular em um intervalo de até 127 dias P.I., além disso, também afirmaram que o isolamento em cultivo celular é limitado pela necessidade de materiais não contaminados por outros microrganismos. DUBEY & SCHARES (2006) destacaram a importância da observação do cultivo celular por dois meses, pois o crescimento e os taquizoítos podem não ser vistos microscopicamente por até 60 dias P.I. e o momento de detecção do parasito em cultivo celular pode ser condicionado à baixa carga de parasito no momento da inoculação, à taxa de crescimento lenta do parasito e sua adaptação ao tipo de linhagem celular utilizado para o isolamento.

Embora *N. caninum* mostre um crescimento apropriado em um largo espectro de linhas celulares de mamíferos, existem isolados incapazes de crescimento *in vitro* ou isolados que necessitam de um longo período para adaptação à cultura de células (VIANNA et al., 2005). De fato, a análise comparativa da taxa de crescimento entre isolados mostrou que alguns crescem significativamente mais rápidos do que outros sob condições idênticas de cultivo celular (SCHOCK et al., 2001).

Sabe-se que o isolamento por meio da inoculação direta de tecidos bovinos em cultura celular pode ser mal sucedido devido à possibilidade de contaminação, além disso, os tecidos de bezerros abortados podem estar autolisados, diminuindo a viabilidade do parasito (CONRAD et al., 1993). Por isso, recomenda-se isolar *N. caninum* de tecidos nervosos de bezerros congenitamente infectados de uma gestação normal, pois os cistos teciduais podem estar presentes e estes são mais resistentes à autólise do que os taquizoítos (DUBEY, 2003a), porém em alguns casos de tecidos frescos de bezerros congenitamente infectados, a carga parasitária pode ser baixa (YAMANE et al., 1997; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2004).

Além de isolamentos viáveis de *N. caninum* obtidos em cultivo de células, uma variedade de bio-ensaios em camundongos imunossuprimidos, imunodeficientes ou *knock-out* (KO), gerbils e cães (MCGUIRE et al., 1997; YAMANE et al., 1998; DUBEY et al., 1998; DUBEY & SCHARES, 2006) podem ser realizados para obtenção de novos isolados. Camundongos imunocompetentes podem ser resistentes à infecção. Ao contrário, os gerbils (*Meriones unguiculatus*) são susceptíveis à infecção por *N. caninum* sem imunossupressão prévia (GONDIM et al., 2001). Camundongos KO são deficientes para o gene interferon gamma e conseqüentemente são susceptíveis à maioria dos parasitos intracelulares. A maioria dos isolados de *N. caninum* causa neosporose aguda e morte nesses camundongos (VIANNA et al., 2005), e após a infecção pelo parasito, a carga parasitária em seus tecidos é mais elevada do que em tecidos bovinos (NISHIKAWA et al., 2001) aumentando a possibilidade de sucesso no processo de isolamento.

2.3.3.5. Caracterização de isolados

Pouco se sabe da variabilidade antigênica e biológica entre os isolados de *N. caninum*, especialmente os isolados a partir de animais saudáveis (DUBEY, 2003a, DUBEY et al., 2004).

A caracterização patogênica de novos isolados é um requisito fundamental em estudos, pois a diversidade encontrada entre esses pode ter um impacto na

patologia associada com a infecção em bovinos e cães e seria uma consideração importante no projeto de vacinas frente a neosporose (SCHOCK et al., 2001). O desenvolvimento de uma vacina para *N. caninum* atualmente é uma área de investigação ativa, com o objetivo de impedir a propagação da infecção e da doença causada por este parasito. Relatórios precedentes indicaram a utilidade potencial dos camundongos em tais investigações porque, certas estirpes particulares de camundongos mostram estar sujeitas a alguns dos mesmos efeitos clínicos da infecção por *N. caninum* que foram documentados no rebanho bovino. Camundongos BALB/c, apesar de serem imunocompetentes, já foram usados amplamente como modelo em estudos diferentes para avaliar a virulência entre os isolados de *N. caninum*, obtidos a partir de animais clinicamente afetados (ATKINSON et al., 1998; QUINN et al., 2002; COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006) e de isolados obtidos de animais assintomáticos (SHIBAHARA et al. 1999; MILLER et al. 2002; OKEOMA et al., 2004). Além disso, sinais neurológicos foram relatados em camundongos BALB/c infectados por *N. caninum* (LINDSAY et al., 1995). Encefalite induzida por este parasito também foi descrita nesses camundongos (LONG & MATHISON, 1998).

A caracterização biológica entre diferentes isolados demonstrou diversidade genética (SCHOCK et al., 2001, REGIDOR-CERRILLO et al., 2006) e variações significativas de suas características patogênicas *in vivo* e do crescimento *in vitro* (SCHOCK et al., 2001; MILLER et al., 2002; PÉREZ-ZABALLOS et al., 2005; COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006).

QUINN et al. (2002), ao realizarem a caracterização do isolado NC-Liverpool (NC-Liv) (BARBER et al., 1993) em camundongos BALB/c e Quackenbush (Qs), observaram que os camundongos Qs infectados por NC-Liv mantiveram um peso constante entre 32 e 33 g; entretanto, os camundongos BALB/c infectados com NC-Liv demonstraram uma redução média no peso de 5g até o final do experimento. Juntamente com a perda de peso observada nos camundongos BALB/c, a patologia no sistema nervoso central também foi mais severa nesses camundongos do que nos camundongos Qs. Ambos os tipos de camundongos demonstraram uma resposta anticorpo específica, após a infecção com NC-Liv e isotipo dominante nos camundongos BALB/c era IgG 1; entretanto, nos camundongos Qs, IgG2a era o isotipo dominante. Nesse mesmo estudo ao

avaliar-se a resposta imune aos isolados NC-Liv e NC-SweB 1 (STENLUND et al., 1997) em camundongos Qs, foi demonstrado que a resposta imune variou em função do isolado e da rota de infecção, uma vez que infecções subcutâneas de 10^6 taquizoítos de NC-SweB1 produziram uma resposta dominante de IgG1, e a infecção da mesma dose de NC-Liv produziu uma resposta dominante de IgG2a e todas as infecções intraperitoneais conduziram a resposta imune de IgG2a.

COLLANTES-FERNÁNDEZ et al. (2006), ao determinarem as características biológicas dos isolados NC-Liv e NC1 (DUBEY et al., 1988) em camundongos BALB/c, verificaram que os sinais de neosporose foram mais pronunciados no grupo infectado por NC-Liv (25.4% versus 1.8%). ATKINSON et al. (1998), ao realizarem a comparação de características biológicas entre os isolados NC-Liv e NC-SweB1, verificaram que havia claramente uma diferença na severidade de lesões no cérebro entre o grupo de camundongos inoculados com NC-Liv, que induziu mais necrose e mais resposta inflamatória do que o grupo infectado por NC-SweB1. Além disso, os animais infectados por NC-Liv (57/58) apresentaram perda de peso de até 35%, simultaneamente a outros sintomas, que progrediram até paralisia e incoordenação. Por outro lado o NC-SweB1 induziu sintomas similares em uma proporção menor de camundongos (9/ 57).

A análise comparativa das taxas de crescimento dos isolados NC-1, NC-Liv, BPA-1 (CONRAD et al., 1993), NC-SweB1, JPA-2 (YAMANE et al., 1997) e NC-LivB1 (DAVISON et al., 1999b) demonstrou que alguns isolados cresceram significativamente mais rápido do que outros, em idênticas condições de cultivo (SCHOCK et al., 2001)

A ampla escala de hospedeiros, distribuição geográfica e o potencial para recombinação sexual podem explicar a variação dentro da espécie. (SCHOCK et al., 2001). Torna-se necessário uma investigação mais detalhada para explicar os efeitos dos isolados e das diferentes rotas de infecção na patogenia frente ao *N.caninum*.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Obter novos isolados de *Neospora caninum* em Goiás e realizar a caracterização biológica destes e de isolados espanhóis.

3.2. Específicos

- Isolar *Neospora caninum* de origem bovina em bio-ensaio realizado em camundongos interferon- γ knock-out, em Goiás;
- Realizar a caracterização de isolados de *N. caninum* brasileiros e espanhóis, em camundongos BALB/c experimentalmente infectados, através de:
 - avaliação da sintomatologia e mortalidade;
 - avaliação da distribuição do parasito no sangue, pulmão e cérebro;
 - determinação da carga parasitária no cérebro;
 - verificação do desenvolvimento da resposta de IgG1 e IgG2a.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Propriedade e animais

Em 2004, foi realizado um levantamento da ocorrência de *N. caninum* nas microrregiões de Goiânia e Anápolis (MELO, 2005). Das propriedades analisadas, uma de rebanho leiteiro da raça Holandesa, situada no município de Nerópolis (Goiás, Brasil) foi selecionada devido à facilidade de obtenção de bezerros para o isolamento. Foi realizada análise sorológica dos bezerros mantidos no rebanho para determinar a ocorrência de *N. caninum* sendo que a técnica sorológica de escolha foi a IFI de acordo com ÁLVAREZ-GARCÍA et al. (2002). Como antígenos, foram empregados taquizoítos inteiros cultivados em células Vero, do isolado NC-1 de *N. caninum*. A diluição dos soros iniciou-se em 1:100. O título limite considerado foi a última diluição que mostrou fluorescência periférica completa. Uma ocorrência de 72% de anticorpos anti- *N. caninum* foi encontrada nessa propriedade. Dois bezerros machos de quatro meses de idade, positivos para *Neospora* com títulos de 1:400 e 1:800, foram utilizados para isolamento.

Para o isolamento de *N. caninum* a partir de tecido cerebral de bezerros foram utilizados camundongos interferon- γ knock-out (IFN- γ KO), e para a caracterização biológica dos novos isolados, foram utilizados camundongos BALB/c.

4.2. Isolamento de nova cepa de *Neospora caninum* em Goiás-Brasil

4.2.1. Colheita de materiais para isolamento

Dois bezerros machos foram sacrificados e os cérebros foram removidos de forma asséptica logo após o sacrifício. Aproximadamente 5 a 15 g de diferentes partes do cérebro foram colocados em bolsas plásticas contendo PBS com uma solução antibiótica-antimicótica a 2% (Gibco BRL, Paisley, Reino Unido), identificadas e mantidas a 4° C até o momento de serem inoculados em camundongos. Além disso, o restante de tecido cerebral foi acondicionado em uma solução de formol tamponado a 10% para posterior processamento por métodos histológicos rotineiros.

4.2.2. Isolamento de *Neospora caninum* em camundongos interferon- γ knock-out (IFN- γ KO)

Previamente à inoculação, amostras de cérebro dos bezerros foram analisadas por nested-PCR para confirmar a presença do parasito (BUXTON et al., 1998). As amostras positivas de cérebro pela PCR foram identificadas, homogeneizadas, filtradas em gaze estéril e centrifugadas a 1350 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e 0,6 mL do sedimento (aproximadamente o equivalente a 7g do tecido cerebral) foram suspensos em PBS com solução antibiótica-antimicótica a 2% (Gibco BRL). Três camundongos C57/BL6 IFN- γ KO foram inoculados por via intraperitoneal com 200 μ l do material referente ao bezerro 1 e três camundongos C57/BL6 IFN- γ KO foram inoculados por via intraperitoneal com 200 μ l do material referente ao bezerro 2. Os camundongos foram mantidos em gaiolas no biotério do IPTSP da Universidade Federal de Goiás-UFG e examinados diariamente para observação de desenvolvimento de sinais clínicos compatíveis com a neosporose. Os animais que apresentaram sinais clínicos severos foram sacrificados em câmara de CO₂ e seus cérebros foram removidos em condições assépticas e identificados. Posteriormente os cérebros foram homogeneizados em PBS com uma solução antibiótica-antimicótica a 2% (Gibco BRL) e passados em agulhas (20 e 25 G). Amostras deste homogeneizado foram imediatamente analisadas para verificar a presença de DNA do parasito por nested-PCR. As amostras positivas para *N. caninum* foram inoculadas em outro camundongo IFN- γ KO para manutenção *in vivo* dos isolados.

4.2.3. Isolamento em cultivo celular

Para o isolamento do parasito em cultivo celular, a cavidade peritoneal dos camundongos IFN- γ KO sacrificados foi lavada com 8mL de meio Dulbeco's modificado (DMEM), suplementado com solução antibiótica-antimicótica a 2% (Gibco BRL) e soro fetal bovino a 2%. O lavado peritoneal foi inoculado imediatamente em monocamada de células MARC-145, cultivadas em frascos de 25 cm² e incubadas a 37°C, em estufa de CO₂ a 5%. Após 24 h o meio foi trocado. Para manter quantidade total mínima de células, passagens do cultivo do

isolado foram feitas em intervalos de quatro a sete dias. A cultura era raspada, passada por agulha de 25G e inoculada em uma nova monocamada de células. Depois que o parasito foi visualizado no tapete celular, a passagem de células foi feita a cada quatro dias, determinando-se a quantidade de taquizoítos, através de contagem em câmara de Neubauer. Os isolados, denominados NC- Goiás 1 e NC-Goiás 2, foram mantidos em cultivo em células MARC-145 por um mês e criopreservados em nitrogênio líquido (REGIDOR-CERRILLO et al., 2008). Porém ao descongelar-se os novos isolados para a caracterização biológica foi observada contaminação por fungos do isolado NC-Goiás 2. O mesmo foi descartado restando o isolado NC-Goiás 1.

4.3. Caracterização biológica em camundongos BALB/c

4.3.1. Desenho experimental

Por se tratar de um Projeto de Cooperação Internacional Brasil-Espanha (CAPES-MECD), foi feita a caracterização biológica do isolado brasileiro obtido em Goiás e de seis isolados espanhóis. Os isolados espanhóis foram previamente obtidos no Departamento de Sanidad Animal, da Unversidad Complutense de Madrid-ES, a partir de amostras de cérebro bezerros congenitamente infectados, de distintas regiões espanholas, mas que não apresentavam sinais clínicos de neosporose, (Quadro 1).

QUADRO 1- Denominação e procedência dos isolados espanhóis

ISOLADO	PROCEDÊNCIA
NC-SPAIN 2H (NC-Sp 2H)	Zaragoza
NC-SPAIN 3H (NC-Sp 3H)	Navarra
NC-SPAIN 4H (NC-Sp 4H)	Navarra
NC-SPAIN6 (NC-Sp 6)	Guipuzcoa
NC-SPAIN8 (NC-Sp 8)	Navarra
NC-SPAIN9 (NC-Sp 9)	Navarra

A caracterização biológica dos sete novos isolados foi realizada no Departamento de Sanidad Animal da Universidad Complutense de Madrid, e se baseou no modelo descrito por COLLANTES-FERNÁNDEZ et al (2006), realizado em camundongos BALB/c.

Camundongos fêmeas, consangüíneas, da linhagem BALB/c de seis semanas de idade, foram obtidos de um fornecedor comercial (Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona, Espanha). Os camundongos eram livres de microrganismos patogênicos como vírus, parasitos e bactérias de acordo com resultados de exames rotineiros do fornecedor. Os animais foram acondicionados em gaiolas com 10 animais cada, com comida e água “*ad libitum*” e submetidos a um fotoperíodo constante de 12:12 horas claro:escuro.

Após um período de duas semanas de adaptação foram realizadas as inoculações. Para isto, os camundongos foram divididos em grupos de 35 animais cada (para os isolados NC-Sp 2H e NC-Sp 3H) e de 40 animais cada (para os isolados NC-Sp 4H, NC-Sp 6, NC-Sp 8, NC-Sp 9 e NC-Goiás 1). Os camundongos foram inoculados, por via intraperitoneal, com 10^6 taquizoítos purificados, obtidos de cultivo *in vitro*, em um volume final de 200 µl/camundongo. Como grupo controle foram utilizados 21 camundongos, inoculados com 200 µl de PBS/camundongo, por via intraperitoneal.

Foram realizados sacrifícios nos dias 1, 2, 4, 8, 16, 32 e 64 pós-infecção (P.I.) de camundongos selecionados aleatoriamente. Os animais foram sacrificados com gás CO₂, cinco animais do grupo infectado e três do grupo controle, em cada dia de sacrifício. No dia 32 P.I. foram sacrificados cinco camundongos dos isolados NC-Sp 2H e NC-Sp 3H e dez camundongos dos isolados NC-Sp 4H, NC-Sp 6, NC-Sp 8, NC-Sp 9 e NC-Goiás 1 devido a necessidade de obtenção de maior volume de soro.

4.3.2. Observação dos sinais clínicos e lesões

Todos os animais foram examinados diariamente para a detecção de sinais clínicos, evolução dos mesmos e verificação da ocorrência de mortalidade. Avaliação dos sinais clínicos foi baseada em estudos precedentes da infecção por *N. caninum* em camundongos, como pêlos ásperos, inatividade, anorexia e sinais neurológicos, que consistiam em inclinação da cabeça, andar em círculos, ataxia, fraqueza pélvica e paralisia (LINDSAY et al., 1995; ATKINSON et al., 1998; EPERON et al., 1999). Durante a necropsia foi avaliada a presença de lesões macroscópicas nos distintos órgãos.

4.3.3. Avaliação da distribuição do parasito no organismo

4.3.3.1. Extração de DNA de sangue e tecidos

Para a extração de DNA foram colhidos, no momento do sacrifício, aproximadamente 500µl de sangue e 15-20 mg de tecido de pulmão e cérebro dos camundongos. As amostras de sangue foram colhidas por punção cardíaca, em tubos de ensaio contendo EDTA. O plasma foi obtido mediante centrifugação, posteriormente foi aliquoteado e mantido a -80°C até o momento da realização do EIE. A fração celular foi armazenada a 4°C para extração do DNA, realizada em menos de 24 horas e posterior análise por PCR. Os cérebros e pulmões igualmente foram colhidos sob circunstâncias assépticas e congelados a -80°C até a extração do DNA.

Para extração de DNA se empregou o kit de extração de DNA genômico para tecidos e sangue RealPure® (Durviz, Valencia - Espanha) de acordo com as instruções do fabricante.

4.3.3.2. Nested-PCR para a detecção de DNA de *Neospora caninum* no sangue e tecidos de camundongos

Para a detecção de DNA específico de *N. caninum*, a técnica utilizada foi *nested-PCR*, que amplifica a região ITS-1 do genoma de *N. caninum*, descrita por

BUXTON et al. (1998). A seqüência dos oligonucleotídeos específicos para o gen ITS1 ribossomal está representada no Quadro 2.

Cada etapa do procedimento foi executada em salas separadas e foram utilizadas ponteiras com filtro para se evitar contaminações. Em todas as reações utilizou-se como controle positivo DNA obtido de taquizoítos cultivados em células Vero, do isolados NC-1 de *N. caninum* e como controle negativo água ultrapura estéril.

QUADRO 2: Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de nested-PCR

Primeira amplificação		Segunda amplificação	
Oligonucleotídeos externos 5'-3'		Oligonucleotídeos internos 5'-3'	
NN1	TCA-ACC-TTT-GAA-TCC-CAA	NP1	TAC-TAC-TCC-CTG-TGA-GTT-G
NN2	CGA-GCC-AAG-ACA-TCC-ATT	NP2	TCT-CTT-CCC-TCA-AAC-GCT

Os produtos obtidos pela amplificação de DNA foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio, esperando-se visualizar um fragmento de 213 pb.

4.3.3.3. Quantificação de DNA

Para a determinação da carga parasitária nas amostras de cérebro dos camundongos positivos na *nested-PCR*, foi realizada a técnica de PCR em tempo real (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2002). De cada uma das amostras analisadas se quantificou tanto o DNA do parasito (amplificação da fração Nc5 do genoma de *N. caninum*) como o DNA do tecido do hospedeiro (amplificação do gen 28S). Para a construção da curva padrão, com fim de quantificar o número de parasitos presentes na amostra a ser analisada, foi feita a extração de DNA a partir de 10^7 taquizoítos do isolado NC-1. Posteriormente, foram feitas diluições decimais do DNA do parasito até a quantidade de 10^{-1} taquizoítos. Para a quantificação do DNA do hospedeiro foi construída outra curva padrão, com

diluições 1:5 de DNA genômico extraído do cérebro de um camundongo em água ultrapura estéril. As reações para a quantificação foram realizadas em duplicatas e a análise da amplificação, a aquisição de dados, e a estatística foram realizadas em ABI 7700 Prism Sequence Detector Machine (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia). A quantificação de *N.caninum* e do DNA do hospedeiro foi realizada mediante a interpolação do Ct ("Cycle threshold") da amostra sobre a curva padrão construída com concentrações conhecidas de DNA, frente aos Ct correspondentes. O resultado se expressou como número de taquizoítos/ μ g de DNA do hospedeiro. Todas as amostras foram ajustadas a uma concentração de 50 ng/ μ l de DNA.

4.3.4. Detecção de anticorpos anti- *Neospora caninum*

O perfil de anticorpos específicos IgG1 e IgG2a frente a *N. caninum* nos soros dos camundongos foi medido por ensaio imuno-enzimático (EIE) indireto. As placas foram antigenadas com antígeno solúvel de taquizoítos de *N. caninum* (Nc-1) obtidos mediante sonicação, como descrito por COLLANTES-FERNÁNDEZ et al. (2006). A diluição dos soros foi 1:100. Como anticorpos secundários se empregaram anti-IgG1 e anti-IgG2a de camundongos, conjugados com a enzima peroxidase (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, E.U.A.) a uma diluição 1/5000. A reação colorimétrica foi observada depois da adição do substrato (ABTS - Sigma®). A absorvância foi medida em um leitor de ELISA a um comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos em densidade óptica (D.O.). Como controles, foram adicionadas em cada placa uma amostra negativa de soro de camundongo (D.O. menor que 0,1) assim como soro de camundongo infectado experimentalmente com uma D.O. maior que 2,0.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos isolados foi realizada agrupando-se os dados obtidos nos dias 1, 2, 4 e 8 P.I. (fase aguda) e nos dias 16, 32 e 64 (fase crônica), analisando-se a influência do isolado e a fase da infecção. As diferenças entre as porcentagens encontradas pela nested-PCR foram analisadas aplicando-se o teste de Qui-quadrado. Quando observadas diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$), os grupos foram comparados dois a dois. A diferença entre as cargas parasitárias, valores de densidade óptica para IgG1, IgG2a e a razão IgG1/IgG2a entre os isolados foram analisadas pela prova de Kruskal-Wallis. Quando observadas diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$), os grupos foram comparados dois a dois pelo teste de U de Mann-Whitney.

6. RESULTADOS

6.1. Isolamento de nova cepa de *Neospora caninum* em camundongos IFN- γ KO e em cultivo celular em Goiás-Brasil

O DNA do parasito foi detectado por *nested*-PCR em 60% das amostras de cérebro do bezerro analisadas. Todos os camundongos inoculados com tecido cerebral PCR-positivo do bezerro apresentaram sinais clínicos compatíveis com a neosporose como pêlos ásperos, ataxia, paraplegia e letargia a partir do dia 22 até 42 P.I. Sinais idênticos foram observados em todos os camundongos IFN- γ KO usados para manter o parasito *in vivo* durante sete passagens, embora nesses animais os sinais aparecessem mais cedo, em torno de seis a 12 dias. Amostras de tecido cerebral dos camundongos inoculados com tecidos do bezerro também foram submetidas a *nested*-PCR para confirmar a infecção por *Neospora*. Todas as amostras testadas foram positivas.

Poucos taquizoítos e vacúolos parasitários foram observados microscopicamente em 56 dias P.I., após nove passagens em cultivo celular. O número de taquizoítos aumentou gradualmente em passagens subseqüentes e mais de 10^6 taquizoítos/mL puderam ser contados, em câmara de Neubauer, após 16 passagens. O DNA extraído da cultura de células infectadas foi analisado igualmente por *nested*-PCR, sendo visualizado um produto de 213pb. O isolado foi denominado NC-Goiás 1.

6.2. Caracterização biológica de isolados em camundongos BALB/c

6.2.1. Mortalidade e sinais clínicos da neosporose

Não foi observada nenhuma manifestação clínica de neosporose e mortalidade nos animais em experimentação até o último dia de sacrifício (dia 64). Nenhuma lesão macroscópica foi observada durante as necropsias realizadas nesse experimento.

6.2.2. Distribuição orgânica do parasito

Ao analisarem-se os resultados obtidos por PCR no sangue verificou-se que, o parasito foi detectado principalmente na fase aguda ($P < 0,05$), do dia 1 P.I. ao dia 8 P.I., e esporadicamente nos dias 16 (NC-Sp 9), 32 (NC-Goiás 1, NC-Sp 4H e NC-Sp 6) e 64(NC-Goiás 1, NC-Sp 4H) P.I. (Tabela 2). A comparação entre os grupos de isolados não demonstrou nenhuma diferença significativa ($P > 0,05$).

Tabela 2 - Porcentagem de camundongos inoculados com taquizoítos de *Neospora caninum* de diferentes isolados, positivos por PCR, na fração celular sanguínea, ao longo da infecção.

ISOLADO	Dias Pós-Infecção								
	Fase aguda					Fase crônica			
	1	2	4	8	Média	16	32	64	Média
NC-Goiás 1	80	100	80	0	65	0	10	20	10
NC-Sp 2H	100	100	100	20	80	0	0	0	0
NC-Sp 3H	100	100	100	0	75	0	0	0	0
NC-Sp 4H	80	100	60	20	65	0	10	20	10
NC-Sp 6	80	80	80	20	65	0	10	0	3,33
NC-Sp 8	60	40	80	40	55	0	0	0	0
NC-Sp 9	100	80	80	20	70	20	0	0	6,67

No pulmão, o parasito foi detectado principalmente na fase aguda ($P < 0,05$) e nos dias 16 (NC-Goiás 1 e NC-Sp 6), 32 (NC-Sp 9) e 64 (NC-Sp 2H e NC-Sp 9) foi detectado DNA do parasito no pulmão de apenas um animal de cada grupo (Tabela 3). Não houve diferença significativa entre os grupos de isolados ($P > 0,05$) nas distintas fases.

Tabela 3 - Porcentagem de camundongos inoculados com taquizóitos de *Neospora caninum* de diferentes isolados, positivos por PCR, no tecido pulmonar, ao longo da infecção.

Isolado	Dias Pós-Infecção								
	Fase aguda					Fase crônica			
	1	2	4	8	Média	16	32	64	Média
NC-Goiás 1	100	80	60	80	80	20	0	0	6,67
NC-Sp 2H	100	100	80	60	85	0	0	20	6,67
NC-Sp 3H	80	100	100	100	95	0	0	0	0
NC-Sp 4H	80	80	100	60	80	0	0	0	0
NC-Sp 6	80	80	100	100	90	20	0	0	6,67
NC-Sp 8	60	40	80	80	65	0	0	0	0
NC-Sp 9	60	60	100	100	80	0	10	20	10

Quanto ao cérebro, foi detectado DNA de *N. caninum* principalmente na fase crônica ($P < 0,05$), sendo que a maior frequência de detecção foi observada no dia 32 P.I. Houve diferença significativa entre os isolados ($P < 0,05$) na fase crônica. Os camundongos inoculados com os isolados NC-Sp 9 e NC-Goiás 1 apresentaram maior frequência de detecção quando comparados aos outros isolados (Tabela 4).

No grupo controle, todas as amostras de sangue, pulmão e cérebro foram negativas para *N. caninum*.

Tabela 4 - Porcentagem de camundongos inoculados com taquizóitos de *Neospora caninum* de diferentes isolados, positivos por PCR, no tecido cerebral, ao longo da infecção.

Isolado	Dias Pós-Infecção								
	Fase aguda					Fase crônica			
	1	2	4	8	Média	16	32	64	Média
NC-Goiás 1	0	0	0	40	10 ^a	60	70	40	56,67 ^a
NC-Sp 2H	20	20	0	0	10 ^a	0	20	40	20 ^b
NC-Sp 3H	0	0	0	0	0 ^a	0	40	0	13,33 ^b
NC-Sp 4H	0	0	0	0	0 ^a	0	20	80	33,33 ^b
NC-Sp 6	0	0	0	20	5 ^a	40	30	0	23,33 ^b
NC-Sp 8	0	0	0	20	5 ^a	0	70	20	30 ^b
NC-Sp 9	0	0	0	80	20 ^a	80	70	40	63,33 ^a

Letras diferentes dentro de uma mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$)

6.2.3. Carga parasitária

Ao comparar as cargas parasitárias entre os grupos de isolados só foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre esses na fase crônica ($P < 0,005$). Os camundongos infectados com o isolado NC-Sp 9 apresentaram cargas parasitárias mais elevadas ($P < 0,05$) quando comparados aos camundongos infectados com os isolados NC-Sp 2H, NC-Sp 3H, NC-Sp 4H e NC-Sp 6 e os camundongos infectados com o isolados NC-Goiás 1 apresentaram cargas parasitárias mais elevadas ($P < 0,05$) quando comparados aos camundongos infectados com os isolados NC-Sp 2H e NC-Sp 3H. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os isolados NC-Sp 9, NC-Sp 8 e NC-Goiás 1 (Figura 4).

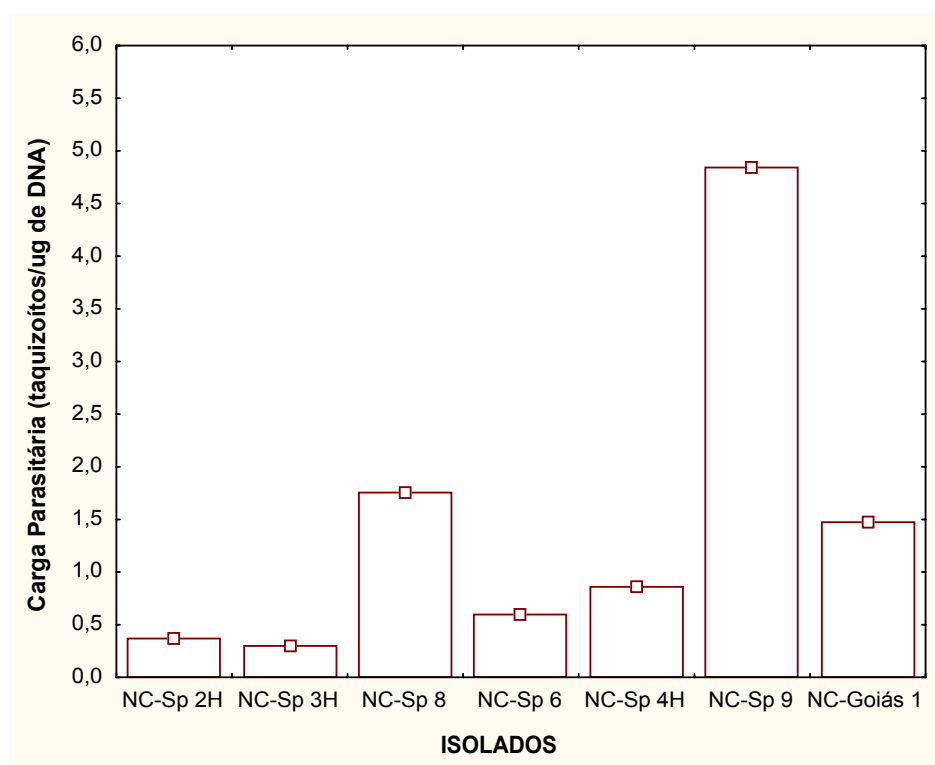


Figura 4 - Carga média de taquizoítos/ μ g de DNA do hospedeiro, observada por PCR Quantitativa, em tecido cerebral de camundongos infectados por diferentes isolados de *Neospora caninum*.

6.2.4. Resposta imune humoral

Anticorpos das classes IgG1 e IgG2a não foram detectados até o dia 16 P.I. e 4 P.I. respectivamente, aumentando gradualmente e se mantendo elevados até o dia 64 P.I. (Figuras 5 e 6).

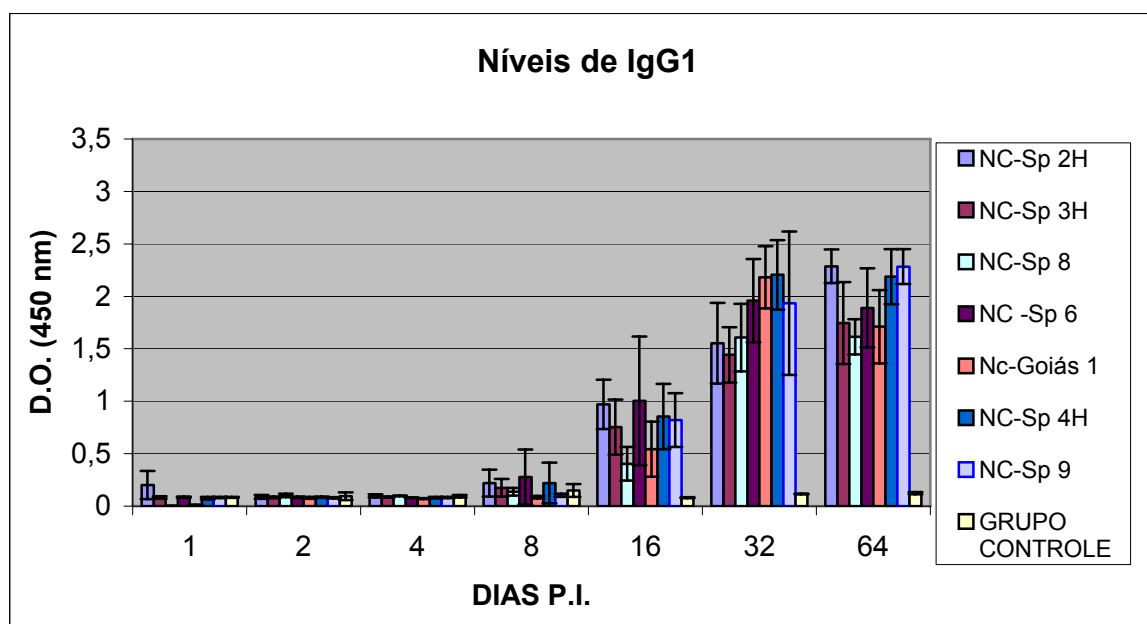


Figura 5 - Produção de IgG1 frente a *Neospora caninum* em camundongos infectados com diferentes isolados e do grupo controle não infectado.

Na resposta IgG1 foram detectadas diferenças significativas entre os grupos de isolados ($P < 0,05$). Camundongos infectados com o isolado NC-Sp 4H apresentaram maiores níveis dessa imunoglobulina, embora somente tenha sido significativamente diferente quando comparado aos níveis detectados com os isolados NC-Sp 3H e NC-Sp 8. Os camundongos infectados com o isolado NC-Sp 8 apresentaram os menores níveis de IgG1 quando comparados aos isolados NC-Sp 4H, NC-Sp 6, NC-Sp 9 e NC-Goiás 1.

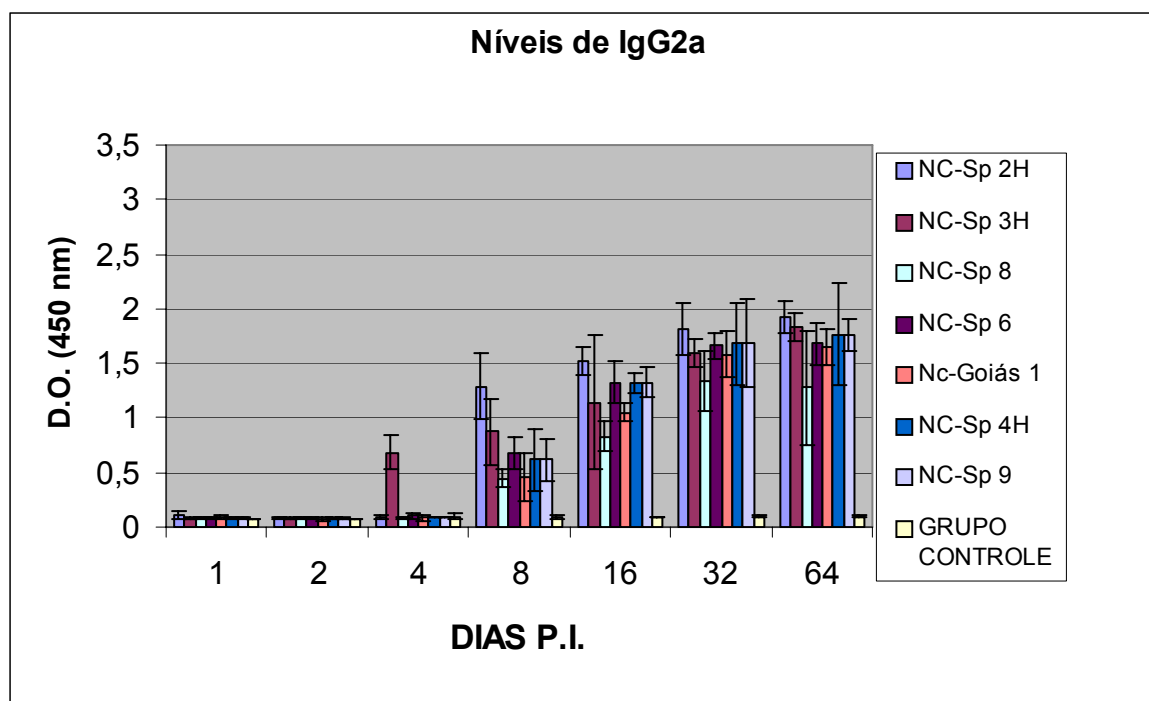


Figura 6 - Produção de IgG2a frente a *N. caninum* em camundongos infectados com diferentes isolados e do grupo controle não infectado.

Na resposta IgG2a os camundongos infectados com o isolados NC-Sp 8 apresentaram menores níveis de IgG2a quando comparados com camundongos infectados com os outros isolados. Já os camundongos infectados com o isolado NC-Sp 9 apresentaram maiores níveis de IgG2a quando comparados aos camundongos infectados com os isolados NC-Sp 8, NC-Sp 6 e NC-Goiás 1 ($P < 0,05$).

A análise da relação de IgG1/IgG2a mostrou predominância de IgG2a nos dias 8 a 16 P.I. ($IgG1/IgG2a < 1$), visto que os níveis de IgG1 mais elevados foram detectados nos dias 32 e 64 P.I. ($IgG1/IgG2a > 1$) na maioria dos grupos.

7. DISCUSSÃO

Até momento, o número de isolados de *N. caninum* de origem bovina no mundo, especialmente no Brasil, é limitado. A soroprevalência elevada de *N. caninum* no rebanho goiano e histórias de abortamento têm sido relatados (MELO et al., 2006; JULIANO 2006; OLIVEIRA 2007; SCHULZE, 2008), entretanto, nenhum isolado local havia sido obtido. Portanto, o isolado NC-Goiás 1 é o primeiro isolado de *N. caninum* obtido em Goiás e o primeiro isolado obtido de um bezerro infectado porém clinicamente saudável relatado na América do Sul.

A utilização de camundongos IFN- γ KO demonstrou ser viável pois os mesmos foram altamente suscetíveis à inoculação de taquizoítos de *N. caninum* e após a infecção pelo parasito, a carga parasitária em seus tecidos foi mais elevada do que em tecidos bovinos, como relatado por NISHIKAWA et al. (2001). A realização da Nested-PCR em todas as porções de cérebro do bezerro utilizado para isolamento foi importante para confirmar a presença do parasito nessas amostras, evitando assim a inoculação de amostras negativas nos camundongos IFN- γ KO proporcionando dessa maneira o sucesso no isolamento.

Os sinais clínicos compatíveis com a neosporose ocorreram no intervalo de tempo descrito em isolamentos anteriores (22 a 42 dias P.I.) (VIANNA et al., 2005). Além disso, sinais idênticos foram exibidos pelos camundongos utilizados para a manutenção do isolado “in vivo”, com a diferença que esses sinais foram observados precocemente (6 a 12 dias P.I.), o que pode ser devido ao aumento gradual da carga parasitária nos tecidos dos camundongos utilizados para a manutenção do isolado “in vivo”.

Taquizoítos de *N. caninum* foram visualizados microscopicamente em cultivo de células MARC-145 no dia 56 P.I. Esse período de tempo está de acordo com o descrito na literatura (DAVISON et al., 1999b; PASTUSIAK et al., 2005; VIANNA et al., 2005; McINNIS et al., 2006; DUBEY & SCHARES, 2006) e pode estar associado diretamente com o número e a viabilidade dos parasitos usados inicialmente para o isolamento. O novo isolado obtido em cultivo celular foi identificado como *Neospora caninum* por Nested-PCR ITS-1.

Para estudar as características biológicas dos isolados NC-Sp 2H, NC-Sp 3H, NC-Sp 4H, NC-Sp 6, NC-Sp 8, NC-Sp 9 e NC-Goiás 1, foram utilizados camundongos BALB/c devido ao sucesso obtido em outros estudos para avaliar a

virulência entre os isolados de *N. caninum*, obtidos a partir de animais assintomáticos (SHIBAHARA et al. 1999; MILLER et al. 2002; OKEOMA et al., 2004).

Não foram observados sinais clínicos e mortalidade nos camundongos infectados durante todo o experimento. Estes resultados diferem dos resultados encontrados em outros estudos de caracterização de outros isolados em camundongos BALB/c (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006; ATKINSON et al., 1998; SHIBAHARA et al., 1999). Sabe-se que isolados de *Toxoplasma gondii* diferem em larga escala de virulência em camundongos (populações virulentas e não virulentas) diferindo significativamente em suas características biológicas e genéticas, contudo compartilham seqüências idênticas de DNA dado o conhecimento prévio relatado por GUO & JOHNSON (1996) por RAPD-PCR. Por razões similares, os isolados aqui estudados por não terem proporcionado o desenvolvimento de sinais clínicos e mortalidade nos camundongos infectados até o final do experimento, podem ser menos patogênicos que os isolados citados acima que, no modelo murino desenvolveram sintomatologia característica de neosporose.

Torna-se evidente que a patogenia causada pela infecção por *Neospora* pode ser isolado-específica. Porém, isto não implica em uma correlação direta com virulência em outros hospedeiros. WILLIAMS et al. (2000) descreveram que a patogenicidade no rebanho será uma combinação de hospedeiro e de fatores do parasito. Estudos adicionais são necessários para examinar a interação entre hospedeiro e parasito, determinando a patogenicidade. Isso se torna essencial para a compreensão da neosporose, a fim de centralizar esforços e planejar estratégias de intervenção para minimizar o impacto da doença.

A parasitemia e disseminação do parasito nos tecidos para os isolados NC-Sp 2H, NC-Sp 3H, NC-Sp 4H, NC-Sp 6, NC-Sp 8, NC-Sp 9 e NC-Goiás 1 demonstraram uma cinética semelhante à descrita para outros isolados (NISHIKAWA et al., 2001; COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006), sendo que a presença do parasito no sangue e pulmão foi mais destacada na fase aguda da infecção ($P < 0,05$) e na fase crônica o parasito foi mais detectado no cérebro ($P < 0,05$). O pico de detecção de parasito no sangue coincidiu com o ápice de detecção de parasito no pulmão, uma vez que o parasito foi detectado nesse

órgão também na fase aguda da infecção. Quando o parasito foi detectado no cérebro, tornou-se pouco freqüente no sangue. A disseminação dos taquizoítos em animais infectados não é bem compreendida. A circulação sanguínea pode ser a rota da disseminação do parasito pois taquizoítos já foram identificados em células mononucleares e polimorfonucleares no cérebro de camundongos inoculados com *N. caninum*. Entretanto, alguns pesquisadores relataram que o parasito pode invadir a medula espinhal através do nervo espinhal e alcançar o cérebro mediante o fluido cérebro-espinhal (YAMAGE et al., 1996). Os resultados obtidos por SHIBAHARA et al. (1999) indicaram que a circulação sanguínea pode ser a rota principal para a propagação do parasito, porque taquizoítos foram identificados principalmente em células endoteliais de vênulas e capilares, ocorrendo a disseminação sistêmica em um intervalo de tempo pequeno.

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os isolados na detecção de DNA de *N. caninum* no sangue e pulmão ($P > 0,05$). Quanto ao cérebro, o parasito passou a ser detectado a partir do primeiro dia P.I. No dia 32 P.I. houve um pico na freqüência de detecção, sendo detectado até o final do experimento. No estudo realizado com os isolados NC-Liv e NC-1 quanto à presença do parasito no cérebro, o DNA desses isolados foi detectado pela primeira vez nos dias 5 e 7 respectivamente e também permaneceu até o final do experimento (63 P.I.) (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006). Houve diferenças significativas entre os isolados quanto à freqüência de detecção nesse órgão na fase crônica, sendo que os camundongos inoculados com os isolados NC-Sp 9 e NC-Goiás 1 apresentaram maior freqüência de detecção quando comparados aos outros isolados.

Foram detectadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os isolados quanto às cargas parasitárias. Os camundongos infectados com o isolado NC-Sp 9 apresentaram cargas parasitárias mais elevadas quando comparados aos camundongos infectados com os isolados NC-SP 2H, NC-Sp 3H, NC-Sp 6 e NC-Sp 4H e os camundongos infectados com o isolados NC-Goiás 1 apresentaram cargas parasitárias mais elevadas ($P < 0,05$) quando comparados aos camundongos infectados com os isolados NC-Sp 2H e NC-Sp 3H. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os isolados NC-Sp 9, NC-Sp 8 e NC-Goiás 1. As médias das cargas parasitárias encontradas nos camundongos

infectados com os isolados NC-Sp 2H, NC-Sp 3H, NC-Sp 4H, NC-Sp 6, NC-Sp 8, NC-Sp 9 e NC-Goiás 1 foram inferiores (≤ 5 taquizoítos/ μg de DNA do hospedeiro) às médias encontradas para os isolados NC-Liv e NC1 por COLLANTES-FERNÁNDEZ et al.(2006). Neste mesmo trabalho os autores demonstraram a associação entre carga parasitária alta e presença de sinais clínicos. As observações aqui registradas sugerem que as baixas cargas parasitárias encontradas justificam a ausência de sinais clínicos compatíveis com a neosporose.

Neste estudo ficou evidente que dentre os órgãos estudados o alvo da infecção na fase aguda foi o pulmão (95,8%) e na fase crônica o cérebro (83,1%), corroborando que estes são os principais locais de persistência do parasito. Estes resultados concordam com resultados obtidos em outros estudos em que os órgãos mais afetados foram os pulmões e cérebro (EPERON et al., 1999; LIDDELL et al., 1999; ZENNER et al., 1999; NISHIKAWA et al., 2001; COLLANTES-FERNÁNDEZ et al.,2006).

Em complemento à caracterização biológica dos isolados, foi realizado o estudo da resposta imune dos camundongos infectados. Primeiramente sabe-se que as células TH1 e TH2 estão relacionadas às imunoglobulinas IgG2a e IgG1 respectivamente, uma vez que, a célula TH1 (célula hospedeiro-protetora, associada à resistência) realça a síntese de IgG2a e a célula TH2 (maior sensibilidade) promovem a produção de IgG1 (LIEW, 2001). A resposta imune observada nesse experimento difere do observado por COLLANTES-FERNÁNDEZ et al. (2006) que descreveram incrementos significativos nos níveis de IgG2a e IgG1 a partir dos dias 7 e 9 P.I. respectivamente. Em nosso experimento a resposta IgG1 em todos os grupos não foi detectada até o dia 16 P.I. e a de IgG2a foi observada a partir do dia 4 P.I. Os níveis dessas imunoglobulinas aumentaram gradualmente e se mantiveram elevados até o dia 64 P.I. Além disso, os níveis superiores de IgG2a em relação a IgG1 nas três primeiras semanas P.I. são similares ao experimento citado previamente coincidindo com o controle da multiplicação do parasito no sangue e pulmão. Posteriormente, os níveis de IgG1 superaram marcadamente os níveis de IgG2a podendo-se relacionar esse fato a uma maior carga parasitária encontrada no cérebro nesse período.

A cinética da distribuição do parasito observada sugeriu fortemente o regulamento imune da infecção. Durante a fase crônica da infecção, o *N. caninum* induziu a altos níveis de ambos os isotipos, mas a produção IgG1 predominou e foi estabelecida uma infecção crônica no cérebro uma vez que nesse órgão a maior freqüência de detecção foi observada nessa fase.

Finalmente os isolados NC-Sp2H, NC-Sp3H, NC-Sp4H, NC-Sp6, NC-Sp8, NC-Sp9 e NC-Goiás 1 foram caracterizados com sucesso quanto à cinética do parasito no sangue, pulmão e cérebro e resposta imune desenvolvida em modelo murino. O curso da infecção nos camundongos infectados por esses isolados foi semelhante às fases de infecção por *N. caninum* descritas por COLLANTES-FERNÁNDEZ et al. (2006) onde a infecção foi dividida três fases; a primeira caracterizada pela parasitemia e presença do parasito nos pulmões, a segunda fase coincidindo com o desenvolvimento de imunidade do hospedeiro; desaparecimento dos taquizoítos do sangue diminuição nos pulmões e aumento no cérebro. A infecção torna-se crônica na terceira fase, sendo que o parasito desaparece dos pulmões, permanecendo no cérebro.

Esses resultados servem de contribuição para estudo da diversidade do protozoário *N. caninum* e indicam que esses isolados são de baixa patogenicidade em camundongos quando comparados com outros isolados conhecidos. Entretanto no futuro torna-se necessário um estudo comparativo entre isolados do Brasil e Espanha e outros países não só de suas características patogênicas, mas também de suas características genéticas em camundongos e bovinos.

8. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos nesse trabalho podemos concluir que:

1. Um no isolado de *N. caninum* nomeado NC-Goiás 1 foi obtido de um bezerros clinicamente saudável em Goiás;
2. Os isolados NC-Sp 2H, NC-Sp 3H, NC-Sp 4H, NC-Sp 6, NC-Sp8, NC-Sp 9 e Nc-Goiás 1 são de baixa patogenicidade em camundongos BALB/c;
3. Em camundongos BALB/c infectados experimentalmente com os isolados NC-Sp 2H, NC-Sp 3H, NC-Sp 4H, NC-Sp 6, NC-Sp8, NC-Sp 9 e NC-Goiás 1, dentre os tecidos estudados, o pulmão é o órgão alvo da infecção na fase aguda e na fase crônica o cérebro;
4. Em camundongos BALB/c infectados experimentalmente com os isolados NC-Sp 2H, NC-Sp 3H, NC-Sp 4H, NC-Sp 6, NC-Sp8, NC-Sp 9 e NC-Goiás 1 os níveis de IgG1 e IgG2a são detectados a partir do dia 16 P.I. e 4 P.I. respectivamente e IgG2a predomina nos dias 8 e 16 P.I. e IgG1 nos dias 32 e 64 P.I.;
5. Existe variabilidade na virulência entre isolados NC-Sp 2H, NC-Sp 3H, NC-Sp 4H, NC-Sp 6, NC-Sp8, NC-Sp 9 e Nc-Goiás 1, sendo estes de virulência moderada-baixa.

9. BIBLIOGRAFIA

1. ÁLVAREZ-GARCIA G. **Identificación y caracterización de antígenos de *Neospora caninum* con interés inmunodiagnóstico en bovinos.** 2003. 279p. Tese (Doutorado) – Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2003.
2. ALVAREZ-GARCIA G, PEREIRA-BUENO J, GOMEZ-BAUTISTA M, ORTEGA-MORA LM. Pattern of recognition of *Neospora caninum* tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted fetuses. **Veterinary Parasitology.** v. 107(1-2), p. 15-27, 2002.
3. ATKINSON, R., HARPER, P. A., RYCE, C., MORRISON, D. A., ELLIS, J. T. Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. **Parasitology.** v. 118, p. 363–370, 1998.
4. BARBER, J. S., HOLMDAHL, O. J. M., OWEN, M. R., GUY, F., UGGLA, A., TREES, A. J. Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum* (DUBEY, CARPENTER, SPEER, TOPPER, UGGLA). **Parasitology** 111: 563–568, 1995.
5. BARBER, J. S., TREES, A. J. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. **International journal for Parasitology.** v. 28, p. 57–64, 1998.
6. BARBER, J., TREES, A. J., OWEN, M., TENNANT, B. Isolation of *Neospora caninum* from a British dog. **The Veterinary record.** v. 133, p. 531–532, 1993.
7. BARR, B.C., CONRAD, P.A., DUBEY, J.P., ANDERSON, M.L. *Neospora* like encephalomyelitis in a calf: Pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.** v. 3, p. 39–46, 1991.
8. BARR, B. C., ROWE, J. D., SVERLOW, K. W., BON DURANT, R. H., ARDANS, A. A., OLIVER, M. N., CONRAD, P. A. Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.** v. 6, p. 207–215, 1994.
9. BASSO, W., VENTURINI, L., VENTURINI, M. C., HILL, D. E., KWOK, O. C. H., SHEN, S. K., DUBEY, J. P. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. **Journal Parasitology.** v. 87, p. 612–618, 2001.
10. BJERKÅS, I., MOHN, S. F. PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Zeitschrift für Parasitenkunde* v. 70, p. 271–274, 1984.
11. BJORKMAN, C., MCALLISTER, M. M., FROSSLING, J., NASLUND, K., LEUNG, F., UGGLA, A. Application of the *Neospora caninum* IgG avidity ELISA in assessment of chronic reproductive losses after an outbreak of neosporosis in a herd of beef cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.** v. 15, p. :3–7, 2003.

12. BOGER, L.A., HATTEL, A.L. Additional evaluation of undiagnosed bovine abortion cases may reveal fetal neosporosis. **Veterinary Parasitology**. v. 113, p. 1–6, 2003.
13. BOULTON, J.G., GILL, P.A., COOK, R.W., FRASER, G.C., HARPER, P.A.W., DUBEY, J.P. Bovine *Neospora* abortion in north-eastern New South Wales. **Australian Veterinary Journal**. v. 72, p. 119–120, 1995.
14. BUXTON, D., MCALLISTER, M.M., DUBEY, J.P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**. v.18, n.12, 2002.
15. BUXTON, D., MALEY, S.W., WRIGHT, S., THOMSON, K.M., RAE, A.G., INNES, E.A. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. **Journal of Comparative Pathology** v.118, p. 267-279, 1998.
16. CAETANO-DA-SILVA, A., FERRE, I., COLLANTES-FERNANDEZ, E., NAVARRO, V., ADURIZ, G., UGARTE-GARAGALZA, C., ORTEGA- MORA, L.M. Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 62,p. 1329-1336, 2004.
17. CANADA, N., MEIRELES, C. S., ROCHA, A., SOUSA, S., THOMPSON, G., DUBEY, J. P., ROMAND, S., THULLIEZ, P., CORREIA DA COSTA, J. M. First Portuguese isolate of *Neospora caninum* from an aborted fetus from a dairy herd with endemic neosporosis. **Veterinary Parasitology**. v. 110, p.11–15, 2002.
18. CANADA, N., MEIRELES, C. S., MEZO, M., GONZALEZ-WARLETA, M., CORREIA DA COSTA, J. M., SREEKUMAR, C., HILL, D. E., MISKA, K. B., DUBEY, J. P. First isolation of *Neospora caninum* from an aborted bovine fetus in Spain. **Journal of Parasitology**. v. 90, p. 863–864, 2004.
19. CHEADLE, M. A., LINDSAY, D. S., ROWE, S., DYKSTRA, C. C., WILLIAMS, M. A., SPENCER, J. A., TOIVIO-KINNUCAN, M. A., LENZ, S. D., NEWTON, J. C., ROLSMA, M. D., BLAGBURN, B. L. Prevalence of antibodies to *Neospora* sp. in horses from Alabama and characterization of an isolate recovered from a naturally infected horse. **International Journal Parasitology**. v. 29, p. 1537–1543, 1999.
20. CHEAH, T. S., MATTSSON, J. G., ZAINI, M., SANI, R. A., JAKUBEK, E. B., UGGLA, A., CHANDRAWATHANI, P. Isolation of *Neospora caninum* from a calf in Malaysia. **Veterinary Parasitology**. 126:263–269, 2004.
21. COLE, R.A., LINDSAY, D.S., DUBEY, J.P., TOIVIO-KINNUCAN, M.A., BLAGBURN, B.L. Characterization of a murine monoclonal antibody generated against *Neospora caninum* by western blot analysis and immunoelectron microscopy. **American Journal of Veterinary Research**. v. 55, p. 1717–1722, 1994.

22. COLLANTES-FERNÁNDEZ, E. Patogenia de la neosporosis en el feto bovino y en un modelo murino experimental. 2003. 277F. Tese (Doutorado em Veterinária)- Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Espanha.
23. COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., ÁLVAREZ-GARCÍA, G., PÉREZ-PÉREZ, V., PEREIRA- BUENO, J., ORTEGA-MORA, L.M. Characterization of pathology and parasite load in outbred and inbred mouse models of chronic *Neospora caninum* infection. **Journal of Parasitology**. v. 90, p. 579– 583, 2004.
24. COLLANTES-FERNANDEZ E, LOPEZ-PEREZ I, ALVAREZ-GARCIA G, ORTEGA-MORA LM. Temporal distribution and parasite load kinetics in blood and tissues during *Neospora caninum* infection in mice. **Infection and immunity**. v. 74(4), p. 2491-2494, 2006.
25. COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., ZABALLOS, A., ALVAREZ-GARCIA, G., ORTEGA-MORA, L. M. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. **Journal of clinical microbiology**. v. 40, p. 1194-1198, 2002.
26. CONRAD, P. A., BARR, B. C., SVERLOW, K. W., ANDERSON, M., DAFT, B., KINDE, H., DUBEY, J. P., MUNSON, L., ARDANS, A. *In vitro* isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine foetuses. **Parasitology**. v. 106, p. 239–249, 1993.
27. CORBELLINI, L. G., PESCADOR, C.A., FRANTZ, F., WUNDER, E., STEFFEN, D., SMITH, D. R., DRIEMEIER, D. Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection: Importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil. **The Veterinary Journal**. v. 172, p. 114–120, 2006.
28. CUDDON, P., LIN, D. S., BOWMAN, D. D., LINDSAY, D. S., MILLER, T. K., DUNCAN, I. D., DELAHUNTA, A., CUMMINGS, J., SUTER, M., COOPER, B., KING, J. M., DUBEY, J. P. *Neospora caninum* infection in English springer spaniel littermates: diagnostic evaluation and organism isolation. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 6, p. 325–332, 1992.
29. DAVISON, H.C., OTTER, A., TREES, A.J. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. **International Journal for Parasitology**. v. 29, p. 1683±1689, 1999a.
30. DAVISON, H. C., GUY, F., TREES, A. J., RYCE, C., ELLIS, J. T., OTTER, A., JEFFREY, M., SIMPSON, V. R., HOLT, J. J. *In vitro* isolation of *Neospora caninum* from a stillborn calf in the United Kingdom. **Research in Veterinary Science**. v. 67, p. 103–105, 1999b.
31. DAVISON, H. C., GUY, C. S., MCGARRY, J.W., GUY, F., WILLIAMS, D. J. L., KELLY, D. F. AND TREES, A. J. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. **Research in Veterinary Science**. v. 70, p. 163-168, 2001.

32. DE MAREZ, T., LIDDELL, S., DUBEY, J. P., JENKINS, M. C., GASBARRE, L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: Humoral and cellular immune responses. **International Journal for Parasitology** v. 29, p. 1647-1657, 1999.
33. DE MEERSCHMAN, F., FOCANT, C., DETRY, J., RETTIGNER, C., CASSART, D., LOSSON, B. Clinical, pathological and diagnostic aspects of congenital neosporosis in a series of naturally infected calves. **The Veterinary record**. v.157, p. 115–118, 2005.
34. DIJKSTRA, T., EYSKER, M., SCHARES, G., CONRATHS, F. J., WOUDA, W., BARKEMA, H. W. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrums spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *International Journal of Parasitology*. v.31, p. 747–752, 2001.
35. DUBEY, J. P. Neosporosis in cattle: Biology and economic impact. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 214, p. 1160-1163, 1999.
36. DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**. v. 41, n. 1, p. 1-16, 2003a.
37. DUBEY, J.P. Neosporosis in cattle. **Journal of Parasitology**. v. 89,p. 542–556, 2003b.
38. DUBEY, J.P., BARR, B.C., BARTA, J.R. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**. v. 32, p. 929-946, 2002.
39. DUBEY, J. P., BUXTON, D., WOUDA, W. Pathogenesis of Bovine Neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**.v.134, p. 267-289, 2006.
40. DUBEY, J. P., DOROUGH, K. R., JENKINS, M. C., LIDDELL, S., SPEER, C. A., KWOK, O. C. H., SHEN, S. K. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. **International Journal Parasitology**. v. 28, p. 1293–1304, 1998.
41. DUBEY, J. P., HATTEL, A. L., LINDSAY, D. S., TOPPER, M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 193, p. 1259–1263,1988.
42. DUBEY, J. P., KOESTNER, A., PIPER, R. C. Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.197, p. 857–860, 1990.

43. DUBEY, J. P., LIDDELL, S., MATTSON, D., SPEER, C. A., HOWE, D. K., JENKINS, D M. C. Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. **Journal of Parasitology**. v. 87, p. 345–353, 2001.
44. DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**. v. 67, p. 1-59, 1996.
45. DUBEY, J.P., SCHARES, G., ORTEGA-MORA, L.M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 20, p. 323–367, 2007.
46. DUBEY, J.P., SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 1–34, 2006.
47. DUBEY, J.P., SREEKUMAR, C., KNICKMAN, E., MISKA, K.B., VIANNA, M.C.B., KWOK, O.C.H., HILL, D.E., JENKINS, M.C., LINDSAY, D.S., GREENE, C.E. Biologic, morphologic, and molecular characterization of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. **International Journal for Parasitology**. v. 34, p. 1157–1167, 2004.
48. ENTRICAN, G. Immune Regulation during Pregnancy and Host–Pathogen Interactions in Infectious Abortion. **Journal of Comparative Pathology**. v.126, p. 79–94, 2002.
49. EPERON, S., BRONNIMANN, K., HEMPHILL, A., GOTTSTEIN, B. Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (microMT) mice to *Neospora caninum* infection. **Parasite Immunology**.v. 21, p. 225–236, 1999.
50. FIORETTI, D.P., PASQUAI, P., DIAFERIA, M., MANGILI, V., ROSIGNOLI, L. *Neospora caninum* infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. **Journal of Veterinary Medicine**. v.50, p. 399–404, 2003.
51. FIORETTI, D. P., ROSIGNOLI, L., RICCI, G., MORETTI, A., PASQUALI, P., POLIDORI, G. A. *Neospora caninum* infection in a clinically healthy calf: parasitological study and serological follow-up. **Journal of Veterinary Medicine**. v. 47, p. 47–53, 2000.
52. GONDIM, L. F. P., GAO, L., MCALLISTER, M. M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. **Journal of parasitology**. v. 88, p. 1159–1163, 2002.
53. GONDIM, L. F. P., MCALLISTER, M. M., MATEUS-PINILLA, N. E., PITT, W. C., MECH, L. D., NELSON, M. E. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. **Journal of Parasitology**. v. 90, p. 1361–1365, 2004a.

54. GONDIM, L. F. P., PINHEIRO, A. M., SANTOS, P. O. M., JESUS, E. E. V., RIBEIRO, M. B., FERNANDES, H. S., ALMEIDA, M. A. O., FREIRE, S. M., MEYER, R., MCALLISTER, M. M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**. v. 101, p. 1–7, 2001.
55. GONDIM, L.F.P., MCALLISTER, M.M., PITT, W.C., ZEMLICKA, D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal Parasitology**. v. 34, p. 159–161, 2004b.
56. GOTTSTEIN, B., EPERON, S., DAI, W. J., CANNAS, A., HEMPHILL, A., GREIF, G. Efficacy of toltrazuril and ponazuril against experimental *Neospora caninum* infection in mice. **Parasitology Research**. v. 87, p. 43-48, 2001.
57. GUO, Z-G., JOHNSON, A. M. DNA polymorphisms associated with murine virulence of *Toxoplasma gondii* identified by RAPD PCR. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. v. 219, p. 17±26, 1996.
58. HAY, W. H., SHELL, L. G., LINDSAY, D. S., DUBEY, J. P. Diagnosis and treatment of *Neospora caninum* infection in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 197, p. 87–89, 1990.
59. HEMPHILL, A., VONLAUFEN, N., NAGULESWARAN, A., KELLER, N., RIESEN, M., GUETG, N., SRINIVASAN, S., ALAEDDINE, F. Tissue culture and explant approaches to studying and visualizing *Neospora caninum* and its interactions with the host cell. **Microscopy and Microanalysis**. v.10, p.602-620, 2004.
60. HERNANDEZ J, RISCO C, DONOVAN A. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 219, p. 632-635, 2001.
61. HO, M.S.Y., BARR, B.C., ROWE, J.D., ANDERSON, M.L., SVERLOW, K.W., PACKHAM, A., MARSH, A.E., CONRAD, P.A. Detection of *Neospora* sp. from infected bovine tissues by PCR and probe hybridization. **Journal Parasitology**. v. 83, p. 508–514, 1997.
62. INNES, E. A. The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. **Parasitology**. v. 134, p. 1903-1910, 2007.
63. INNES, E. A., ANDRIANARIVO, A. G., BJÖRKMAN, C., WILLIAMS, D. J., CONRAD, P. A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, v.18, p. 497-504, 2002.
64. INNES, E. A., WRIGHT, S. E., MALEY, S., RAE, A., SCHOCK, A., KIRVAR, E., BARTLEY, P., HAMILTON, C., CAREY, I. M., BUXTON, D. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. **International Journal Parasitology**, v.31, p.1523-1534, 2001.

65. JENKINS, M., T. BASZLER, C. BJÖRKMAN, G. SCHARES, AND D. WILLIAMS. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **International Journal for Parasitology**. v. 32, p. 631-636, 2002.
66. JULIANO, R.S. **Aspectos sanitários e do sistema de fagócitos de bovinos da raça Curraleiro**. 2006. 115f. Tese (Doutorado em Ciência Animal)-Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, Goiânia, Goiás.
67. KIM, J. H., SOHN, H. J., HWANG, E. K., HWANG, W. S., HUR, K., JEAN, Y. H., LEE, B. C., RHEE, J. C., KANG, Y. B., YAMANE, I., KIM, D. J. *In vitro* isolation of a bovine *Neospora* in Korea. **The Korean Journal of Parasitology**. 38:139–145, 1998.
68. KIM, J. H., SOHN, H. J., HWANG, W. S., HWANG, E. K., JEAN, Y. H., YAMANE, I., KIM, D. Y. *In vitro* isolation and characterization of bovine *Neospora caninum* in Korea. **Veterinary Parasitology**. v. 90, p. 147–154, 2000.
69. KOYAMA, T., KOBAYASHI, Y., OMATA, Y., YAMADA, M., FURUOKA, H., MAEDA, R., MATSUI, T., SAITO, A., MIKAMI, T. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a pregnant sheep. **Journal Parasitology**. 87:1486–1488, 2001.
70. LEI, Y., DAVEY, M., ELLIS, J.T. Attachment and invasion of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* to epithelial and fibroblast cell lines *in vitro*. **Parasitology**. v.131, p. 583–590, 2005.
71. LIDDELL, S., JENKINS, M. C., COLLICA, C. M., DUBEY, J. P. Prevention of vertical transfer of *Neospora caninum* in Balb/c mice by vaccination. **The Journal of Parasitology** v. 85, (6), p. 1072-1075, 1999.
72. LIEW, F. Y. Th1 and Th2 cells: a historical perspective. **Nature reviews Immunology**. v. 2, p. 55-60, 2001.
73. LINDSAY, D. S., J. P. DUBEY. *In vitro* development of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) from dogs. **Journal of Parasitology** v. 75, p. 163-165, 1989.
74. LINDSAY, D. S., LENZ, S. D., COLE, R. A., DUBEY, J. P., BLAGBURN, B. L. Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. **Journal Parasitology**. v.81, p. 313-315, 1995.
75. LOCATELLI-DITTRICH, R., RICHARTZ, R. R. T. B., GASINO-JOINEAU, M. E., PINCKNEY, R. D., SOUSA, R. S., LEITE, L. C., THOMAZ-SOCCOL, V. Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Parana', southern Brazil. **The Veterinary Record**. v.153, p. 366–367,2003.
76. LOCATELLI-DITTRICH, R., THOMAZ-SOCCOL, V., RICHARTZ, R. R. T. B., GASINO- JOINEAU, M. E., VANDER VINNE, R., PINCKNEY, R. D. Isolamento de

Neospora caninum de feto bovino de rebanho leiteiro no Parana'. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.13, p. 103–109, 2004.

77. LONG, M. T., B. A. MATHISON. 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.

78. LOPEZ-PÉREZ, I. C., RISCO-CASTILLO, V., COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., ORTEGA-MORA, L. M. Comparative effect of *Neospora caninum* infection in BALB/c mice at three different gestation periods. **Journal of Parasitology**. v. 92(6), p. 1286-1291, 2006.

79. MCCANN, C.M., MCALLISTER, M.M., GONDIM, L.F.P., SMITH, R.F., CRIPPS, P.J., KIPAR, A., WILLIAMS, D.J.L., TREES, A.J. *Neospora caninum* in cattle: Experimental infection with oocysts can result in exogenous transplacental infection, but not endogenous transplacental infection in the subsequent pregnancy. **International Journal for Parasitology**. v. 37, p. 1631–1639, 2007.

80. MACALDOWIE, C., MALEY, S. W., WRIGHT, S., BARTLEY, P., ESTEBAN-REDONDO, I., BUXTON, D., INNES, E. A. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. **Journal of Comparative Pathology**. v. 131, p. 142–156, 2004.

81. MAGNINO, S., VIGO, P. G., FABBI, M., COLOMBO, M., BANDI, C., GENCHI, C. Isolation of a bovine *Neospora* from a newborn calf in Italy. **The Veterinary Record**. v. 144, p. 456, 1999.

82. MAGNINO, S., VIGO, P. G., BANDI, C., BAZZOCCHI, C., FABBI, M., GENCHI, C. Small-subunit rDNA sequencing of the Italian bovine *Neospora caninum* isolate (NC-PV1 strain). *Parassitologia* 42:191–192, 2000.

83. MARSH, A. E., BARR, B. C., SVERLOW, K., HO, M., DUBEY, J. P., CONRAD, P. A. Sequence analysis and comparison of ribosomal DNA from bovine *Neospora* to similar coccidial parasites. **Journal of Parasitology**. 81:530–535, 1995.

84. MARSH, A. E., BARR, B. C., PACKHAM, A. E., CONRAD, P. A. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **Journal of Parasitology**. v. 84, p. 983–991, 1998.

85. MALEY, S. W., BUXTON, D., RAE, A. G., WRIGHT, S. E., SCHOCK, A., BARTLEY, P. M., ESTEBAN-REDONDO, I., SWALES, C., HAMILTON, C. M., SALES, J., INNES, E. A. The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle : inoculation at mid-gestation. **Journal of Comparative Pathology**. v. 129, p.186–195, 2003.

86. MCGUIRE, A.M., MCALLISTER, M.M., JOLLEY, W.R., ANDERSON-SPRECHER, R.C. A protocol for the production of *Neospora caninum* tissue cysts in mice. **Journal Parasitology**. v. 83, p. 647–651, 1997.
87. MCALLISTER, M. M., BJORKMAN, C., ANDERSON-SPRECHER, R., ROGERS, D. G. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 217, p. 881–887, 2000.
88. MCALLISTER, M. M., DUBEY, J. P., LINDSAY, D. S., JOLLEY, W. R., WILLS, R. A., MCGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal Parasitology**. v. 28, p. 1473–1478, 1998.
89. MCALLISTER, M. M., WALLACE, R. L., BJORKMAN, C., GAO, L., FIRKINS, L. D. A probable source of *Neospora caninum* infection in an abortion outbreak in dairy cows. **Bovine Practic**. v. 39, p. 69–74, 2005.
90. MCINNES, L. M., IRWIN, P., PALMER, D. G., RYAN, U. M. In vitro isolation and characterization of the first canine *Neospora caninum* isolate in Australia. **Veterinary Parasitology**. 137:355–363, 2006.
91. MELO, D. P.G. Neosporose bovina: Prevalência, transmissão e diagnóstico em fetos abortados, nas microrregiões de Goiânia e Anápolis, Goiás, Brasil. 2005. 36f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
92. MELO, D. P.G., CAETANO, A.S., ORTEGA-MORA, L.M., BASTOS, S.A., BOAVENTURA, C.M. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos das microrregiões de Goiânia e Anápolis, Goiás, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, 3, p. 105-109, 2006.
93. MILLER, C. M. D., QUINN, H. E., WINDSOR, P. A., ELLIS, J. T. Characterization of the first Australian isolate of *Neospora caninum* from cattle. **Australian Veterinary Journal**. v. 80:620–625, 2002.
94. MOSKWA, B., CABAJ, W., PASTUSIAK, K., BIEN, J. The suitability of milk in detection of *Neospora caninum* infection in cows. **Acta Parasitologica**. v. 48, p. 138–141, 2003.
95. NISHIKAWA, Y., TRAGOOLPUA, K., INOUE, N., MAKALA, L., NAGASAWA, H., OTSUKA, H., MIKAMI, T. In the absence of endogenous gamma interferon, mice acutely infected with *Neospora caninum* succumb to a lethal immune response characterized by inactivation of peritoneal macrophages. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 8(4), p.811-6, 2001.
96. OLIVEIRA, V. S. F. **Transmissão vertical e ocorrência de abortos por *Neospora caninum* em bovinos de uma central de transferência de embriões**

em Goiás. 2007. 45f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

97. OKEOMA, C. M., WILLIAMSON, N. B., POMROY, W. E., STOWELL, K. M., GILLESPIE, L. M.,. Isolation and molecular characterization of *Neospora caninum* in cattle in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal.** v. 52, p. 364–370, 2004.

98. PASTUSIAK, K., CABAJ, W., MOSKWA, B., PASTUSIAK, K., CABAJ, W., MOSKWA, B. Isolation, identification and maintenance in cell culture of the first Polish isolate of *Neospora caninum*. **In: Proceedings of COST Action 854: Protozoal Reproduction Losses in Farm Ruminants**, v.51, Suppl. Poland p. 68, 2005.

99. PENA, J. H. J., SOARES, R. M., RAGOZO, A. M. A., MONTEIRO, R. M., YAI, L. E. O., NISHI, S. M., GENNARI, S. M. Isolation and molecular detection of *Neospora caninum* from naturally infected sheep from Brazil. **Veterinary Parasitology.** v. 147, p. 61–66, 2007.

100. PEREIRA-BUENO, J., QUINTANILLA-GOZALO, A., SEIJAS-CARBALLEDO, A., COSTAS, E., ORTEGA-MORA, L. M. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: pattern of transmission and age-related antibody fluctuations, in: HEMPHILL, A., GOTTSTEIN, B. A European perspective on *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology.** v. 30, p. 906-909, 2000.

101. PÉREZ-ZABALLOS FJ, ORTEGA-MORA LM, ALVAREZ-GARCÍA G, COLLANTES-FERNÁNDEZ E, NAVARRO-LOZANO V, GARCÍA-VILLADA L, COSTAS E. Adaptation of *Neospora caninum* isolates to cell-culture changes: an argument in favor of its clonal population structure. **Journal of Parasitology.** v. 91, p. 507-510, 2005.

102. PETERS, M., WAGNER, F., SCHARES, G. Canine neosporosis: clinical and pathological findings and first isolation of *Neospora caninum* in Germany. **Parasitology Research.** v. 86, p. 1–7, 2000.

103. QUINN, H. E., MILLER, C. M., RYCE, C., WINDSOR, P. A., ELLIS, J. T. Characterization of an outbred pregnant mouse model of *Neospora caninum* infection. **Journal Parasitology.** v. 88, p. 691–696, 2002.

104. QUINTANILLA-GOZALO, A., J. PEREIRA-BUENO, A. SEIJAS-CARBALLEDO, E. COSTAS, AND L. M. ORTEGA-MORA. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations, in: HEMPHILL, A., GOTTSTEIN, B. A European perspective on *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology.** v. 30, p.900-906, 2000.

105. REGIDOR-CERRILLO J, GOMEZ-BAUTISTA M, PEREIRA-BUENO J, ADURIZ G, NAVARRO-LOZANO V, RISCO-CASTILLO V, FERNÁNDEZ-GARCÍA A, PEDRAZA-DIAZ S, ORTEGA-MORA LM 2008. Isolation and genetic

characterization of *Neospora caninum* from asymptomatic calves in Spain (Submitted).

106. REGIDOR-CERRILLO J, PEDRAZA-DIAZ S, GOMEZ-BAUTISTA M, ORTEGA-MORA LM. Multilocus microsatellite analysis reveals extensive genetic diversity in *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**. v. 92, p. 517-24, 2006.

107. RODRIGUES, A.A.R., GENNARI, S.M., AGUIAR, D.M., SREEKUMARC, C., HILLC, 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. **Veterinary Parasitology**. v. 124, p. 139–150, 2004.

108. ROSYPAL, A.C., LINDSAY, D.S. The sylvatic cycle of *Neospora caninum*: where do we go from here? **Trends in Parasitology**. v. 21, n.10, p. 439-440, 2005.

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

110. SCHARES, G., BÄRWALD, A., STAUBACH, C., SÖNDGEN, P., RAUSER, M., SCHRÖDER, R., PETERS, M., WURM, R., SELHORST, T., CONRATHS, F.J. p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **Veterinary Parasitology**. v. 106, p. 293–305, 2002.

111. SCHARES, G., PANTCHEV, N., BARUTZKI, D., HEYDORN, A. O., BAUER, C., CONRATHS, F. J. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondida hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. **International Journal Parasitology**. v. 35, p. 1525–1537, 2005.

112. SCHARES, G., PETERS, M., WURM, R., BARWALD, A., CONRATHS, F. J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. **Veterinary Parasitology**. v.80, p. 87–98, 1998.

113. SCHOCK, A., INNES, E. A., YAMANE, I., LATHAM, S.M., WASTLING, J.M. Genetic and biological diversity among isolates of *Neospora caninum*. **Parasitology**. 123, 13-23, 2001.

114. SCHULZE, C. M. B. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em fêmeas bovinas do estado de Goiás e fatores associados. 2008. 77f Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal)- Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, Goiânia, Goiás.

115. SHIBAHARA, T., KOKUHO, T., ETO, M., HARITANI, M., HAMAOKA, T., SHIMURA, K., NAKAMURA, K., YOKOMIZO, Y., YAMANE, I. Pathological and

Immunological Findings of Athymic Nude and Congenic Wild Type BALB/c Mice Experimentally Infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Pathology**. v. 36, p. 321–327, 1999.

116. STENLUND, S., BJORKMAN, C., HOLMDAHL, O. J. M., KINDAHL, H., UGGLA, A. Characterisation of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*. **Parasitology Research**. v. 83, p. 214–219, 1997.

117. THILSTED, J. P., DUBEY, J. P. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 1, p. 205–209, 1989.

118. TREES, A. J., WILLIAMS, D. J. L. Neosporosis in the United Kingdom. **International Journal Parasitology**. v. 30, p. 891–893, 2000.

119. TREES, A. J., WILLIAMS, D. J. L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**. v. 21, p.558–561, 2005.

120. VIANNA, M.C.B., SREEKUMAR, C., MISKA, K.B., HILL, D.E., DUBEY, J.P. Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Veterinary Parasitology** v. 129, p. 253–257, 2005.

121. YAMAGE, M., FLECHTNER, O., GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain “cyst” DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). **Journal of Parasitology** v. 82p.b 72–279, 1996.

122. YAMANE, I., KOKUHO, T., SHIMURA, K., ETO, M., SHIBAHARA, T., HARITANI, M., OUCHI, Y., SVERLOW, K., CONRAD, P. A. In vitro isolation and characterization of a bovine *Neospora* species in Japan. **Research in veterinary science**. v.63, p. 77–80, 1997.

123. YAMANE, I., SHIBAHARA, T., KOKUHO, T., SHIMURA, K., HAMAOKA, T., HARITANI, M., CONRAD, P. A., PARK, C. H., SAWADA, M., UMEMURA, T. An improved isolation technique for bovine *Neospora* species. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 10, p. 364–368, 1998.

124. WALDNER, C.L. Serological status for *N. caninum*, bovine viral diarrhea virus, and infectious bovine rhinotracheitis virus at pregnancy testing and reproductive performance in beef herds. **Animal Reproduction Science**. v. 90, p. 219–242, 2005.

125. WILLIAMS, D. J., GUY, C.S., MCGARRY, J.W., GUY, F., TASKER, L., SMITH, R.F., MACEACHERN, K., CRIPPS, P.J., KELLY, D.F., TREES, A.J. *Neospora caninum* associated abortion in cattle: the time of experimentally induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. **Parasitology**. v. 121, p.4347–4358, 2000.

126. ZENNER, L., A. FOULET, Y. CAUDRELIER, F. DARCY, B. GOSSELIN, A. CAPRON, AND M. F. CESBRON-DELAUW. Infection with *Toxoplasma gondii* RH and Prugniaud strains in mice, rats and nude rats: kinetics of infection in blood and tissues related to pathology in acute and chronic infection. *Pathology Research*. 195:475–485, 1999.

127. ZINTL, A., PENNINGTON, S. R., MULCAHY, G. Comparison of different methods for the solubilisation of *Neospora caninum* (Phylum Apicomplexa) antigen. ***Veterinary Parasitology***. v. 135, p. 205–213, 2006.