

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

***Neospora caninum*: DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO
GENÉTICA EM FETOS DE FÊMEAS ZEBUÍNAS ABATIDAS,
GOIÁS, BRASIL**

Paula Rogério Fernandes
Orientadora: Prof^a. Dra. Andréa Caetano da Silva

**GOIÂNIA
2010**

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

***Neospora caninum*: DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO
GENÉTICA EM FETOS DE FÊMEAS ZEBUÍNAS ABATIDAS,
GOIÁS, BRASIL**

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

Área de Concentração:
Sanidade Animal e Higiene e Tecnologia de Alimentos

Orientadora:

Prof^a. Dra. Andréa Caetano da Silva

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares

Prof^a. Dra. Lígia Miranda Ferreira Borges

**GOIÂNIA
2010**

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

F362n Fernandes, Paula Rogério.
 Neospora caninum [manuscrito]: diagnóstico e caracterização
 genética em fetos de fêmeas zebuínas abatidas, Goiás, Brasil /
 Paula Rogério Fernandes. - 2010.
 95 f. : il.

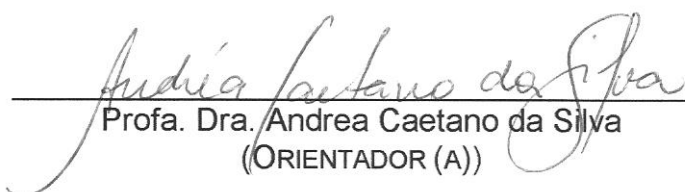
 Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréa Caetano da Silva.
 Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,
 Escola de Veterinária, 2010.
 Bibliografia.

 1. *Neospora caninum* – Protozoário 2. Gado Zebu (*Bos indicus*)
 – Goiás (Estado) 3. Neosporose – Diagnóstico 4. Caracterização
 genética – Microssatélites I.Título.

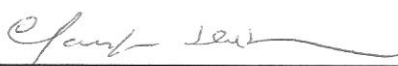
CDU: 619:636.2(817.3)

PAULA ROGÉRIO FERNANDES

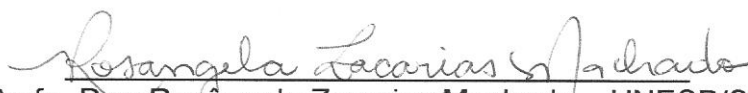
Tese defendida e aprovada em **25/02/2010** pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



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



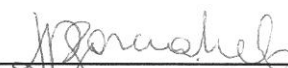
Prof. Dra. Cláudia Del Fava - Instituto Biológico SP/SP



Prof. Dra. Rosângela Zacarias Machado – UNESP/SP



Prof. Dra. Valéria de Sá Jayme (memoria)



Dra. Débora Pereira Garcia Melo - Bolsista PNPd/CAPES

AGRADECIMENTOS

Ao longo de quatro anos de doutorado, são muitas as pessoas que colaboraram, e a elas espero conseguir transmitir toda a minha gratidão.

À Professora Andréa, meu especial agradecimento pela compreensão, amizade, paciência, ajuda e acima de tudo pela confiança e estímulo. Obrigada pela oportunidade de conhecer uma nova língua, uma nova cultura, a amplitude de meus conhecimentos técnicos quando confiou a mim a oportunidade de representá-la fora do Brasil.

À CAPES/MECD-Espanha, pela bolsa de doutorado-sanduíche que custeou todo o meu aprendizado.

À Carla, Débora, Vanessa e Marcelo, por serem tão bons companheiros de trabalho e de vida, por compartilharem as alegrias, os risos, os sorrisos confortantes e, porque não, o desespero em busca de ser “alguém”. Mas amigos, por termos um ao outro, já somos “grandes”. Vai ser difícil encontrar companheiros como vocês. Marcelo, obrigada por dividir tamanho esforço na colheita das amostras.

À Sara, Sabrina, Lorena, Hélio, Kennedy e a mais nova da “casa” – Carol, pelos momentos de humor e de idéias compartilhadas.

Aos professores Guido, Lígia, Valéria e Maria Lúcia, pela generosa ajuda. Aos professores Francisco e Benedito pelo ânimo e por me ensinarem tantas coisas.

A todo o corpo docente e técnico do Departamento de Medicina Preventiva e do Setor de Patologia Animal, em especial aos Professores Eugênio e Veridiana pela disponibilidade de material e por permitir-me trabalhar em suas instalações.

Ao técnico Erildo Ribeiro da Silva do Departamento de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFG, pelos inúmeros cortes histopatológicos realizados com tamanha boa vontade.

À Marina e à Liliana, pelo grande interesse e colaboração na análise histológica e nas inúmeras tentativas de imunoistoquímica.

Ao Jorge, Lorena e Cybelly, pela grande ajuda técnica em um ambiente tão inóspito de colheita de amostras dos fetos.

Ao Dr. Luis Ortega-Mora, por aceitar me receber em sua equipe do Departamento de Sanidad Animal da Universidad Complutense de Madrid. À Esther e Javier especialmente, pela orientação, pela disposição e pelo tempo a mim dispensado com tantas amostras e tantos resultados, pelo apoio e ajuda mesmo distante.

À Gema, Suzana, Inma, Vanesa e Silvia pela generosa companhia no laboratório e por me acolherem tão bem na Espanha. Não deixando de agradecer a Verónica, Ignacio, Javi, Maria, Belém, Adriana e Virginia.

À Raíssa, Rodrigo, Itziar, Marta e Enrique, por me “adotarem” fora de casa e me proporcionarem bons momentos de humor e amizade.

Aos meus amigos por suportarem minha ausência e por tentarem compreender o que é “*Neospora*”. Obrigada Paula, Tatianny, Priscila e Patrícia por ainda estarem ao meu lado.

À minha mãe por sua forte presença no meu dia-a-dia, pelas lições de vida e ânimo que tanto me renovam. Ao meu pai, por ter a certeza do quanto estaria orgulhoso da minha trajetória, apesar de saber que nunca me deixou. Espero saber valorizar toda a dedicação e amor que sempre me deram. Aos meus irmãos, cunhadas, tios e ao Henrique, por sempre se interessarem pela minha carreira. Ao Fred, Ciça, Banda e Pequena, meus fiéis companheiros.

Ao Rapha, por compartilhar comigo seu enorme amor, seu carinho, seu tempo, sua fortaleza, sua paciência. Obrigada por agüentar meus momentos ausentes, obrigada por compartilhar sucessos e fracassos sempre juntos.

À Deus acima de tudo, por permitir-me ter tantos agradecimentos assim e por vencer mais esta jornada.

*“Às vezes tudo sai errado e acontecem coisas maravilhosas
que eu teria perdido se tudo tivesse dado certo...”.*

(Provérbio árabe)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: Considerações gerais	1
Referências.....	10
CAPÍTULO 2: Detection of anti-<i>Neospora caninum</i> antibodies in fetal fluids from slaughtered zebu cattle in Goiás, Brazil.....	28
Resumo	29
Abstract	30
Introduction	30
Materials and Methods	31
Results and Discussion.....	31
Conclusions	33
References.....	33
CAPÍTULO 3: Aspectos histopatológicos e detecção de DNA de <i>Neospora caninum</i> em tecidos de fetos de vacas zebuínas abatidas em Goiás, Brasil.....	39
Resumo	40
Abstract	41
Introdução	41
Material e Métodos.....	44
Resultados.....	47
Discussão	54
Conclusão.....	59
Referências.....	59
CAPÍTULO 4: Genetic characterization of <i>Neospora caninum</i> isolates from clinical samples of zebuine fetuses obtained in abattoirs in Goiás, Brazil	70
Abstract	71
Introduction	71
Materials and Methods	74
Results	78
Discussion.....	83
Conclusion	87
References.....	88
CAPÍTULO 5: Considerações finais.....	93

RESUMO GERAL

Uma das principais causas mundiais de falhas reprodutivas em bovinos é a infecção pelo protozoário *Neospora caninum* (Filo Apicomplexa, Família Sarcocystidae). A neosporose bovina é caracterizada por infecção assintomática na fêmea não prenhe, no entanto, durante a gestação, a transmissão vertical do parasito é a responsável pela manutenção da infecção por gerações sucessivas. A maior frequência da infecção ocorre no sistema de produção leiteiro e no manejo intensivo de criação dos animais, sendo a maioria dos dados disponíveis para *N. caninum* referentes a *Bos taurus*, mesmo para gado de corte. Assim, a presença de *N. caninum* tem sido pouco estudada em *Bos indicus*. Em Goiás, a prevalência de *N. caninum* é de 29,61% em gado de corte e 30,4% em leite. Como a prevalência da infecção em adultos deve ter correlação positiva com a incidência da infecção fetal, objetivou-se avaliar a ocorrência da transmissão vertical de *N. caninum* em fetos zebuínos de variadas idades, obtidos de fêmeas abatidas em um frigorífico no município de Senador Canedo, Goiás. Para tanto, realizaram-se análise sorológica em líquidos toráco-abdominais e análises molecular e histopatológica em amostras teciduais (cérebro, coração e fígado). A idade fetal foi determinada a partir da distância entre a região occipital e a base da cauda. Um total de 195 líquidos fetais foi colhido aleatoriamente e testado por RIFI com um ponto de corte de 1:16. Foram submetidas 585 amostras de tecidos à análise pela *nested*-PCR da região ITS-1 rRNA e à histopatologia. Os resultados encontrados foram relacionados com a idade fetal (primeiro, segundo e terceiro estágios gestacionais). Anticorpos anti-*N. caninum* foram detectados em 12 (6,15%) líquidos fetais, com titulação observada a 1:64 (n=1), 1:128 (n=2), 1:512 (n=3), 1:1024 (n=5) e 1:2048 (n=1). Foi detectada a presença do parasito por PCR em 40 (20,5%) fetos. No exame histopatológico, 82 (42,05%) fetos apresentaram lesões características e consistentes com infecção por protozoário, caracterizadas por encefalite, miocardite e hepatite com infiltrado mononuclear, com ou sem necrose. Na comparação entre as diferentes idades gestacionais, observaram-se maior número de reações positivas por RIFI, PCR e lesões compatíveis por histopatológico, no sexto e sétimo mês de gestação. Do total das 585 amostras de tecidos examinadas, 56 foram positivas, sendo 12 na sorologia e 44 (35 cérebros, sete corações e dois fígados) na PCR, provenientes de 45 fetos. No histopatológico, 10 amostras (três cérebros, seis corações e um fígado) apresentaram lesões características de infecção por protozoários como o *N. caninum*. O DNA de seis fetos PCR positivos foi submetido à análise por marcadores microssatélites para a caracterização genética dos isolados de *N. caninum* presentes, demonstrando a existência de perfis genéticos diferentes de outros isolados do mundo e do Brasil infectando zebuínos. Os resultados obtidos comprovam a ocorrência da transmissão vertical de *N. caninum*, o diagnóstico da infecção em fetos zebuínos, a necessidade de associação de técnicas para a determinação da neosporose fetal e a caracterização de diferentes isolados regionais circulantes no rebanho zebuino de Goiás.

PALAVRAS CHAVE: *Bos indicus*, Imunofluorescência indireta, Histopatologia, Microssatélites, Neosporose, PCR

ABSTRACT

One of the main causes of reproductive failure in cattle is infection by the protozoan *Neospora caninum* (Phylum Apicomplexa, Family Sarcocystidae). The bovine neosporosis is characterized by an asymptomatic infection in the non pregnant cow; however, during pregnancy, the vertical transmission of the parasite is responsible for the maintenance of the infection for successive generations. The highest frequency of infection occurs in the dairy production system and in the intensive management of animal breeding, with most of the available data for *N. caninum* related to *Bos taurus*, even for beef cattle. Thus, the presence of *N. caninum* has been little studied in *Bos indicus*. In Goiás, the prevalence of *N. caninum* is 29.61% in beef cattle and 30.4% in dairy cattle. As the prevalence of infection in adults should have a positive correlation to the incidence of fetal infection, this study aimed to evaluate the occurrence of vertical transmission of *N. caninum* in zebuine fetuses of various ages, obtained from females slaughtered in a slaughterhouse in the municipality of Senador Canedo, Goiás. For that, the serological analysis of abdominal fluid and molecular and histopathological analysis in tissue samples (brain, heart and liver) were performed. The fetal age was estimated by the measurement of crown-rump length. A total of 195 fetal fluids was randomly collected and tested by IFAT with a cut-off point of 1:16. 585 tissue samples were submitted to nested-PCR analysis of ITS-1 rRNA region and to histopathology. The results were related to the fetal age (first, second and third stages of pregnancy). Anti-*N. caninum* antibodies were detected in 12 (6.15%) fetal fluids, with IFAT titers observed at 1:64 (n=1), 1:128 (n=2), 1:512 (n=3), 1:1024 (n=5) and 1:2048 (n=1). The presence of the parasite was detected by PCR in 40 (20.5%) fetuses. On histopathological examination, 82 (42.05%) fetuses had characteristic and consistent lesions, compatible with protozoan infection, characterized by encephalitis, myocarditis and hepatitis with mononuclear cell infiltrates, with or without necrosis. Comparing the different gestational ages, there was a greater number of positive reactions by IFAT, PCR and compatible histopathological lesions in the sixth and seventh month of pregnancy. From the total of 585 tissue samples examined, 56 were positive, being 12 at serology and 44 (35 brains, seven hearts and two livers) at PCR from 45 fetuses. In histopathology, 10 samples (three brains, six hearts and one liver) showed characteristic lesions of protozoan infection such as *N. caninum*. The DNA from six PCR positive fetuses was analyzed by microsatellite markers for genetic characterization of isolates of *N. caninum*, demonstrating the existence of genetic profiles different from other isolates of the world and of Brazil infecting zebuine animals. The results confirm the occurrence of vertical transmission of *N. caninum*, the diagnosis of infection in zebuine fetuses, the need of association of techniques for determining fetal neosporosis and characterization of different regional isolates circulating in zebu herd from Goiás.

KEYWORDS: *Bos indicus*, Indirect immunofluorescence, Histopathology, Microsatellites, Neosporosis, PCR

CAPÍTULO 1: Considerações gerais

O protozoário do gênero *Neospora* foi inicialmente descrito por BJERKAS et al. (1984) como causador de encefalomielite e miosite em cães. Em seguida foi isolado em cultivo celular por DUBEY et al. (1988) e nomeado *Neospora caninum*, pertencente ao filo Apicomplexa, família Sarcocystidae. A neosporose bovina causada por esse parasito vem sendo considerada uma enfermidade de distribuição cosmopolita e uma das causas mais freqüentes de falhas reprodutivas no mundo (DUBEY et al., 2007). Seu papel epidemiológico na reprodução foi identificado por THILSTED & DUBEY (1989).

A infecção causada por esse parasito é geralmente latente e assintomática em vacas não prenhes. No entanto, durante a gestação, a parasitemia materna com infecção do útero gravídico pode causar forte impacto econômico, com ocorrência mundial de abortamentos e nascimento de bezerros neurologicamente comprometidos (ataxia e paralisia) ou clinicamente sadios, porém persistentemente infectados (BUXTON et al., 2002; BARTELS et al., 2006; DUBEY et al., 2006). A evidência sorológica pré-colostral e o quadro histopatológico muitas vezes apresentado associam-se a essa persistência da infecção por *N. caninum* em bezerros neonatos (BARR et al., 1993).

A neosporose bovina está amplamente disseminada em rebanhos de leite na Europa, África do Sul, Ásia, Oceania e nas Américas (DUBEY et al., 2007). É também reconhecida em gado de corte na Bélgica (DE MEERSCHMAN et al., 2002), Espanha (GONZÁLEZ et al., 1999; QUINTANILLA-GOZALO et al., 1999), Itália (OTRANTO, 2003), Coréia (KIM et al., 2002), Japão (KOIWA, 2005), Irã (MALMASI, 2007), Austrália (BOULTON et al., 1995), Canadá (WALDNER et al., 1998, 1999, 2001), Estados Unidos (EUA) (MCALLISTER et al., 2000), Argentina (MOORE et al., 2003), México (GARCÍA-VAZQUEZ et al., 2009) e Paraguai (OSAWA, 2002).

Em bovinos de corte, principalmente *Bos indicus*, a presença de *N. caninum* tem sido pouco estudada (MELO et al., 2006). Portanto, os dados sobre a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos de corte referem-se, na sua maioria, a animais *Bos taurus*.

No Brasil, o parasito foi identificado pela primeira vez em feto bovino abortado em uma exploração leiteira na Bahia por GONDIM et al. (1999), com uma prevalência regional de 14,09%. Relatos da ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos leiteiros foram descritos para o Mato Grosso do Sul (OSHIRO et al., 2007), Minas Gerais (DE MELO et al., 2004; MINEO et al., 2006; GUEDES et al., 2008), Pará (MINERVINO et al., 2008); Paraná (LOCATELLI-DITTRICH, et al. 2001; GUIMARÃES et al., 2004), Rio de Janeiro (MUNHOZ et al., 2006), Rio Grande do Sul (CORBELLINI et al., 2002, 2006) e Rondônia (AGUIAR et al., 2006). Já em gado de corte do Estado de São Paulo, frequências sorológicas em fêmeas zebuínas foram obtidas por VIANNA et al. (2008).

Para o Estado de Goiás, os dados soropidemiológicos desse protozoário são considerados escassos. MELO et al. (2006) comprovaram que no Estado, a soropositividade está amplamente distribuída no rebanho bovino das microrregiões de Goiânia e Anápolis, com uma prevalência de 29,61% nas propriedades de corte, 30,41% nas propriedades de leite e 43,3% na propriedade de exploração mista. Ainda analisando rebanhos goianos, SCHULZE (2008) relatou uma prevalência para bovinos leiteiros de 56,6% e de corte de 26,2%.

De modo geral, surtos da enfermidade em gado de corte não são reportados como nos de leite (WALDNER et al., 1998, 1999, 2001; MCALLISTER et al., 2000), apesar de não ter sido comprovada a existência de maior sensibilidade à infecção das raças bovinas de aptidão leiteira ou de maior resistência das de corte (PARÉ et al., 1998). A epidemiologia da neosporose bovina, então, parece diferir entre as diferentes aptidões zootécnicas, com um menor risco de infecção e abortamento no rebanho de corte (DE MEERSCHMAN et al., 2002; LÓPEZ-GATIUS et al., 2005), que normalmente criado de maneira extensiva faz com que a prevalência da doença seja menor (SANDERSON et al., 2000; OTRANTO et al., 2003). Fato explicado por MCALLISTER et al. (1996, 2000), e no Brasil por GUEDES et al. (2008), que sugeriram que a exposição bovina a oocistos de *N. caninum* pode acontecer mais frequentemente em bovinos de exploração intensiva pelo tipo de manejo com densidades populacionais mais altas.

ÁLVAREZ-GARCIA (2003) afirmou ainda que a maior frequência de neosporose em rebanhos de leite se deve às condições mais adequadas destas

explorações para a transmissão da infecção, uma vez que, em muitos casos, a reposição se realiza com animais da propriedade, já que a infecção se transmite, principalmente, por via transplacentária. Assim, o sistema de produção e manejo dos animais, além da reposição de fêmeas, provavelmente influencia na apresentação da enfermidade (QUINTANILLA-GOZALO et al., 1999; MOORE et al., 2009).

Nessa análise, deve-se levar em conta ainda a importância da participação de espécies silvestres influenciando a presença da infecção nos rebanhos, em que BARLING et al. (2000) assinalaram que o risco de exposição a *N. caninum* em áreas de alta densidade populacional de vacas de corte nos EUA aumentou com a maior concentração de coiotes e raposas.

Nesse sentido, para a análise do risco existente para animais de corte no Brasil, coiotes e veados da cauda branca já foram identificados como hospedeiros intermediários naturais deste parasito (GONDIM et al., 2006). Inclusive, canídeos como o graxaim (*Pseudalopex gymnocercus*), o cachorro-domato (*Cerdocyon thous*), o lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*) e a raposinha (*Didelphis marsupialis*) evidenciaram sorologia positiva anti-*N. caninum* nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, levando à conclusão de que provavelmente também podem fechar o ciclo do protozoário, aumentando a importância do ciclo silvestre na epidemiologia da enfermidade no País (CORBELLINI et al., 2002; GENNARI, 2004; VITALIANO et al., 2004).

Abordagens epidemiológicas experimentais em aves como galinhas e pombos também já foram descritas no Brasil, respectivamente por FURUTA et al. (2007) e MINEO et al. (2009), considerando o risco de também serem possíveis hospedeiros intermediários naturais do parasito.

No entanto, diante dos fatores expostos, deve-se considerar a região geográfica sob estudo e suas particularidades, sejam elas ambientais ou de criação, a fim de se estabelecer maior ou menor possibilidade à infecção, independente se rebanho de leite ou de corte. OGAWA et al. (2005) e BAÑALES et al. (2006), por exemplo, ao analisarem os fatores de risco para *N. caninum* em rebanhos leiteiros no Brasil e Uruguai, respectivamente, não encontraram nenhuma associação significativa entre a soropositividade para *N. caninum* e as variáveis relacionadas ao manejo, ao tamanho do rebanho, a produção de leite,

aos problemas reprodutivos, a alimentação, e a presença de cães ou de outros animais na propriedade.

O ciclo de vida de *N. caninum* envolve três estágios infectantes representados pelas formas parasitárias denominadas esporozoítos, taquizoítos e bradizoítos. Os cães (*Canis familiaris*) e os coiotes (*Canis latrans*) assumem um importante papel na cadeia epidemiológica da infecção como hospedeiros definitivos comprovados (MCALLISTER et al., 1998; GONDIM et al., 2004).

Após infectarem-se por ingestão de tecidos contendo taquizoítos (dimensões de 6,0 por 2,0 μm) ou cistos (cerca de 50 μm de diâmetro) com bradizoítos (dimensões de 6,5 por 1,5 μm), esses animais desenvolvem a fase sexuada de esquizogonia e gametogênese no intestino, liberando nas fezes os esporozoítos dentro de oocistos esféricos (10 a 11 μm de diâmetro) e não esporulados (BUXTON et al., 2002). Os cães e os coiotes são considerados assim, disseminadores do agente no meio ambiente, podendo contaminar alimentos e água (MCALLISTER et al., 1998; DUBEY, 1999b; DIJKSTRA et al., 2002).

Nas vacas, após a ingestão desses oocistos esporulados, se desenvolvem os estágios de multiplicação rápida – os taquizoítos, e lenta – os bradizoítos, infectando células de diferentes tecidos e órgãos, como cérebro, medula espinhal, nervos, fígado, músculos cardíacos, esqueléticos, oculares e por fim, invadindo o feto por via transplacentária (MCALLISTER et al., 1998; DUBEY, 1999b).

Segundo revisões feitas por DUBEY (2003), no Brasil existem relatos da presença de anticorpos anti-*N. caninum* não só em canídeos como citado anteriormente, mas também em bovídeos, eqüídeos, felídeos, cervídeos, didelfídeos (gambás) e roedores (capivaras), sendo, portanto, todos possíveis hospedeiros intermediários.

Dentre as diversas formas de transmissão do protozoário *N. caninum*, UGGLA et al. (1998) relataram a ingestão de taquizoítos com o colostro (transmissão lactogênica), provocando resposta sorológica em bezerros desafiados experimentalmente. O risco de transmissão venérea, por inoculação intrauterina de sêmen contaminado com taquizoítos, foi testado por SERRANO et

al. (2006), resultando em sorologia positiva das mães e PCR positivo de cérebro, pulmão e fígado dos fetos.

Apesar da baixa prevalência e limitado número de coccídios nos cães, MCALLISTER et al. (2000) e GONDIM et al. (2004) revisaram a rota de transmissão da doença e definiram que embora não tão relevantes, os cães podem ter participação na epidemiologia de surtos de abortamento por neosporose bovina.

Contudo, a transmissão vertical é o meio mais eficiente de propagação do parasito e manutenção da enfermidade. As vacas podem permanecer infectadas por *N. caninum* por toda a vida (TREES et al., 1999), transmitindo verticalmente a infecção para sua progênie por gerações sucessivas, de maneira subsequente ou intermitentemente (BJORKMAN et al., 1996; WOUDA et al., 1998; GUY et al., 2001; FIORETTI et al., 2003). Fêmeas soropositivas são mais propensas ao abortamento que as soronegativas, mas de um modo geral esse meio de transmissão contribui para a persistência da infecção no rebanho com baixa mortalidade fetal (BJORKMAN et al., 1996; ANDERSON et al., 1997; SCHARES et al., 1998; WOUDA et al., 1998).

Na ocorrência de abortamentos, estudos levantaram taxas de infecção congênita de 40,7% em Ontário no Canadá (PAN et al., 2004), 44% no Quebec no Canadá (BERGERON et al., 2000), 63,7% na Costa Rica (ROMERO & FRANKENA, 2003), 73% nos Países Baixos (DIJKSTRA et al., 2003), 81% na Califórnia nos EUA (PARÉ et al., 1996), 85% em Nebraska nos EUA (BJORKMAN et al., 2003), 93% na Alemanha (SCHARES et al., 1998) e 95% no Reino Unido (DAVISON et al., 1999). Em se tratando de comparações desses percentuais, pode-se observar que as diferenças ocorrem em função do país ou da região estudada, da idade das fêmeas avaliadas, da técnica de diagnóstico empregada, do tipo de exploração e da presença de antecedentes de aborto.

Acredita-se que a frequência de ocorrência de transmissão transplacentária endógena diminua com o aumento do número de partições da fêmea, sugerindo que as vacas eventualmente desenvolvam um grau de imunidade que tende a prevenir esse modo de transmissão e as perdas por abortamento (ROMERO et al., 2002; DIJKSTRA et al., 2003).

Taxa de transmissão vertical de 36,8% em novilhas nelore já foi relatada por VIANNA et al. (2008) com resultados PCR negativos, mas sorologia fetal positiva. A morte do feto normalmente ocorre entre o quinto e o sétimo mês de gestação e advém das lesões placentárias ou fetais, principalmente no cérebro, coração e fígado, tendo baixa frequência nos pulmões e rins (DUBEY & LINDSAY, 1996). A patogênese da infecção por *N. caninum* é considerada complexa, e após vários estudos experimentais associando as lesões inflamatórias à presença de taquizoítos de *N. caninum*, ainda não está completamente elucidada (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006a).

Estudos experimentais, visando esclarecer a patogênese da infecção, têm demonstrado a importância do momento em que a fêmea bovina gestante sofre a infecção primária, a recrudescência parasitária ou a reinfecção. Quando o processo infeccioso se desenvolve antes da gestação, há o nascimento de bezerros soronegativos. No início da gestação, antes do desenvolvimento do sistema imune fetal, comumente há morte intra-uterina, resultando em produto abortado pela multiplicação parasitária não controlada (WILLIAMS et al., 2000; MACALDOWIE et al., 2004). Se a infecção ocorre no segundo terço gestacional, pode haver morte fetal ou o nascimento de crias persistentemente infectadas, uma vez que o amadurecimento da imunidade fetal evolui progressivamente (WILLIAMS et al., 2000; GUY et al., 2001; INNES et al., 2001; MALEY et al., 2003). Finalmente, ocorrendo infecção no último terço de gestação, normalmente obtém-se bezerros cronicamente infectados, pois o feto já é imunocompetente, inclusive com manifestação de resposta humoral (WILLIAMS et al., 2000; GUY et al., 2001; INNES et al., 2001; MALEY et al., 2003).

Sobre a transmissão transplacentária, não há informações exatas até o momento sobre os mecanismos utilizados pelo *N. caninum* para infectar o feto bovino. Em modelos experimentais, protozoários como o *Trypanosoma cruzi* (SARTORI et al., 2003), *Toxoplasma gondii* (ABBASI et al., 2003) e *N. caninum* (MACHADO et al., 2007), foram capazes de invadir células gigantes trofoblásticas. Tais células se originam de células trofoblásticas mononucleadas, que migram para o epitélio uterino, onde se fundem com as células do endométrio, possuindo aí possível papel na infecção transplacentária por estes

parasitas, sendo que o processo *in utero* de transmissão do *N. caninum* para o feto permanece desconhecida.

Pelas características da enfermidade, o diagnóstico da neosporose bovina é dificultado pela inexistência de sinal clínico patognomônico e pelo baixo número de parasitos nos fetos, necessitando de confirmação pela utilização de mais de uma técnica de diagnóstico (JENKINS et al., 2002). Associados às provas sorológicas para detecção indireta de anticorpos, os métodos convencionais para identificação direta do parasito em amostras fetais são o exame histopatológico associado ou não à imunoistoquímica (IHQ), a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e o cultivo *in vitro* (SAGER et al., 2001). Na impossibilidade de envio do feto inteiro, as amostras a serem remetidas seriam cérebro, coração, fígado e placenta, uma vez que são estes os tecidos afetados por freqüência de aparecimento (DE MEERSCHAM et al., 2002).

Em ruminantes, a placenta não permite a transferência de imunoglobulinas maternas para a circulação do feto (INNES et al., 2001), assim a sorologia fetal positiva indica exposição do mesmo ao parasito dentro do útero. Para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* no soro ou nos fluidos fetais têm sido utilizadas técnicas sorológicas, principalmente a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) como prova de referência pela elevada sensibilidade e especificidade, em torno de 98% (OSAWA et al., 1998).

As limitações da sorologia fetal no diagnóstico de *N. caninum* residem, fundamentalmente, nas discrepâncias existentes entre os diferentes laboratórios, nas propriedades da técnica empregada e nas oscilações dos níveis de anticorpos específicos produzidos nos animais infectados. Portanto, de acordo com ATKINSON et al. (2000), não se dispõe de uma prova sorológica padronizada para a maioria dos laboratórios, havendo diferentes pontos de corte e critérios para a interpretação dos resultados. Tal condição foi ressaltada por BARR et al. (1995) e WOUDA et al. (1997), que questionaram a sensibilidade das técnicas sorológicas no diagnóstico da neosporose fetal.

A identificação do parasito mediante técnicas histopatológicas (hematoxilina-eosina) é restrita, devido à similaridade morfológica de *N. caninum* com *Toxoplasma gondii* e *Sarcocystis* spp., e ao número de taquizoítos ou cistos presentes geralmente ser escasso e de difícil detecção. Além disso, a observação

de lesões histopatológicas não é definitiva, pelo quadro lesional ser típico de infecções causadas por protozoários, fornecendo apenas um diagnóstico presuntivo de infecção por *N. caninum* (WOUDA et al., 1997).

Ainda assim, LÉRTORA et al. (2004) consideraram indispensável o estudo histopatológico do feto no diagnóstico de distúrbios da reprodução. Os fetos infectados por *N. caninum* apresentam múltiplas áreas de necrose e infiltrado mononuclear (linfócitos, monócitos e células plasmáticas) no sistema nervoso central, coração, fígado, músculo esquelético e pulmões, consistindo principalmente em encefalite, miocardite e hepatite não-supurativas (WOUDA et al., 1997; GONZÁLEZ et al., 1999; DE MEERSCHAM et al., 2002; PEREIRA-BUENO et al., 2003; COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006a; CABRAL et al., 2009).

A IHQ utilizando anticorpos poli ou monoclonais anti-*N. caninum* como prova confirmatória da histopatologia sugestiva é uma técnica relativamente pouco sensível para detectar o parasito em tecidos do hospedeiro. Esta característica de baixa sensibilidade é normalmente devida ao baixo número de parasitos, e algumas vezes, à baixa qualidade do tecido fetal, que pode estar autolisado, mumificado ou macerado. Nessas situações, há o risco de ocorrência de resultados falso-negativos (BASZLER et al., 1999; DUBEY, 1999a). Se lesões histopatológicas não são observadas, a IHQ não se faz necessária (BOGER & HATTEL, 2003).

A técnica de PCR é uma das mais utilizadas no diagnóstico de abortamento em bovinos, bem como em estudos epidemiológicos e filogenéticos para a detecção do DNA genômico do parasito nos tecidos fetais, devido à sua rapidez, facilidade de execução e alta sensibilidade e especificidade, além da tolerância com relação à qualidade da amostra enviada quando comparada ao histopatológico e à IHQ (BASZLER et al., 1999; SCHOCK et al., 2000; SAGER et al., 2001).

Estão disponíveis protocolos de PCR baseados na amplificação da região ITS-1 do DNA ribossomal (HOLMDAHL & MATTSSON, 1996) e os que amplificam a região Nc5 do DNA genômico (YAMAGE et al., 1996; WANG et al., 2009). O uso de *nested*-PCR pode ser aplicado como forma de aumentar a

sensibilidade do teste (BUXTON et al., 1998; PAULA et al., 2004; COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006a; VIANNA et al., 2008; CABRAL et al.; 2009).

COLLANTES-FERNÁNDEZ et al. (2002, 2006b) inovaram com a técnica de PCR quantitativa em tempo real, obtendo resultados na análise da carga parasitária das amostras de tecidos de animais infectados em substituição à IHQ.

A inoculação em cultivo celular e o bioensaio podem ser utilizados para recuperar o parasito de tecidos fetais suspeitos. O êxito do isolamento dependerá do número de organismos presentes na amostra e do grau de autólise da mesma, não podendo o material ter sido congelado (ALVAREZ-GARCÍA, 2003).

Uma vez constatada a presença da enfermidade numa região, as estratégias de controle devem ser elaboradas com base no conhecimento sobre a real situação epidemiológica da enfermidade e, para tanto, seriam necessárias informações sobre a variabilidade de isolados presentes. Assim como o estágio gestacional, a resposta imune fetal, a carga parasitária e a duração da parasitemia – fatores estes já comentados, a virulência do isolado infectante também influencia a patogênese da neosporose bovina e sua manifestação clínica (WILLIAMS et al., 2000; INNES et al., 2005; COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006a; DUBEY et al., 2006; ROJO-MONTEJO et al., 2009).

COLLANTES-FERNÁNDEZ et al. (2006a) demonstraram associação entre a carga parasitária no cérebro e a presença de sintomatologia nervosa, sugerindo que as diferenças de virulência entre isolados testados poderiam influir na capacidade de replicação do parasito no órgão.

Sobre essa condição, vários autores têm demonstrado a diversidade biológica e genética intra-específica de *N. caninum* infectando bovinos (REGIDOR-CERRILLO et al., 2008; GARCÍA-MELO et al., 2009; ROJO-MONTEJO et al., 2009; PEDRAZA-DÍAZ et al., 2009). Técnicas de biologia molecular, cada vez mais específicas na diferenciação entre isolados de amostras clínicas, têm sido desenvolvidas e aprimoradas, como é o caso da técnica de marcadores microssatélites para o estudo da estrutura genética da população do parasito em diferentes situações epidemiológicas (BASSO et al., 2009).

Portanto, a epidemiologia molecular pode ser aplicada como mais uma ferramenta de estudo da complexidade genética do *N. caninum* e a sua influência

na manifestação clínica da enfermidade no hospedeiro, até então provada somente em animais taurinos (REGIDOR-CERRILLO et al., 2008; GARCÍA-MELO et al., 2009; ROJO-MONTEJO et al., 2009; PEDRAZA-DÍAZ et al., 2009), justificando a importância de se valorizar o estudo em zebuínos. A caracterização genética de diferentes cepas de *N. caninum* é considerada por BECK et al. (2009) como de extrema importância para a prevenção, vigilância e controle da neosporose bovina, principalmente por ser uma enfermidade sem terapêutica aplicável.

Em Goiás, onde os problemas reprodutivos são freqüentes, há a evidência da necessidade de estudos regionais sobre o tema, uma vez que a enfermidade está presente em rebanhos de leite e corte e que há poucos estudos existentes para zebuínos. Qualquer causa que altere a planificação da reprodução e os índices reprodutivos normais deve ser detectada e corrigida, para que a sua repercussão nos resultados econômicos seja mínima.

Diante do exposto, uma vez que a incidência da infecção fetal por *N. caninum* em uma população deve ter correlação positiva com a prevalência da infecção em adultos, o estudo foi conduzido visando avaliar a ocorrência da transmissão vertical de *N. caninum* em zebuínos do Estado de Goiás, pelo diagnóstico da neosporose fetal baseada na associação de técnicas sorológicas, moleculares e histopatológicas. Além de caracterizar geneticamente os possíveis diferentes isolados regionais de *N. caninum* que estejam circulando no gado zebuíno comercial.

Referências

1. ABBASI, M., KOWALEWSKA-GROSHOWSKA, K., BAHAR, M. A., KILANI, R. T., WINKLER-LOWEN, B., GUILBERT, L.J. Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 188, n. 4, p. 608-16, 2003.
2. AGUIAR, D. M., CAVALCANTE, G. T., RODRIGUES, A., A., LABRUNA, M. B., CAMARGO, L. M., CAMARGO, E. P., GENNARI, S. M. Prevalence of anti-

Neospora caninum antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 142, n. 1-2, p. 71-77, nov. 2006.

3. ÁLVAREZ-GARCÍA, G. **Identificación y caracterización de antígenos de *Neospora caninum* con interés inmunodiagnóstico en bovinos**. 2003. 301f. Tese (Doutorado em Veterinária) – Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Espanha.

4. ANDERSON, M. L., REYNOLDS, J. P., ROWE, J. D., SVERLOW, K. W., PACKHAM, A. E., BARR, B. C., CONRAD, P. A. Evidence of vertical transmission of *Neospora caninum* infection in dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 210, n. 8, p. 1169-1172, abr. 1997.

5. ATKINSON, R. A., COOK, R. W., REDDAKLIFF, L. A., ROTHWELL, J., BROADY, K. W., HARPER, P., ELLIS, J. T. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in a dairy cattle herd. **Australian Veterinary Journal**, Sydney, v. 78, n. 4, p. 262-266, abr. 2000.

6. BAÑALES, P., FERNANDEZ, L., REPISO, M. V., GIL, A., DARGATZ, D. A., OSAWA, T. A nationwide survey on seroprevalence of *Neospora caninum* infection in beef cattle in Uruguay. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 139, n. 1-3, p. 15-20, jun. 2006.

7. BARLING, K. S., SHERMAN, M., PETERSON, M. J., THOMPSON, J. A., MCNEILL, J. W., CRAIG, T. M., ADAMS, L. G. Spatial associations among density of cattle, abundance of wild canids, and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 217, n. 9, p. 1361-1365, nov. 2000.

8. BARR, B. C., CONRAD, P. A., BREITMEYER, R., SVERLOW, K., ANDERSON, M. L., REYNOLDS, J., CHAUVET, A. E., DUBEY, J. P., ARDANS,

A. A. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 202, n. 1, p. 113-117, jan. 1993.

9. BARR, B. C., ANDERSON, M. L., SVERLOW, K., CONRAD, P. C. Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. **Veterinary Record**, London, v. 137, n. 24, p. 611-613, dez. 1995.

10. BARTELS, C. J. M., VAN SCHAIK, G., VELDHUISEN, J. P., VAN DEN BORNE, B. H. P., WOUDE, W., DIJKSTRA, T. Effect of *Neospora caninum* serostatus on culling, reproductive performance and milk production in Dutch dairy herds with and without a history of *Neospora caninum*-associated epidemics. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 77, n. 3-4, p. 186-198, dez. 2006.

11. BASSO, W., HERRMANN, D. C., CONRATHS, F. J., PANTCHEV, N., VRHOVEC, M. G., SCHARES, G. First isolation of *Neospora caninum* from the faeces of a dog from Portugal. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 159, n. 2, p. 162-166, fev. 2009.

12. BASZLER, T. V., GAY, L. J. C., LONG, M. T., MATHISON, B. A. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 12, p. 4059-4064, dez. 1999.

13. BECK, H. P., BLAKE, D., DARDÉ, M. L., FELGER, I., PEDRAZA-DÍAZ, S., REGIDOR-CERRILLO, J., GÓMEZ-BAUTISTA, M., ORTEGA-MORA, L. M., PUTIGNANI, L., SHIELS, B., TAIT, A., WEIR, W. Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 175-189, jan. 2009.

14. BERGERON, N., FECTEAU, G., PARÉ, J., MARTINEAU, R., VILLENEUVE, A. Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Quebec. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 41, n. 6, p. 464-467, jun. 2000.
15. BJERKAS, I., MOHN, S. F., PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, Berlin, v. 70, p. 271-274, 1984.
16. BJORKMAN, C., JOHANSSON, O., STENLUND, S., HOLMDAHL, J.M., UGGLA, A. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 208, n. 9, p. 1441-1444, mai. 1996.
17. BJORKMAN, C., MCALLISTER, M. M., FROSSLING, J. N., 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**, Columbia, v. 15, n. 1, p. 3-7, jan. 2003.
18. BOGER, L. A., HATTEL, A. L. Additional evaluation of undiagnosed bovine abortion cases may reveal fetal neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 113, n. 1, p. 1-6, abr. 2003.
19. BOULTON, J. F., 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**, Sydney, v. 72, n. 3, p. 119-120, mar. 1995.
20. 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**, London, v. 118, n. 4, p. 267-279, mai. 1998.

- 21.BUXTON, D., MCALLISTER, M. M., DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 12, p. 546-552, dez. 2002.
- 22.COLLANTES-FERNANDEZ, 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**, Washington, v. 40, n. 4, p. 1194-1198, abr. 2002.
- 23.COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., RODRÍGUEZ-BERTOS, A., ARNÁIZ-SECO, I., MORENO-BURGOS, B., ADURIZ, G., ORTEGA-MORA, L. Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine foetuses. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, n. 3, p. 629-641, fev. 2006a.
- 24.COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., ARNÁIZ-SECO, I., MORENO-BURGOS, B., RODRIGUEZ-BERTOS, A., ADURIZ, G., FERNÁNDEZ-GARCÍA, A., ORTEGA-MORA, L. M. Comparison of *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions between epidemic and endemic bovine abortion cases. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 142, n. 1-2, p. 187-191, nov. 2006b.
- 25.CORBELLINI, L. G., DRIEMEIER, D., CRUZ, C. F. E., GONDIM, L. F. P., WALD, W. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 103, n.3, p. 195-202, jan. 2002.
- 26.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**, London, v. 172, n. 1, p. 114-120, jul. 2006.

27.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**, Oxford, v. 29, n. 10, p. 1683-1689, out. 1999.

28.DE MEERSCHMAN, F., SPEYBROECK, N., BERKVEN, D., RETTIGNER, C., FOCANT, C., LECLIPTEUX, T., CASSART, D., LOSSON, B. Fetal infection with *Neospora caninum* in dairy and beef cattle in Belgium. **Theriogenology**, Stoneham, v. 58, n. 5, p. 933-945, set. 2002.

29.DE MELO, C. B., LEITE, R. C., LOBATO, Z. I., LEITE, R. C.. Infection by *Neospora caninum* associated with bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in cattle from Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 119, n. 2-3, p. 97-105, jan. 2004.

30.DIJKSTRA, T. H., BARKEMA, W., EYSKER, M., HESSELINK, J. W., WOUDE, W. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 105, n. 2, p. 99-104, abr. 2002.

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

32.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**, Schaumburg, v. 193, n. 10, p. 1259-1263, nov. 1988.

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

- 34.DUBEY, J. P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 84, n. 3-4, p. 349-367, ago. 1999a.
- 35.DUBEY, J. P. Neosporosis – the first decade of research. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 10, p. 1485-1488, out. 1999b.
- 36.DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, Korea (South), v. 41, n. 1, p.1-16, mar. 2003.
- 37.DUBEY, J. P., BUXTON, D., WOUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 134, n. 4, p. 267-289, mai. 2006.
- 38.DUBEY, J. P., SCHARES, G., ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 20, n. 2, p. 323-367, abr. 2007.
- 39.FIORETTI, D. P., PASQUAI, P., DIAFERIA, M., ROSIGNOLI, L. *Neospora caninum* infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. **Journal of Veterinary Medicine B**, Berlin, v. 50, p. 399-404, 2003.
- 40.FURUTA, P. I., MINEO, T. W., CARRASCO, A. O., GODOY, G. S., PINTO, A. A., MACHADO, R. Z. *Neospora caninum* infection in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. **Parasitology**, Amsterdam, v. 134, n. 14, p. 1931-1939, dez. 2007.
- 41.GARCÍA-MELO, D. P., REGIDOR-CERRILLO, J., ORTEGA-MORA, L. M., COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., OLIVEIRA, V. S. F., OLIVEIRA, M. A. P., SILVA, A. C. Isolation and biological characterization of a new isolate of *Neospora caninum* from an asymptomatic calf in Brazil. **Acta Parasitologica**, Warszawa, v. 54, n. 2, p. 180-185, 2009.

- 42.GARCIA-VAZQUEZ, Z., ROSARIO-CRUZ, R., MEJIA-ESTRADA, F., RODRIGUEZ-VIVAS, I., ROMERO-SALAS, D., FERNANDEZ-RUVALCABA, M., CRUZ-VAZQUEZ, C. Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies in beef cattle in three southern states of Mexico. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 41, n. 5, p. 749-753, jun. 2009.
- 43.GENNARI, S. M. *Neospora caninum* no Brasil: situação atual da pesquisa. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Belo Horizonte, v. 13, n. 1, p. 23-28, jan-mar. 2004.
- 44.GONDIM, L. F., SARTOR, I. F., HASEGAWA, M., YAMANE, I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 71-75, set. 1999.
- 45.GONDIM, L. F., MCALLISTER, M. M., PITT, W. C., ZEMLICKA D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 159-161, fev. 2004.
- 46.GONDIM, L. F. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 247-252, jun. 2006.
- 47.GONZÁLEZ, L., BUXTON, D., ATXAERANDIO, R., ADURIZ, G., MALEY, S., MARCO, J. C., CUERVO, L. A. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. **Veterinary Record**, London, v. 144, n. 6, p. 145-150, fev. 1999.
- 48.GUEDES, M. H., GUIMARÃES, A. M., ROCHA, C. M., HIRSCH, C. Frequency of anti-*Neospora caninum* antibodies in cows and fetuses from Municipalities of southern Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Belo Horizonte, v. 17, n. 4, p. 189-194, out-dez. 2008.
- 49.GUIMARÃES, J. S. J., SOUZA, S. L., BERGAMASCHI, D. P., GENNARI, S. M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their

presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 124, n. 1-2, p. 1-8, set. 2004.

50.GUY, C. S., WILLIAMS, D. J. L., KELLY, D. F., MCGARRY, J. W., GUY, F., BJORKMAN, C., SMITH, R. F., TREES, A. J. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. **Veterinary Record**, London, v. 149, n. 15, p. 443-449, out. 2001.

51.HOLMDAHL, O. J., MATTSSON, J. G. Rapid and sensitive identification of *Neospora caninum* by in vitro amplification of the internal transcribed spacer 1. **Parasitology** London, v. 112, n. 2, p. 177-182, fev. 1996.

52.INNES, E. A., WRIGHT, S. E., MALEYA, S., RAEA, A., SCHOCKA, A., KIRVARA, E., BARTLEYA, P., HAMILTONA, C., CAREYB, I. M., BUXTON, D. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 31, n. 13, p. 1523-1534, nov. 2001.

53.INNES, E. A., WRIGHT, S., BARTLEY, P., MALEY, S., MACALDOWIE, C., ESTEBAN-REDONDO, I., BUXTON, D. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 108, n. 1-2, p. 29-36, out. 2005.

54.JENKINS, M., BASZLER, T., BJÖRKMAN, C., SCHARES, G., WILLIAMS, D. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 631-636, mai. 2002.

55.KIM, J. H., LEE, J. K., HWANG, E. K., KIM, D. Y. *Prevalence of antibodies to Neospora caninum* in Korean native beef cattle. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 64, n. 10, p. 941-943, out. 2002.

56.KOIWAI, M., HAMAOKA, T., HARITANI, M., SHIMIZU, S., TSUTSUI, T., ETO, M., YAMANE, I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle with reproductive disorders in Japan. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 130, n. 1-2, p.15-18, jun. 2005.

57.LÉRTORA, W. J., BURNA, A., CATUOGNO, M. S. Diagnóstico histopatológico de aborto bovino por *Neospora caninum*. **Revista Veterinaria**, Corrientes, v. 15, n. 2, p. 85-88, 2004.

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

59.LÓPEZ-GATIUS, F., SANTOLARIA, P., YÁNIZ, J. L., GARBAYO, J. M., ALMERÍA S. The use of beef bull semen reduced the risk of abortion in *Neospora*-seropositive dairy cows. **Journal of Veterinary Medicine B**, Berlin, v. 52, n. 2, p. 88-92, mar. 2005.

60.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**, Edinburgh, v. 131, n. 2-3, p. 142-156, ago. 2004.

61.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**, Edinburgh, v. 129, n. 2-3, p. 186-195, ago-out. 2003.

62.MALMASI, A., HOSSEININEJAD, M., HADDADZADEH, H., BADII, A., BAHONAR, A. Serologic study of anti-*Neospora caninum* antibodies in household

dogs and dogs living in dairy and beef cattle farms in Tehran, Iran. **Parasitology Research**, Berlín, v. 100, n. 5, p. 1143-1145, abr. 2007.

63.MCALLISTER, M. M., HUFFMAN, E. M., HIETALA, S. K., CONRAD, P. A., ANDERSON, M. L., SALMAN, M. D. Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 8, n. 3, p. 355-357, jul. 1996.

64.MCALLISTER, M. M., DUBEY, J. P., LINDSAY, D. S., JOLLEY, W. R., WILLS, R. A., MCGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, set. 1998.

65.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**, Schaumburg, v. 217, n. 6, p. 881-887, set. 2000.

66.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**, Belo Horizonte, v. 15, n. 3, p. 105-109, jul-set. 2006.

67.MINEO, T. W., ALENIUS, S., NÄSLUND, K., MONTASSIER, H. J., BJÖRKMAN, C. Distribution of antibodies against *Neospora caninum*, BVDV and BHV-1 among cows in Brazilian dairy herds with reproductive disorders. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Belo Horizonte, v. 15, n. 4, p. 188-192, out-dez. 2006.

68.MINEO, T. W., CARRASCO, A. O., MARCIANO, J. A., WERTHER, K., PINTO, A. A., MACHADO, R. Z. Pigeons (*Columba livia*) are a suitable experimental

model for *Neospora caninum* infection in birds. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 159, n. 2, p. 149-153, fev. 2009.

69.MINERVINO, A. H., RAGOZO, A. M., MONTEIRO, R. M., ORTOLANI, E. L., GENNARI, S. M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle from Santarém, Pará, Brazil. **Research in Veterinary Science**, London, v. 84, n. 2, p. 254-256, abr. 2008.

70.MOORE, D. P., CAMPERO, C. M., ODEÓN, A. C., CHAYER, R., BIANCO, M. A. Reproductive losses due to *Neospora caninum* in a beef herd in Argentina. **Journal of Veterinary Medicine B**, Berlin, v. 50, n. 6, p. 304-308, ago. 2003.

71.MOORE, D. P., PÉREZ, A., AGLIANO, S., BRACE, M., CANTÓN, G., CANO, D., LEUNDA, M. R., ODEÓN, A. C., ODRIÓZOLA E., CAMPERO, C. M. Risk factors associated with *Neospora caninum* infections in cattle in Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 161, n. 1-2, p. 122-125, abr. 2009.

72.MUNHOZ, A. D., FLAUSINO, W., SILVA, R. T., ALMEIDA, C. R., LOPES, C. W. Distribution of anti-*Neospora caninum* antibodies in dairy cows at Municipalities of Resende and Rio Claro in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Belo Horizonte, v. 15, n. 3, p. 101-104, jul-set. 2006.

73.OGAWA, L., FREIRE, R. L., VIDOTTO, O., GONDIM, L. F. P., NAVARRO, I. T. Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 3, p. 313-316, jun. 2005.

74.OSAWA, T., WASTLING, J., MALEY, S., BUXTON, D., INNES, E. A. A multiple antigen ELISA to detect *Neospora*-specific antibodies in bovine sera, bovine foetal fluids, ovine and caprine sera. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 19-34, set. 1998.

75.OSAWA, T., WASTLING, J., ACOSTA, L., ORTELLADO, C., IBARRA, J., INNES, E. A. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Paraguay. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 110, n. 1-2, p. 17-23, dez. 2002.

76.OSHIRO, L. M., MATOS, M. F., DE OLIVEIRA, J. M., MONTEIRO, L. A., ANDREOTTI, R. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Belo Horizonte, v. 16, n. 3, p. 133-138, jul-set. 2007.

77.OTRANTO, D., LLAZARI, A., TESTINI, G., TRAVERSA, D., FRANGIPANE DI REGALBONO, A., BADAN, M., CAPELLI, G. Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 118, n. 1-2, p. 7-18, dez. 2003.

78.PAN, Y. G., JANSEN, B., DUFFIELD, T. F., HIETALA, S., KELTON, D., LIN, C. Y., PEREGRINE, A. S. Genetic susceptibility to *Neospora caninum* infection in Holstein cattle in Ontario. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 11, p. 3967-3975, nov. 2004.

79.PAULA, V. S., RODRIGUES, A. A., RICHTZENHAIN, L. J., CORTEZ, A., SOARES, R. M., GENNARI, S. M. Evaluation of a PCR based on primers to Nc5 gene for the detection of *Neospora caninum* in brain tissues of bovine aborted fetuses. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 28, n. 7, p. 581-585, out. 2004.

80.PARÉ, J., THURMOND, M. C., HIETALA, S. K. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 60, n. 2, p. 133-139, abr. 1996.

81. PARÉ, J., FECTEAU, G., FORTIN, M., MARSOLAIS, G. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 213, n. 11, p. 1595-1598, dez. 1998.
82. PEDRAZA-DÍAZ, S., MARUGÁN-HERNÁNDEZ, V., COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., REGIDOR-CERRILLO, J., ROJO-MONTEJO, S., GÓMEZ-BAUTISTA, M., ORTEGA-MORA, L. M. Microsatellite markers for the molecular characterization of *Neospora caninum*: Application to clinical samples. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 166, n. 1-2, p. 38-46, dez. 2009.
83. PEREIRA-BUENO, J., QUINTANILLA-GOZALO, A., PÉREZ-PÉREZ, V., ESPI-FELGUEROSO, A., ÁLVAREZ-GARCÍA, G., COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., ORTEGA-MORA, L. M. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 111, n. 2-3, p. 143-152, fev. 2003.
84. QUINTANILLA-GOZALO, A., PEREIRA-BUENO, J., TABARÉS, E.; INNES, E. A.; GONZÁLEZ-PANIELLO, R.; ORTEGA-MORA, L. M. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 8, p. 1201-1208, ago. 1999.
85. REGIDOR-CERRILLO, J., GOMEZ-BAUTISTA, M., PEREIRA-BUENO, J., ADURIZ, G., NAVARRO-LOZANO, V., RISCO-CASTILLO, V., FERNANDEZ-GARCÍA, A., PEDRAZA-DÍAZ, S., ORTEGA-MORA, L. M. Isolation and genetic characterization of *Neospora caninum* from asymptomatic calves in Spain. **Parasitology**, London, v. 135, n. 14, p. 1651–1659, dez. 2008.
86. ROJO-MONTEJO, S., COLLANTES-FERNANDEZ, E., REGIDOR-CERRILLO, J., ALVAREZ-GARCIA, G., MARUGAN-HERNANDEZ, V., PEDRAZA-DIAZ, S., BLANCO-MURCIA, J., PRENAFETA, A., ORTEGA-MORA, L. M. Isolation and characterization of a bovine isolate of *Neospora caninum* with low virulence. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 159, n. 1, p. 7-16, jan. 2009.

- 87.ROMERO, J. J., PEREZ, E., DOLZ, G., FRANKENA, K. Factors associated with *Neospora caninum* serostatus in cattle of 20 specialized Costa Rican dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 53, n. 4, p. 263-273, abr. 2002.
- 88.ROMERO, J. J., FRANKENA, K. The effect of the dam calf relationship on serostatus to *Neospora caninum* on 20 Costa Rican dairy farms. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 114, n. 3, p. 159-171, jun. 2003.
- 89.SAGER, H., FISCHER, I., FURRER, K., STRASSER, M., WALDVOGEL, A., BOERLIN, P., AUDIGÉ, L., GOTTSTEIN, B. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 102, n. 1-2, p. 1-15, dez. 2001.
- 90.SANDERSON, M. W., GAY, J. M., BASZLER, T. V. *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 90, n. 1-2, p. 15-24, jun. 2000.
- 91.SARTORI, M. J.; MEZZANO, L.; LIN, S.; MUNÓZ, S.; DE FABRO, S. P. Role of placental alkaline phosphatase in the internalization of trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into HEp2 cells. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 8, n. 9, p. 832–839, 2003.
- 92.SCHARES, G., PETERS, M., WURM, R., BARWALD, A., CONRATHS, F. J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analyzed by serological techniques. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 80, n. 2, p. 87-98, dez. 1998.
- 93.SCHOCK, A., BUXTON, D., SPENCE, J. A., LOW, J. C. BAIRD, A. Histopathological survey of aborted bovine fetuses in Scotland with special reference to *Neospora caninum*. **Veterinary Record**, London, v. 147, n. 24, p. 687-688, dez. 2000.

94.SCHULZE, C. M. B. **Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em fêmeas bovinas do Estado de Goiás e fatores associados.** 2008. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil.

95.SERRANO, E., FERRE, I., OSORO, K., ADURIZ, G., MATEOS-SANZ, A., MARTÍNEZ, A., ATXAERANDIO, R., HIDALGO, C. O., ORTEGA-MORA, L. M. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 135, n. 3-4, p. 197-203, fev. 2006.

96.THILSTED, J. P., DUBEY, J. P. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 1, n. 3, p. 205-209, jul. 1989.

97.TREES, A. J., DAVISON, H. C., INNES, E. A., WASTLING, J. M. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 8, p. 1195-1200, ago. 1999.

98.UGGLA, A., STENULD, S., HOLMDAHL, O. J. M., JAKUBEK, E. B., THEBO, P., KINDAHL, H., BJÖRKMAN, C. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 9, p. 1467-1472, set. 1998.

99.VIANNA L. C., SARTOR, I. F., PITUCO, E. M., OKUDA, L. H., CAMARGO, C. N., KRONKA, S. N. Incidence and transplacental transmission of *Neospora caninum* in primiparous females from *Bos indicus* slaughtered in Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 387-92, 2008.

100.VITALIANO, S. N., SILVA, D. A., MINEO, T. W., FERREIRA, R. A., BEVILACQUA, E., MINEO, J. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from

southeastern and midwestern regions of Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 122, n. 4, p. 253-260, ago. 2004.

101. WALDNER, C. L., JANZEN, E. D., RIBBLE, C. S. Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 213, n. 5, p. 685-690, set. 1998.

102. WALDNER, C. L., JANZEN, E. D., HENDERSON, J., HAINES, D. M. Outbreak of abortion associated with *Neospora caninum* infection in a beef herd. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 215, n. 10, p. 1485-1490, nov. 1999.

103. WALDNER, C. L., HENDERSON, J., WU, J. T., BREKER, K., CHOW, E. Y. Reproductive performance of a cow-calf herd following a *Neospora caninum* associated abortion epidemic. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 42, n. 5, p. 355-360, mai. 2001.

104. WANG, C. R., ZHAI, Y. Q., ZHAO, X. C., TAN, Q. J., CHEN, J., CHEN, A. H., WANG, Y. Preliminary application of PCR-based assay for the detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetus. **Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi**, Shanghai, v. 27, n. 2, p. 140-143, abr. 2009.

105. 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**, London, v. 121, n. 4, p. 347-358, out. 2000.

106. WOUDA, W., MOEN, A. R., VISSER, I. J. R., VAN KNAPEN, F. Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification

of organisms in brain, heart, and liver. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 9, n. 2, p. 180-185, abr. 1997.

107. WOUDA, W., MOEN, A.R., SCHUKKEN, Y.H. Abortion risk in progeny of cows that experienced a *Neospora caninum* epidemic. **Theriogenology**, Stoneham, v. 49, n. 7, p. 1311-1316, mai. 1998.

108. 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). **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 82, n. 2, p. 272-279, abr. 1996.

CAPÍTULO 2: Detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in fetal fluids from slaughtered zebu cattle in Goiás, Brazil

Enviado para *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*

Detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in fetal fluids from slaughtered zebu cattle in Goiás, Brazil

Detección de anticorpos anti-*Neospora caninum* em fluidos fetais obtidos de vacas zebu abatidas em Goiás, Brasil

Paula Rogério Fernandes¹, Esther Collantes-Fernández², Luis Miguel Ortega Mora², Marcelo Sales Guimarães¹, Lúgia Miranda Ferreira Borges³, Andréa Caetano da Silva³

Acknowledgements

This work has been supported by an International Cooperation Program – CAPES (Brazil) and MECD (Spain).

Resumo

Para avaliar a ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e sua transmissão pré-natal em zebuínos, foi realizada a análise sorológica de fluidos tóraco-abdominais de fetos de quatro a nove meses de gestação colhidos em um frigorífico. Um total de 195 fluidos fetais foi testado por reação de imunofluorescência indireta com ponto de corte de 1:64. Anticorpos anti-*N. caninum* foram encontrados em 12 (6,15%) fluidos fetais provenientes de fetos de cinco a oito meses de idade gestacional com títulos de RIFI de 1:64 em uma amostra, 1:128 em duas, 1:512 em três, 1:1024 em cinco e 1:2048 em uma. O maior número de reações positivas ocorreu em fetos do sexto e sétimo mês de gestação. Os resultados reforçam a existência da transmissão vertical de *N. caninum* em vacas zebuínas, indicando a necessidade de mais estudos sobre a enfermidade nessa espécie bovina.

Palavras chave: *Bos indicus*, Fluido fetal, Neosporose, RIFI

¹ Pós-Graduação em Sanidade Animal/Escola de Veterinária/UFG, Caixa postal 131, CEP: 74001-970, Goiânia, Goiás, Brazil.

² Saluvet, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid/UCM, Madrid, Spain.

³ Laboratório de Parasitologia Veterinária/DMIPP/IPTSP/UFG, Goiânia, Goiás, Brazil.

Abstract

To evaluate the occurrence of antibodies anti-*Neospora caninum* and its prenatal transmission in zebuine cattle, it was performed the serological analysis of thoracic-abdominal fetal fluids collected from four to nine months old fetuses in a slaughterhouse. A total of 195 fetal fluids were tested by indirect fluorescent antibody test with a cut off of 1:64. Anti-*N. caninum* antibodies were found in 12 (6.15%) fetal fluids collected from five to eight months old fetuses with IFAT titers of 1:64 in one sample, 1:128 in two, 1:512 in three, 1:1024 in five and 1:2048 in one. The largest number of positive ratios occurred in fetus samples of the sixth and seventh month of gestation. The results support the existence of vertical transmission of *N. caninum* in zebuine cows, indicating the need of more studies about the disease in this bovine species.

Key words: *Bos indicus*, Fetal fluid, IFAT, Neosporosis

Introduction

Neospora caninum is an obligate intracellular protozoan parasite which has been recognized as a major cause of infectious bovine abortion worldwide¹. The endogenous transplacental transmission of this coccidian parasite, resulting from recrudescence of bradyzoite cysts in a chronically infected dam, is the major natural route of infection to the offspring during successive pregnancies². *N. caninum* infection is generally latent and asymptomatic in non-pregnant cattle, although the consequences in a pregnant cow may be abortion, the birth of a weak calf or a clinically healthy but persistently infected calf^{3,4}.

In Brazil, *N. caninum* was identified for the first time by Gondim et al.⁵ in a dairy herd in Bahia. In Goiás, Melo et al.⁶ reported seroprevalences by an enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA) of 29.6, 30.4 e 43.3% in beef, dairy and mixed breed cattle respectively.

In cattle, *N. caninum* is vertically transmitted efficiently². Fetuses are able to recognize and respond to an antigen stimulus at 150 days of gestation and

later. Vianna et al.⁷ showed the transplacental route of transmission of neosporosis in zebuine fetuses by using an ELISA technique and detected antibodies with four or more months of gestation.

The present work evaluated, by indirect fluorescent antibody test (IFAT), the occurrence of antibodies to and the vertical transmission of *N. caninum* in zebuine fetuses (*Bos taurus indicus*) in Goiás, Brazil.

Materials and Methods

The study was performed using bovine fetal fluid samples of 195 fetuses collected randomly from slaughtered cattle in Senador Canedo, Goiás, Brazil. Before necropsy, data were recorded, such as the general status of the fetuses (autolyzed, mummified, etc.), the presence of macroscopic lesions and the ages of the fetuses estimated in months by the measurement of crown-rump length⁸. Fetal fluids were recovered from the thoracic or abdominal cavity using sterile syringes. Samples were centrifuged at 500 x g for 10 min, to eliminate cellular debris, and the serum was aliquoted and stored at -20 °C until analyzed. Specific *N. caninum* IgG antibodies were detected by IFAT using whole NC-1 (Dubey et al., 1988) tachyzoites obtained in a cell culture as an antigen.

The samples were diluted in a phosphate buffered saline solution (pH 7.2) and screened at a 1:64 dilution (cut off point), as previously recommended by Álvarez-García et al.⁹ in function of the gestational age for maximum sensibility and specificity of the technique. Serum samples showing fluorescence at a 1:64 dilution were titrated using two-fold serial dilutions until fluorescence extinction.

Negative and positive control fetal sera (Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain) were included on each slide, in addition to the PBS buffer as a conjugate control.

Results and Discussion

Anti-*N. caninum* antibodies were detected in 6.15% (12/195) of the fluids from fetuses of five to eight months of gestational age, with IFAT titers varying from 1:64 to 1:2048, demonstrating congenital neosporosis. The IFAT titers in relation to gestational age of fetuses are represented in Table 1.

IFAT has been used for the serological diagnosis of *N. caninum* in fetuses^{7,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20}. The relatively low number of positive fetuses observed was due to the fact that this study was performed on non-aborted fetuses whereas the majority of other studies were conducted on aborted products^{11,12,13,14,15,16,18,19,20}. Some of the negative results obtained here could be due an inadequate fetal humoral response like occurred with Moore et al.¹², or by sampling, or the interval between infection and fetal death was not long enough for antibodies development like proposed by Wouda et al.¹⁹.

The rate found was superior to the 4.5% related to beef fetuses by Venturini et al.¹⁶. However, Vianna et al.⁷ obtained a higher rate (36.8%) of positive healthy fetuses at four months of gestation diagnosed by ELISA test with a cut-off point of 1:10 to detection low levels of specific antibodies. It is not possible to establish a correlation between the D.O. values obtained by the ELISA technique of Vianna et al.⁷ and the antibodies titers detected in our study by IFAT for zebuine fetuses because of the technical differences.

In relation to the cut-off, Álvarez-García et al.⁹ commented the absence of a consent cut-off point between different laboratories, and alerted that the use of a cut-off point inferior to those described in the literature, may increase the risk of false-positive cases, mainly in such young fetuses (four months of gestation). To avoid cross reaction, cut-off values for maximum sensitivity and specificity should be used^{9,19,20}, and some ELISA tests are not considered very useful in detecting antibodies to *N. caninum* in fetal sera¹⁹, probably first of all needing to be standardized in fetuses with confirmed neosporosis.

The age of the serologically positive fetuses (at least five months) is in agreement with the available literature^{11,12,13,15,16,17,18,19}. This is related to the development and maturation of the immune system²¹. Barr et al.²⁰ found that the occurrence of antibodies in fetuses increases with the gestational age. We did not find an age related increase in seroprevalence, but a tendency for titers to increase with fetal age was seen at table 1 like Wouda et al.¹⁹.

For the sampling location and the slaughter flow, the mothers' sera were not available to collect and consequently it was not possible to calculate the rate of vertical transmission.

This study indicates that the vertical transmission of *N. caninum* does occur in zebuine. In prevalence studies it has been reported that *Bos indicus* present a lower seroprevalence than *Bos taurus*^{6,22,23,24}. This could be due to differences in susceptibility of the two species as demonstrated in other parasitic models (helminths, ticks, etc); however, little information is available on these differences in neosporosis transmission. More probably, it might be due to differences in cattle breeds, where dairy management strategies for cow replacement, under intensive grazing conditions over long periods of time, is done with their own heifers, maintaining neosporosis by vertical transmission²⁵.

In general, as well as in beef cows compared to dairy cows, the prevalence of *N. caninum* antibody in beef fetuses tends to be smaller than in dairy fetuses¹⁶.

Conclusions

The results support the existence of vertical transmission of *N. caninum* in zebuine cows in Goiás, indicating more studies about the disease in this bovine species. Although, the prevalence is inferior to most found for taurine, probably for handling differences and for the replacement of females, and could still be supposed susceptibility differences.

References

- 1 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.
- 2 DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 1-34, 2006.

- 3 BUXTON, D.; MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 12, p. 546-552, 2002.
- 4 INNES, E. A.; ANDRIANARIVO, A. G.; BJÖRKMAN, C.; WILLIAMS, D. J. L.; CONRAD, P. A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 11, p. 497-504, 2002.
- 5 GONDIM, L. F. P.; SARTOR, I. F.; HASEGAWA, M.; YAMANE, I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 86, p. 71-75, 1999.
- 6 MELO, D. P. G.; SILVA, A. C.; 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, n. 3, p. 105-109, 2006.
- 7 VIANNA L. C.; SARTOR, I. F.; PITUCO, E. M.; OKUDA, L. H.; CAMARGO, C. N.; KRONKA, S. N. Incidence and transplacental transmission of *Neospora caninum* in primiparous females from *Bos indicus* slaughtered in Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 2, p. 387-92, 2008.
- 8 HUBBERT, W. T.; STALHEIM, O. H.; BOOTH, G. D. Changes in organ weights and fluid volumes during growth of the bovine fetus. **Growth**, v. 36, n. 3, p. 217-233, set. 1972.
- 9 ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; COSTAS, E.; REBORDOSA, X.; ORTEGA-MORA, L. M. Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. **Veterinary Research**, v. 34, p. 341-352, 2003.

10 BARTLEY, P. M.; KIRVAR, E.; WRIGHT, S.; SWALES, C.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D.; MALEY, S. W.; SCHOCK, A.; RAE, A. G.; HAMILTON, C.; INNES, E. A. Maternal and fetal immune responses of cattle inoculated with *Neospora caninum* at mid-gestation. **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, p. 81-91, 2004.

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

12 MOORE, D. P.; CAMPERO, C. M.; ODEÓN, A. C.; POSSO, M. A.; CANO, D.; LEUNDA, M. R.; BASSO, W.; VENTURINI, M. C.; SPÄTH, E. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 107, p. 303-316, 2002.

13 ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; PEREIRA-BUENO, J.; GÓMES-BAUTISTA, M.; ORTEGA-MORA, L. M. Pattern of recognition of *Neospora caninum* tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted fetuses. **Veterinary Parasitology**, v. 107, p. 15-27, 2002.

14 KIM, J. H.; LEE, J. K.; LEE, B. C.; PARK, B. K.; YOO, H. S.; HWANG, W. S.; SHIN, N. R.; KANG, M. S.; JEAN, Y. H.; YOON, H. J.; KANG, S. K.; KIM, D. Y. Diagnostic survey of bovine abortion in Korea: with special emphasis on *Neospora caninum*. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 12, p. 1123-1127, 2002.

15 SÖNDGEN, P., PETERS, M., BÄRWALD, A., WURM, R., HOLLING, F., CONRATHS, F. J., SCHARES, G. Bovine neosporosis: immunoblot improves foetal serology. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n. 4, p. 279-290, 2001.

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

17 GONZÁLEZ, L., BUXTON, D., ATXAERANDIO, R., ADURIZ, G., MALEY, S., MARCO, J. C., CUERVO, L. A. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. **Veterinary Record**, v. 144, n. 6, p. 145-150, 1999.

18 GOTTSTEIN, B., HENTRICH, B., WYSS, R., THÜR, B., BUSATO, A., STÄRK, K. D., MÜLLER, N. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. **International Journal of Parasitology**, v. 28, n. 4, p. 679-691, 1998.

19 WOUDA, W.; DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. **Journal of Parasitology**, v. 83, n. 3, p. 545-547, 1997.

20 BARR, B. C.; ANDERSON, M. L.; SVERLOW, K. W.; CONRAD, P. A. Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. **The Veterinary Record**, v. 137, n. 24, p. 611-613, 1995.

21 OSBURN, B. I. Ontogeny of immune responses in cattle. In: MORRISON, I.; IVAN, W. (Eds.). **The Ruminant Immune System in Health and Disease**. Great Britain, 1988. p. 252-260.

22 SARTOR, I. F.; GARCIA FILHO, A.; VIANNA, L. C.; PITUCO, E. M.; DAL PAI, V.; SARTOR, R. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros e de corte da região de Presidente Prudente, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 4, p. 413-418, 2005.

23 ANDREOTTI, R.; PINCKNEY, R. D.; PIRES, P. P.; SILVA, E. A. E. Evidence of *Neospora caninum* in beef cattle and dogs in the State of Mato Grosso do Sul,

center-western region, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 3, p. 129-131, 2004.

24 HASEGAWA, M. Y.; SARTOR, I. F.; OLIVEIRA CANAVESSI, A. M.; PINCKNEY, R. D. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in beef cattle and in farm dogs from Avaré Region of São Paulo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 1, p. 45-50, 2004.

25 QUINTANILLA-GOZALO, A.; PEREIRA-BUENO, J.; TABARÉS, E.; INNES, E. A.; GONZÁLEZ-PANIELLO, R.; ORTEGA-MORA, L. M. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1201-1208, 1999.

Table 1

Neospora caninum IFAT titers in relation to gestational age of 195 fetuses from slaughtered zebuine cows, Goiás, 2008.

Gestational age (in mo)	N° of fetuses	<i>Neospora caninum</i> IFAT titers						% with <i>N. caninum</i> antibody
		Negative ($<1:64$)	1:64	1:128	1:512	1:1024	1:2048	
4	11	11	0	0	0	0	0	0.00
5	38	37	1	0	0	0	0	2.63
6	62	58	0	1	2	1	0	6.45
7	56	50	0	1	1	3	1	10.71
8	26	25	0	0	0	1	0	3.84
9	2	2	0	0	0	0	0	0.00
Totals	195	183	1	2	3	5	1	6.15

CAPÍTULO 3: Aspectos histopatológicos e detecção de DNA de *Neospora caninum* em tecidos de fetos de vacas zebuínas abatidas em Goiás, Brasil

Aspectos histopatológicos e detecção de DNA de *Neospora caninum* em tecidos de fetos de vacas zebuínas abatidas em Goiás, Brasil

Resumo

O parasito *Neospora caninum* é importante causa de falhas reprodutivas em bovinos de todo o mundo, estando presente em rebanhos brasileiros de leite e corte. Novilhas cronicamente infectadas transmitem o parasito via transplacentária por gestações sucessivas. Objetivou-se realizar o estudo histopatológico e a detectar DNA parasitário em tecidos de fetos zebuínos. Fetos de *Bos indicus* não abortados (n = 195) obtidos em Goiás entre abril e agosto de 2006 foram usados nessa análise. A idade fetal foi determinada pela medida de comprimento da região occipital até a base da cauda. Amostras de cérebro, coração e fígado foram colhidas, parte delas foi congelada a -80 °C e outra parte fixada em formol a 10%. A infecção foi primeiramente diagnosticada pela detecção de lesões histopatológicas típicas de infecção por protozoários, como inflamação não-supurativa e/ou necrose, complementada pela *nested*-PCR. A idade fetal variou de quatro a nove meses. Quarenta (20,51%) fetos zebuínos foram positivos por PCR e 82 (42,05%) apresentaram lesões microscópicas sugestivas de infecção por protozoários. O DNA parasitário foi amplificado mais freqüentemente no tecido cerebral, onde foi encontrada a maioria das lesões. De modo geral, a concordância entre os resultados obtidos por essas técnicas foi baixa, embora tenha permitido diagnosticar a infecção parasitária. Os resultados demonstram a ocorrência de lesões e de DNA parasitário em zebuínos e indicam a necessidade de associação de técnicas no diagnóstico da neosporose fetal.

PALAVRAS CHAVE: *Bos indicus*, Diagnóstico, Histopatologia, Neosporose, *Nested*-PCR

Abstract

The parasite *Neospora caninum* is an important cause of reproductive failure in cattle world-wide, being present in Brazilian dairy and beef herds. Chronically infected dams repeatedly transmit the parasite transplacentally. The present work was designed to accomplish the histopathologic study and to detect the parasite DNA in tissues of zebuine fetuses. *Bos indicus* non-aborted fetuses (n = 195) from Goiás submitted between April and August 2006 were used in this analysis. The fetal age was estimated by the measurement of crown-rump length. Samples of brain, heart and liver were collected, part of them was frozen at -80 °C and the other was fixed in 10% buffered formalin. Infection was primarily diagnosed by the detection of histopathologic lesions typical of protozoan infection, such as non-suppurative inflammation and/or necrosis, complemented by a nested-PCR. The fetal age varied from four to nine months. Forty (20.51%) zebuine fetuses were positive by PCR and 82 (42.05%) presented microscopic lesions suggestive of protozoan infection. Parasite DNA was amplified most frequently from brain tissue, where were found most of the lesions. In general, the agreement between the results obtained by these techniques was low, although have allowed to diagnose the parasite infection. The results demonstrate the occurrence of lesions and the parasite DNA in zebuine, and indicate the need of association of techniques in the diagnosis of the fetal neosporosis.

KEYWORDS: *Bos indicus*, Diagnosis, Histopathology, Neosporosis, Nested-PCR

Introdução

A cadeia produtiva da carne bovina brasileira tem expressiva representatividade em âmbito nacional e internacional. O Brasil apresenta o segundo maior rebanho bovino do mundo (122.072.905 cabeças), tendo a região Centro-Oeste cerca de 20 milhões de cabeças (quarto maior do País) e o número mais elevado de animais abatidos (11.053.456) (ANUALPEC, 2008). Na produção

leiteira o Estado de Goiás é o segundo maior produtor do país, e no ranking nacional de abate bovino ocupa o quarto lugar (IBGE, 2009).

Com essa importante indústria da carne, as falhas reprodutivas, pela ocorrência de enfermidades infecciosas, provocam perdas econômicas significativas. Na etiologia dessas enfermidades, o protozoário intracelular obrigatório – *Neospora caninum* – foi identificado como uma das causas mais importantes de abortamento bovino infeccioso na pecuária leiteira e de corte mundial (ANDERSON et al., 2000; DUBEY et al., 2007).

Mais estudos são necessários para compreender sua epidemiologia e permitir o controle da neosporose bovina na América do Sul (MOORE, 2005), onde a infecção tem sido reportada na Argentina (CAMPERO et al., 1998), Chile (PATITUCCI et al., 1999), Paraguai (OSAWA et al., 2002), Uruguai (KASHIWAZAKI et al., 2004), Peru (STÅHL et al., 2006) e no Brasil (GONDIM et al., 1999; LOCATELLI-DITTRICH, et al., 2001; CORBELLINI et al., 2002, 2006; DE MELO et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2004; AGUIAR et al., 2006; MELO et al., 2006; MINEO et al., 2006; MUNHOZ et al., 2006; OSHIRO et al., 2007; GUEDES et al., 2008; MINERVINO et al., 2008; VIANNA et al., 2008).

Não há estimativas das perdas por neosporose no País, mas com base nas ocorrências informadas, os prejuízos causados por esta infecção provavelmente excedem os de outras doenças abortivas como brucelose e leptospirose (VIANNA et al., 2008). Perdas no ganho de peso pós-desmame e baixa qualidade de carcaça foram associadas a bezerros soropositivos (BARLING et al., 2000).

Em Goiás, MELO et al. (2006) observaram prevalência de *N. caninum* de 29,61% em gado de corte e 30,4% em leite.

A presença de *N. caninum* em um único feto abortado pode ser o reflexo da infecção no rebanho (THURMOND et al., 1995). No entanto, há evidências de que a epidemiologia da neosporose bovina não se apresenta da mesma forma entre os rebanhos de leite e corte. Tais diferenças são principalmente atribuídas ao manejo a eles aplicado. A criação intensiva, sob maior densidade populacional, e o tipo de reposição das fêmeas foram associados ao aumento da prevalência de *N. caninum* em gado de leite

(SANDERSON et al., 2000; KIM et al., 2002; OTRANTO et al., 2003; MOORE et al., 2009).

Apesar de haver então um menor risco de infecção com abortamento em vacas de corte infectadas (HELMAN et al., 1998; DE MEERSCHMAN et al., 2002), surtos causados pelo parasito já foram reportados nesses rebanhos por MOORE et al. (2003) e ANDREOTTI et al. (2004).

A transmissão vertical, comum em rebanhos endêmicos, assume papel importante na manutenção da enfermidade no rebanho, sendo vital para a sobrevivência do parasito e disseminação da infecção (DUBEY et al., 2006, 2007).

Pela inexistência de sinais patognomônicos e pela frequência de baixo número de parasitos, uma variedade de técnicas diagnósticas provou ser útil na detecção da infecção em fetos, usadas em associação (PEREIRA-BUENO et al., 2003). Uma das técnicas amplamente utilizada é a histopatologia do cérebro fetal e de alguns outros órgãos como coração e fígado, associada ou não com a imunoistoquímica (IHQ), na tentativa de diagnosticar lesões características de infecção por protozoários (GONZÁLEZ et al., 1999; PEREIRA-BUENO et al., 2003). Além disso, técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) foram usadas para detectar o DNA parasitário em tecidos (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006), tornando-se essencial ao diagnóstico laboratorial, especialmente quando associadas aos achados histopatológicos (SAGER et al., 2001).

As lesões são principalmente localizadas no cérebro, miocárdio e ocasionalmente no fígado (KIM et al., 2002; COLLANTES-FERNÁNDEZ et al. 2006), sendo mais frequentes e severas no cérebro e coração (MOORE et al., 2002; CORBELLINI et al., 2002; COLLANTES-FERNÁNDEZ et al. 2006). Lesões histopatológicas consistentes com meningoencefalite, epicardite, miocardite, hepatite, miosite e placentite não-supurativas multifocais e necrotizantes foram descritas na maioria dos estudos sobre o assunto (CAMPERO et al., 1998; GONDIM et al., 1999; GONZÁLEZ et al., 1999; VENTURINI et al., 1999; CORBELLINI et al., 2002; MOORE et al., 2002, 2003; PEREIRA-BUENO et al., 2003; KASHIWAZAKI et al., 2004; COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006).

Segundo CORBELLINI et al. (2002), pesquisas epidemiológicas sobre a neosporose no Brasil são necessárias, esclarecendo a influência dos diferentes

sistemas de produção de leite e corte e das distintas raças *Bos taurus* e *Bos indicus*, na manifestação e transmissão da enfermidade.

Como a maioria dos estudos sobre neosporose bovina tem sido conduzida em gado leiteiro europeu (DUBEY & LINDSAY, 1996; MELO et al., 2006; DUBEY et al., 2007) e não em rebanho de corte zebuino, objetivou-se realizar o estudo histopatológico de lesões associadas à infecção por protozoários, e a detecção de DNA de *N. caninum* no cérebro, coração e fígado de fetos zebuínos provenientes de fêmeas abatidas no Estado de Goiás.

Material e Métodos

Colheita de amostras

Foram utilizados fetos de vacas zebuínas abatidas em um frigorífico comercial de Goiás, de abril a agosto de 2006. Um total de 195 fetos foi obtido em amostragem por conveniência.

Antes da necropsia, a idade fetal foi estimada em meses, pela medida do comprimento da região occipital à base da cauda (HUBBERT et al., 1972).

Os fetos foram agrupados em três classes correspondentes ao primeiro (de 42 a 120 dias ou três a quatro meses), segundo (de 121 a 195 dias ou cinco a seis meses) e terceiro (mais de 196 dias ou sete a oito meses) estágios gestacionais.

Durante a necropsia foram colhidas, sob condições assépticas, três amostras de diferentes locais do cérebro, coração e fígado, padronizando as áreas a serem colhidas por órgão em cada feto, totalizando 585 amostras de tecidos. As amostras foram acondicionadas individualmente, em bolsas plásticas, a -80 °C até extração de DNA para análise por meio da reação de PCR.

Para o exame histopatológico, fragmentos dos órgãos foram fixados em formaldeído tamponado a 10%, pH neutro (7,0).

Os testes laboratoriais foram realizados no Centro de Parasitologia Veterinária da Universidade Federal de Goiás e na *Universidad Complutense de Madrid*.

Exame histopatológico dos tecidos fetais

Os fragmentos de órgãos colhidos e fixados foram desidratados em diluições crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol, incluídos em parafina e seccionados com 5 µm de espessura. Os cortes foram corados pela hematoxilina-eosina (H&E) e examinados em microscópio óptico.

De acordo com a detecção de lesões como encefalite, miocardite e hepatite não-supurativas focais ou multifocais, acompanhadas ou não de necrose, os tecidos dos fetos foram classificados em “não detectado/não relacionado a” (-), “consistente com” (+) ou “característico de” (++) infecção por protozoários, utilizando-se os critérios adotados por GONZÁLEZ et al. (1999) e PEREIRA-BUENO et al. (2003).

O quadro lesional “característico de” infecção por protozoários foi definido por necrose circundada por infiltrado inflamatório de células mononucleares. As lesões descritas como “consistentes com” foram determinadas no cérebro como inflamação focal a multifocal não-supurativa ou como necrose, caracterizada pela presença de focos de microgliose espalhados pelo parênquima cerebral, freqüentemente na proximidade dos vasos sanguíneos. Da mesma forma, no coração e no fígado, identificou-se miocardite e hepatite não supurativas ou necrose.

Extração de DNA em tecido congelado

O DNA genômico foi obtido a partir de 20 mg de amostras de tecidos homogeneizados de cérebro, coração e fígado dos fetos usando um *kit* de extração (*Real Pure Extracción DNA Genómico*, Durviz, Patema, Espanha), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de DNA foi medida por espectrofotômetro na absorbância de 260/280 e todas as amostras de DNA foram diluídas à concentração final de 60 ng/mL e armazenadas a -20 °C até análise por PCR.

Amplificação da região ITS-1 de *Neospora caninum* pela *nested*-PCR

A análise pela PCR do DNA de *N. caninum* em cérebro, coração e fígado foi realizada por ensaio da *nested*-PCR baseado na amplificação da região ITS-1 (*internal transcribed spacer 1*), com uso dos *primers* NN1 (5'-TCAACCTTTGAACCCAA -3') - NN2 (5'-CGAGCCAAGACATCCATT -3') e NP1 (5'-TACTACTCCCTGTGAGTTG -3') - NP2 (5'-TCTCTTCCCTCAAACGCT -3') (BUXTON et al., 1998). Os pares de *primers* internos NP1-NP2 são específicos para *N. caninum* amplificando um fragmento de DNA de 213 pares de base (pb).

A quantidade de 300 ng de DNA extraído das amostras de tecido foi usada como modelo em cada reação. A amplificação do DNA foi executada em volume total 25 µL contendo água ultrapura esterilizada ajustada ao volume final, 2,5 µL de tampão *buffer* 1x (Biotools), 1,0 µL de cloreto de magnésio (MgCl₂) a 1,5 mM (Biotools), 0,5 µL de dNTPs a 200 µM (Sigma), 2,5 µL de cada *primer* (Sigma) a 0,15 µM (NN1 e NN2) ou a 2,0 µM (NP1 e NP2), 1 unidade de DNA polimerase (Biotools) e 5 µL de DNA extraído, usando um termociclador (Mastercycler, Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Os parâmetros do ciclo da primeira amplificação consistiram em um ciclo à 94°C por 5 min., 35 ciclos de desnaturação (94 °C, 1 min.), anelamento (54 °C, 1 min.) e extensão (72 °C, 1 min.), com extensão final a 72°C por 10 min. Depois da amplificação primária, o segundo par de *primers* foi acrescentado a 5 µL do primeiro produto de PCR ao *mix* da reação de amplificação secundária e o *amplicons* foram submetidos a 35 ciclos de 94 °C por 1 min., 62 °C por 1 min. e 72 °C por 1 min., com uma extensão final de 72 °C por 10 min.

Alíquotas de 5 µL do segundo produto amplificado foram submetidas à eletroforese, em gel de agarose a 1,8% corado com brometo de etídio e visualizadas sob luz UV. Para evitar reações falso-positivas, a extração de DNA, a preparação da amostra de PCR e a eletroforese foram executadas em salas separadas com seus próprios equipamentos. DNA de taquizoítos de *N. caninum* purificados mantidos em culturas de células e água ultra-pura foram incluídos em cada reação de *nested*-PCR, respectivamente, como controles positivo e negativo.

Todos os procedimentos para execução da técnica foram padronizados no laboratório da *Universidad Complutense de Madrid* onde o presente estudo foi desenvolvido.

Análise de dados

O grau de concordância entre as diferentes técnicas utilizadas foi calculado pelo valor de kappa (K), utilizando o programa estatístico WIN EPISCOPE 2.0. Os valores de K obtidos foram interpretados conforme sugerido por LANDIS & KOCH (1977).

A comparação da ocorrência de lesões ou da presença de DNA de *N. caninum*, nos diferentes órgãos examinados, foi feita pelo teste do Chi-quadrado (X^2).

Foi realizada a avaliação da influência do período gestacional (primeiro, segundo ou terceiro terços) quanto à positividade por PCR ou à ocorrência de lesões nos fetos, utilizando-se teste do X^2 .

Resultados

Dos 195 fetos avaliados nesse estudo, 11 (5,64%) pertenciam ao primeiro, 100 (51,28%) ao segundo e 84 (43,08%) ao terceiro terços gestacionais, sendo 11 do quarto mês, 38 do quinto, 62 do sexto, 56 do sétimo, 26 do oitavo e somente dois no nono mês de gestação.

Histopatologia

A presença de lesões associadas à infecção por protozoários foi avaliada em amostras dos tecidos dos 195 fetos colhidos.

Um total de 42,05% (82/195) dos fetos estudados apresentou lesões “características de” ou “consistentes com” infecção por protozoários. Entre as 585

amostras de tecido, 100 (17,09%) apresentaram lesões, sendo 10% (10/100) delas consideradas como lesões características e 90% (90/100) como consistentes, compostas por 52 (52%) cérebros, 42 (42%) corações e seis (6%) fígados (Tabela 1). Trinta e oito fetos apresentaram lesões somente em cérebro, 27 em coração e um em fígado. Dois fetos apresentaram lesões simultaneamente nos três órgãos; 11 em cérebro e coração; um em cérebro e fígado, e dois em coração e fígado.

Tabela 1 – Número de amostras que apresentaram lesões classificadas em características (n=10) ou consistentes (n=90) à infecção por protozoários de acordo com a idade gestacional dos fetos.

Idade gestacional (meses)	Número de amostras com lesões					
	Características			Consistentes		
	cérebro	coração	fígado	cérebro	coração	fígado
4	0	0	0	3	1	0
5	1	2	1	8	4	1
6	1	2	0	16	10	2
7	0	1	0	17	11	2
8	1	1	0	5	10	0
9	0	0	0	0	0	0
Número de fetos	3	6	1	49	36	5

Em geral, as lesões nos tecidos afetados foram caracterizadas por múltiplos focos de infiltrados mononucleares não-supurativos, com ou sem áreas de necrose.

Nas dez amostras de tecido com patologia fetal “característica de” infecção por protozoários, as lesões eram formadas por necrose circundada por infiltrado inflamatório mononuclear consistindo em encefalite multifocal não-supurativa, miocardite não-supurativa com grupos de linfócitos e macrófagos infiltrando as fibras musculares cardíacas (Figura 1 e 2), e hepatite periportal não-supurativa (Figura 3).

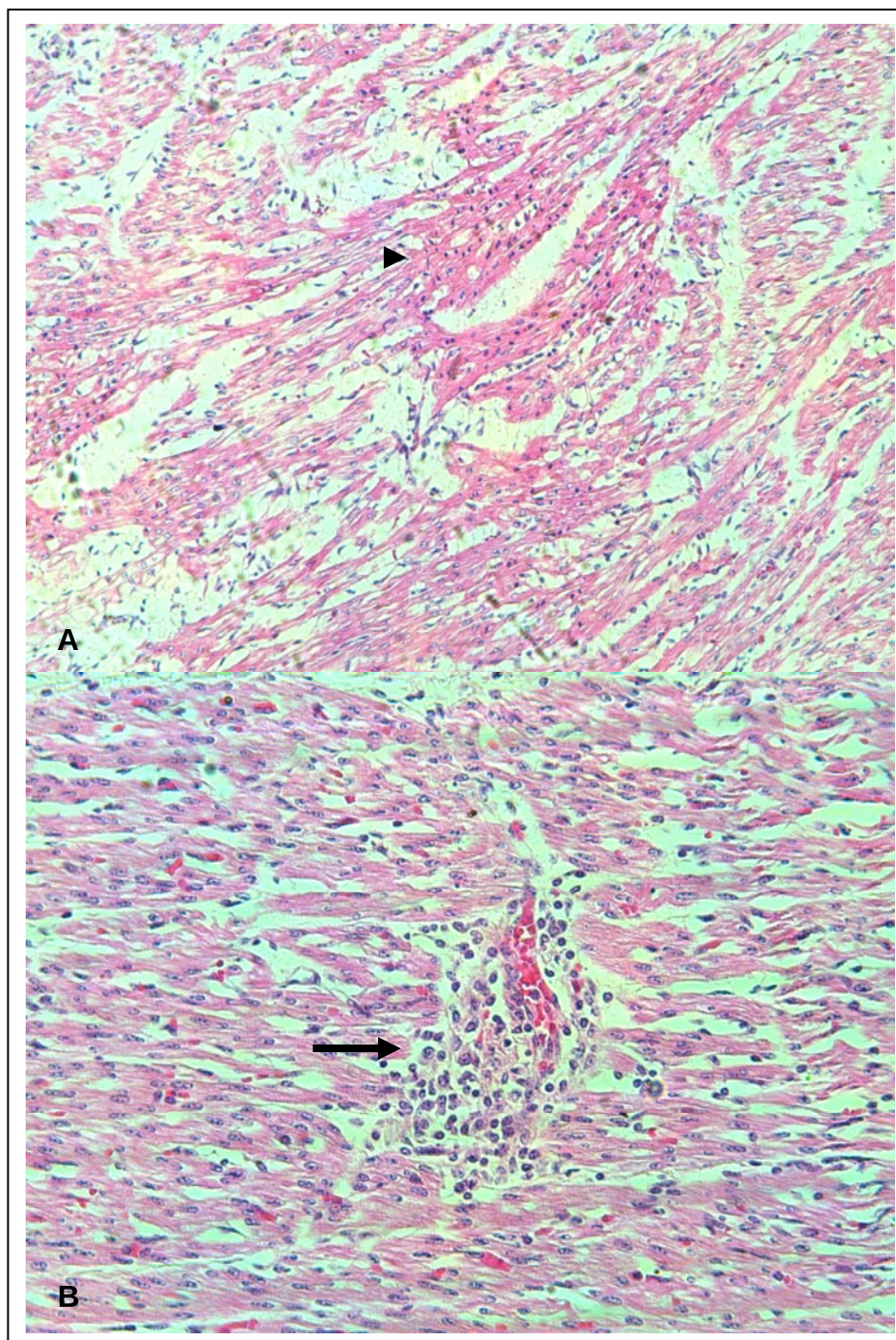


Figura 1 - Miocardite sugestiva de infecção por protozoários em fetos zebuínos. (A) Necrose focal e discreta em miocárdio de um feto de oito meses de idade (cabeça de seta). HE. 200x. (B) Infiltrado inflamatório mononuclear perivascular em miocárdio de um feto de sete meses de idade (seta). HE, 400x.

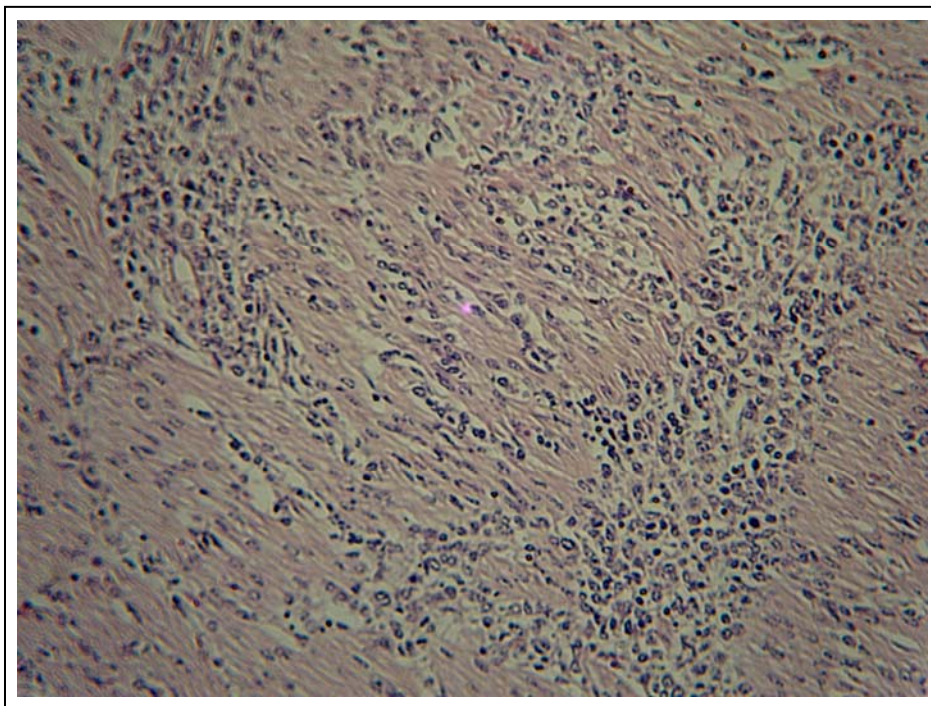


Figura 2 - Miocardite sugestiva de infecção por protozoários em feto zebuino. Infiltrado inflamatório mononuclear multifocal acentuado em miocárdio de um feto de cinco meses de idade. HE, 100X.

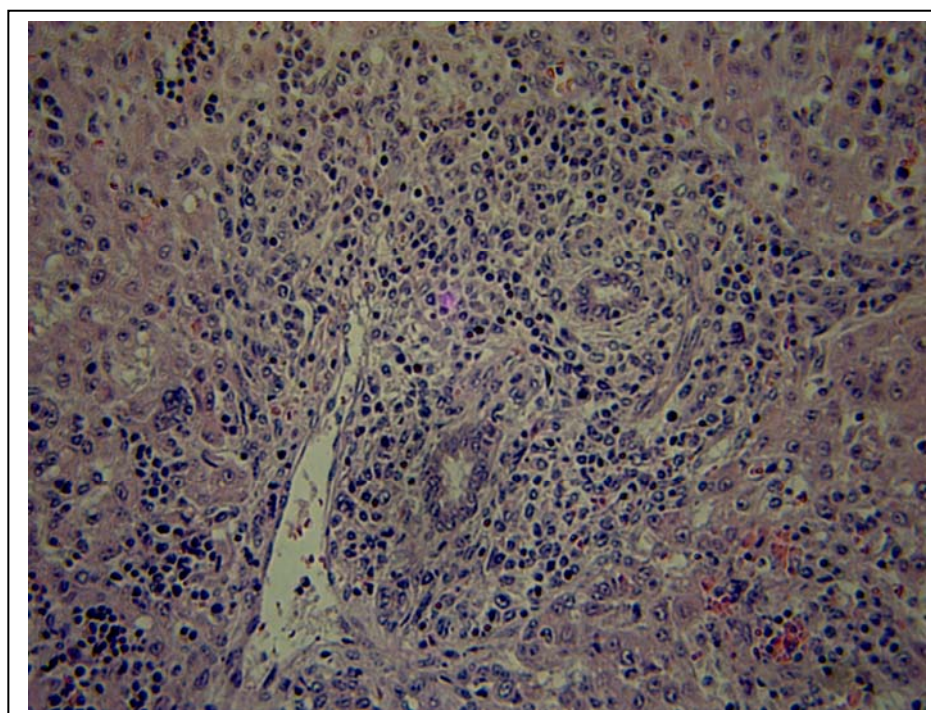


Figura 3 – Hepatite sugestiva de infecção por protozoários em feto zebuino. Infiltrado inflamatório mononuclear periportal acentuado em fígado de um feto de cinco meses de idade. HE, 100x.

Nas 90 amostras restantes, as lesões foram descritas como "consistente com" e formadas por encefalite multifocal não-supurativa, caracterizada pela presença de focos de microgliose espalhados pelo parênquima cerebral (Figura 4), freqüentemente na proximidade dos vasos sanguíneos. No coração e fígado as lesões consistiram em miocardite não-supurativa e hepatite não-supurativa.

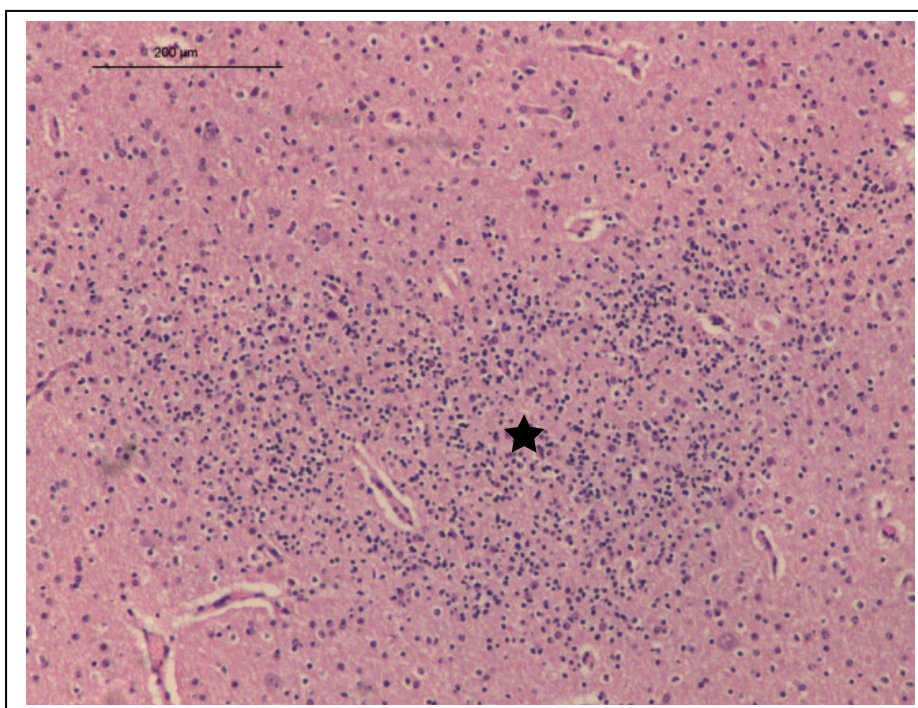


Figura 4 – Encefalite sugestiva de infecção por protozoários em feto zebuino. Gliose focal moderada em encéfalo de um feto de oito meses de idade (estrela). HE, 200x.

Não houve diferença entre o achado de lesões características ou consistentes com *N. caninum* no cérebro e coração ($p > 0,05$). Entre cérebro e fígado e coração e fígado a diferença foi significativa ($p < 0,001$).

Nenhuma forma parasitária de *N. caninum*, associada ou não às lesões, foi identificada nos tecidos por meio do método histopatológico aplicado.

Detecção do DNA parasitário em cérebro, coração e fígado

DNA de *N. caninum* foi detectado em 20,51% (40/195) dos fetos bovinos estudados. A distribuição dos fetos PCR positivos de acordo com o período gestacional está representada na Figura 5.

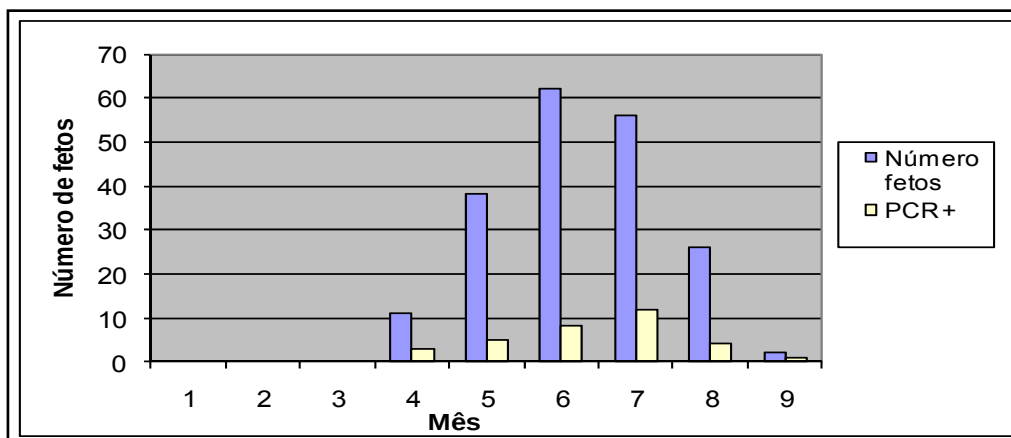


Figura 5 - Distribuição de fetos segundo período gestacional, apresentando resultados positivos ao PCR para *Neospora caninum*.

Das 585 amostras de tecido, 44 (7,52%) foram positivas na PCR, compostas por 35 (79,55%) de cérebro, sete (15,90%) de coração e duas (4,55%) de fígado. Trinta e um fetos foram DNA positivos somente em cérebro, três em coração e dois em fígado. Quatro fetos foram positivos simultaneamente em cérebro e coração, não sendo detectada a presença simultânea de DNA parasitário em tecidos de coração e fígado, cérebro e fígado ou nos três órgãos de um mesmo animal.

Houve diferença significativa ($p < 0,001$) entre a detecção de DNA parasitário no cérebro, quando comparado com coração ou fígado. Já quando comparados coração e fígado, essa diferença não foi observada ($p > 0,05$).

Comparação entre técnicas utilizadas

Dos fetos estudados 93 (47,69%) apresentaram lesões e/ou foram positivos na PCR em pelo menos um dos órgãos analisados (Tabela 2).

Tabela 2 - Presença de lesões histopatológicas e resultados da PCR para *Neospora caninum*, em relação à idade gestacional, em 195 fetos obtidos de vacas zebuínas, em Goiás.

Idade gestacional (meses)	Número de fetos			Total
	Histopatologia (presença de lesões)	PCR (+)	Histopatologia (presença de lesões) e PCR (+)	
4	3	2	1	6
5	8	3	5	16
6	19	0	7	26
7	16	4	10	30
8	7	1	6	14
9	0	1	0	1
Total	53	11	29	93

O valor K obtido na comparação entre os resultados da PCR e de histopatologia para fetos foi de 0,276, sendo, portanto, considerado como concordância baixa.

Entre as 52 amostras de cérebro, 42 de coração e seis de fígado que apresentaram lesões (Tabela 3), apenas 12 (23,07%), seis (14,28%) e uma (16,67%) foram também positivas pela PCR, respectivamente. Das amostras que não apresentaram lesão, 16,08% (23/143), 0,65% (1/153) e 0,53% (1/189) foram PCR positivo em cérebro, coração e fígado, respectivamente.

Na comparação entre as técnicas utilizadas em relação aos órgãos, os valores de K variaram de 0,078, para PCR e histopatologia de cérebro, a 0,238 para PCR e histopatologia de fígado.

Tabela 3 - Lesões histopatológicas e resultado da PCR para *Neospora caninum*, em órgãos de 195 fetos obtidos de vacas zebuínas, de acordo com o período gestacional, Goiás.

Órgãos	Técnica diagnóstica			
	Histopatologia (presença de lesões)		PCR (+)	
	Terço gestacional		Terço gestacional	
	segundo (n, %) n=52	terceiro (n, %) n=48	segundo (n, %) n=20	terceiro (n, %) n=24
Cérebro	23 (44,0)	15 (31,3)	13 (65,0)	18 (75,0)
Coração	12 (23,1)	15 (31,3)	2 (10,0)	1 (4,2)
Fígado	1 (1,9)	—	1 (5,0)	1 (4,2)
Cérebro, Coração e Fígado	2 (3,8)	—	—	—
Cérebro e Coração	4 (7,7)	7 (14,6)	2 (10,0)	2 (8,5)
Cérebro e Fígado	—	1 (2,1)	—	—
Coração e Fígado	1 (1,9)	1 (2,1)	—	—

Discussão

No presente estudo a ocorrência da transmissão vertical em zebuínos foi baseada na identificação de lesões histopatológicas sugestivas de infecção por protozoários e na detecção do DNA de *N. caninum* pela *nested*-PCR em tecidos de fetos não abortados.

Em geral, observam-se diferenças importantes entre as taxas de positividade obtidas em diversos países, em rebanhos de aptidão de leite e de corte e em manejos de criação intensivo e extensivo. Os resultados obtidos fazem parte da análise de um tipo amostral distinto do que se tem em literatura, pois a maioria dos dados disponíveis para *N. caninum* se referem a criações leiteiras de animais *Bos taurus* e a fetos abortados, o que faz com que a discussão muitas vezes não compare as mesmas informações.

Segundo WOUDE et al. (1997), o diagnóstico sugestivo de neosporose bovina pode ser feito com base nas lesões histopatológicas como a encefalite, miocardite e hepatite. Embora não patognomônicas, essas alterações têm sido

relacionadas à infecção aguda, sendo consideradas indicativas de infecção por *N. caninum* em fetos abortados (BARR et al., 1991, 1994; WOUDA et al., 1997; GONZÁLEZ et al., 1999; PEREIRA-BUENO et al., 2003; COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006; CORBELLINI et al., 2006; PESCADOR et al., 2007).

Os resultados dos exames histopatológicos obtidos nesse estudo indicaram inflamação severa. Em ordem de apresentação, as lesões observadas corresponderam a danos nos tecidos cerebral, cardíaco e hepático, fato também observado por COLLANTES-FERNÁNDEZ et al. (2006) e CABRAL et al. (2009) em fetos abortados. PESCADOR et al. (2007) obtiveram lesões inflamatórias sugestivas de infecção por protozoários, com maior frequência nos músculos esqueléticos, coração, pulmão e cérebro, com um envolvimento secundário do fígado e rim, ao examinarem também fetos abortados, corroborando a citação de KIM et al. (2002) sobre o fígado ser o órgão menos severamente afetado.

Em bovinos de corte, principalmente *Bos indicus*, a presença de *N. caninum* tem sido pouco estudada (MELO et al., 2006). Fato é que as lesões histopatológicas são mais frequentemente relatadas em fetos de gado de leite (DE MEERSCHMAN et al., 2002), provavelmente por se observar maior prevalência da enfermidade neste tipo de sistema de produção (QUINTANILLA-GOZALO et al., 1999; MOORE et al., 2009).

A porcentagem de fetos com lesões sugestivas de neosporose obtida neste estudo (42,05%) foi superior à encontrada, em fetos bovinos abortados de fêmeas de leite, por WOUDA et al. (1997) nos Países Baixos (17%), MORALES et al. (2001) no México (34,6%), SONDGREN et al. (2001) na Alemanha (12,6%), KIM et al. (2002) na Coreia (25%), MOORE et al. (2002) na Argentina (22,8%), PEREIRA-BUENO et al. (2003) na Espanha (31,3%) e RAZMI et al. (2007) no Irã (22%). No Brasil, essa taxa também foi superior à registrada por CORBELLINI et al. (2006) (23%), com fetos bovinos abortados provenientes, na sua maioria, de rebanhos leiteiros, e por PESCADOR et al. (2007) (34%).

No entanto, todos eles tiveram seus resultados histopatológicos confirmados, seja por IHQ, PCR, sorologia ou ainda a associação entre as técnicas. Apesar de o exame histopatológico ser utilizado como técnica de referência (BASZLER et al., 1999), a evidência da infecção pelo parasita por uma das outras técnicas citadas é necessária, pois outros protozoários (*Toxoplasma*

gondii e *Sarcocystis* spp.) podem causar lesões semelhantes (JENKINS et al., 2002; PEREIRA-BUENO et al., 2003), o que justifica a alta taxa de resultados sugestivos de neosporose aqui encontrados.

É importante ainda considerar que são três as principais categorias de agentes infecciosos (protozoários, bactérias e vírus) que podem apresentar achados histopatológicos semelhantes (JAMALUDDIN et al., 1996). As alterações histopatológicas apresentadas pelos fetos podem então ser similares em caráter e distribuição com infecções causadas por bactérias dos gêneros *Brucella*, *Leptospira*, *Ureaplasma* e outras que também ocorrem em Goiás.

O uso de uma variedade de protocolos de PCR no diagnóstico da neosporose fetal tem sido testado por diversos autores no Brasil e no mundo desde 1996. Genes como Nc5, 18S rDNA, 28S rDNA, ITS1 e 14-3-3 têm sido usados como sequências alvo na detecção de *N. caninum* (YAO et al., 2009).

Assim como no presente estudo foi utilizada a técnica de *nested*-PCR, com detecção de DNA parasitário em 20,51% dos fetos não abortados com infecção natural, outros autores, como PEREIRA-BUENO et al. (2003), COLLANTES-FERNÁNDEZ et al. (2006), MOORE et al. (2008), CABRAL et al. (2009) e YAO et al. (2009) também a utilizaram para fetos abortados, obtendo resultados positivos.

O protocolo de BUXTON et al. (1998), baseado na região ITS-1 do DNA ribossomal, foi testado por PEREIRA-BUENO et al. (2003) em fetos *Bos taurus*, na sua maioria provenientes de fêmeas de leite da Espanha, verificando uma taxa de 15,3%, portanto inferior ao detectado no presente trabalho. Também CABRAL et al. (2009) e SANTOS et al. (2010), detectaram pela amplificação da região ITS-1 do DNA de *N. caninum* em fetos no Brasil, percentuais de 6,7 e 5%, provando a técnica em fetos zebuínos e cruzados não abortados, provenientes de fêmeas abatidas.

Por PCR simples, examinando tecidos de fetos taurinos abortados, RAZMI et al. (2007) verificaram 13% de positividade; PITEL et al. (2001), SAGER et al. (2001), SÖNDGEN et al. (2001) e KIM et al. (2002), obtiveram taxas em torno de 21%, similar ao percentual apresentado neste trabalho, e GOTTSTEIN et al. (1998), por sua vez, obtiveram percentual mais alto (29%).

No Brasil, também testando fetos zebuínos não abortados, VIANNA et al. (2008), não obtiveram nenhuma amostra positiva pela PCR. Pode-se inferir que essa ausência de fetos positivos se deva a fatores inerentes à distribuição focal do parasito, à qualidade do material analisado, ou ainda à conservação do mesmo, porque para SAGER et al. (2001) a técnica da PCR deve ser considerada altamente específica e sensível para detecção de *N. caninum*.

O cérebro foi a amostra de tecido onde mais se observaram resultados positivos à PCR, concordando com GOTTSTEIN et al. (1998), BASZLER et al. (1999), GONZÁLEZ et al. (1999), KIM et al. (2002), PEREIRA-BUENO et al. (2003), COLLANTES-FERNÁNDEZ et al. (2006), CABRAL et al. (2009) e YAO et al. (2009), os quais adotaram o cérebro fetal como órgão de referência em seus estudos. Reforçando este achado, SANTOS et al. (2010) não obtiveram resultado positivo amplificado a partir das análises em coração, assim como YAO et al. (2009) não verificaram positividade no fígado. De acordo com INNES et al. (2001), a detecção do DNA parasitário no sistema nervoso central pode ser explicada pelo baixo nível de infecção *in utero*, insuficiente para estimular a resposta imune, ou simplesmente porque o feto se tornou imunotolerante a *N. caninum*, o que é comum dependendo do estágio gestacional.

No entanto, para MORALES et al. (2001) a frequência de detecção de DNA de *N. caninum* foi maior no coração do que no cérebro, enquanto que para MOORE et al. (2008), o fígado apresentou mais resultados PCR positivos.

Para evitar que a ocorrência da neosporose fetal na avaliação da transmissão vertical em zebuínos seja superestimada, os resultados dos métodos utilizados devem ser interpretados cuidadosamente, uma vez que o exame histopatológico é sugestivo não só de infecção por protozoários, mas também de infecções bacterianas, devendo então ser confirmado por provas específicas e sensíveis (JENKINS et al., 2002).

Portanto, não se pode considerar a histopatologia como método específico e definitivo. Do percentual de 42,05% de fetos com lesões consistentes ou características, apenas 35,37% (29/82) tiveram outra indicação de infecção por *N. caninum* pela técnica de PCR. Com base na afirmação de WOUDA et al. (1997), em que a encefalite multifocal combinada a danos cardíacos e hepáticos são fortemente sugestivos de neosporose bovina fetal, os achados aqui

observados com este quadro lesional foram verificados em quatro animais, os quais realmente eram PCR positivos, três deles simultaneamente no cérebro e coração.

Somando-se a essa porcentagem o número de positivos também pela RIFI, detectado por FERNANDES et al. (dados não publicados) nos mesmos animais seriam obtidos 33 (40,24%) fetos com lesões histopatológicas sugestivas confirmadas pela PCR e/ou pela RIFI.

Por outro lado, resultados histopatológicos apresentando lesões características de neosporose não devem ser descartados como indicativos de infecção aguda por *N. caninum*, uma vez que a PCR pode apresentar resultados negativos por baixa carga parasitária associada à distribuição focal do parasito (SAGER et al., 2001), não permitindo a detecção de DNA. Sob o mesmo aspecto, a RIFI pode também resultar na não detecção de anticorpos anti-*N. caninum*, pela influência da idade fetal com conseqüente imaturidade imunológica do animal, fazendo com que não haja a produção de anticorpos específicos.

Diferentemente de RAZMI et al. (2007), os quais encontraram boa correlação entre a PCR e o histopatológico, nos 93 fetos não-abortados com resultados sugestivos pela histopatologia e positivos pela PCR, não foi observada concordância entre essas duas técnicas, concordante com os resultados obtidos por PEREIRA-BUENO et al. (2003).

Segundo SAGER et al. (2001) e CABRAL et al. (2009), fatores referentes ao momento da colheita das amostras podem contribuir para a falta de correspondência entre essas técnicas. Quando os fragmentos dos órgãos são retirados, um para histopatologia e outro para biologia molecular, o parasito e as lesões podem não estar presentes em ambas as porções justamente pela distribuição focal do mesmo.

Entretanto, se propusesse a execução da técnica histopatológica a partir das amostras PCR positivas, obter-se-ia alta correlação (72,5%) entre essas técnicas, próxima aos achados de GOTTSTEIN et al. (1998) (75%) e SAGER et al. (2001) (84%) em fetos taurinos de fêmeas de aptidão leiteira. Portanto, ao invés de confirmar o exame histopatológico com a análise molecular, complementaríamos o resultado da PCR com a histopatologia, reforçando o diagnóstico.

Onze fetos foram *nested*-PCR positivos, com a idade variando entre quatro e nove meses (dois aos quatro meses, três aos cinco meses, quatro aos sete meses, um aos oito meses e um aos nove meses), sem a manifestação de qualquer tipo de lesão, provavelmente devido à interrupção da gestação pelo abate durante a fase aguda da infecção.

Conclusão

Pode-se assumir que, pela amplificação do DNA de *N. caninum* e pela presença das lesões histopatológicas, mesmo que consistentes com achados de outras infecções, *N. caninum* está presente em fetos zebuínos e que a associação de técnicas de diagnóstico da neosporose fetal se faz necessária. O cérebro foi o principal órgão para diagnóstico da infecção, seguido do coração e fígado, independente do trimestre gestacional.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Antonio Rodríguez-Bertos (Faculdade de Ciências Veterinárias da Universidad Complutense de Madrid), à Dra. Aline Carvalho Batista e ao técnico Erildo Ribeiro da Silva (Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, Laboratório de Patologia Bucal), e à Dra. Marina Pacheco Miguel pela ajuda técnica no preparo e leitura das lâminas. Este trabalho foi financiado pelo Programa de Cooperação Internacional CAPES/MECD Espanha.

Referências

1. AGUIAR, D. M., CAVALCANTE, G. T., RODRIGUES, A., A., LABRUNA, M. B., CAMARGO, L. M., CAMARGO, E. P., GENNARI, S. M. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in

association with some possible risk factors. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 142, n. 1-2, p. 71-77, nov. 2006.

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

3. ANDREOTTI, R., PINCKNEY, R. D., PIRES, P. P., SILVA, E. A. E. Evidence of *Neospora caninum* in beef cattle and dogs in the state of Mato Grosso do Sul, Center-Western Region, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 13, n. 3, p. 129-131, 2004.

4. ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: FNP, 2008. 385p.

5. BARLING, K. S., MCNEILL, J. W., THOMPSON, J. A., PASCHAL, J. C., MCCOLLUM, F. T., CRAIG, T. M., ADAMS, L. G. Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 217, n. 9, p. 1356-1360, nov. 2000.

6. BARR, B. C., ANDERSON, M. L., DUBEY, J. P., CONRAD, P. A. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. **Veterinary Pathology**, New York, v. 28, n. 2, p. 110-116, mar. 1991.

7. BARR, B. C., ROWE, J. D., SVERLOW, K. W., BONDURANT, R. H., ARDANS, A. A., OLIVER, M. N., CONRAD, P. A. Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 6, n. 2, p. 207-215, abr. 1994.

8. BASZLER, T. V., GAY, L. J. C., LONG, M. T., MATHISON, B. A. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 12, p. 4059-4064, dez. 1999.

9. 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**, London, v. 118, n. 4, p. 267-279, mai. 1998.

10. CABRAL, A. D., CAMARGO, C. N., GALLETI, N. T. C., OKUDA, L. H., PITUCO, E. M., DEL FAVA, C. Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histology, immunohistochemistry, and nested-PCR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 4, p. 14-19, out.-dez. 2009.

11. CAMPERO, C. M., ANDERSON, M. L., CONOSCIUTO, G., ODRIOZOLA, H., BRETSCHNEIDER, G., POSO, M. A. *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in Argentina. **Veterinary Record**, London, v. 143, n. 8, p. 228-229, ago. 1998.

12. COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., RODRÍGUEZ-BERTOS, A., ARNÁIZ-SECO, I., MORENO-BURGOS, B., ADURIZ, G., ORTEGA-MORA, L. Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine foetuses. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, n. 3, p. 629-641, fev. 2006.

13. CORBELLINI, L. G., DRIEMEIER, D., CRUZ, C. F. E., GONDIM, L. F. P., WALD, W. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 103, n. 3, p. 195-202, jan. 2002.

14. 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**, London, v. 172, n. 1, p. 114-120, jul. 2006.

15. DE MEERSCHMAN, F., SPEYBROECK, N., BERKVEN, D., RETTIGNER, C., FOCANT, C., LECLIPTEUX, T., CASSART, D., LOSSON, B. Fetal infection with

Neospora caninum in dairy and beef cattle in Belgium. **Theriogenology**, Stoneham, v. 58, n. 5, p. 933-945, set. 2002.

16.DE MELO, C. B., LEITE, R. C., LOBATO, Z. I., LEITE, R. C.. Infection by *Neospora caninum* associated with bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhea virus in cattle from Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 119, n. 2-3, p. 97-105, jan. 2004.

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

18.DUBEY, J. P., BUXTON, D., WOUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 134, n. 4, p. 267-289, mai. 2006.

19.DUBEY, J. P., SCHARES, G., ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 20, n. 2, p. 323-367, abr. 2007.

20.FERNANDES, P. R., COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., ORTEGA-MORA, L. M., GUIMARÃES, M. S., BORGES, L. M. F., SILVA, A. C. Detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in fetal fluids from slaughtered zebu cattle in Goiás, Brazil. **Artigo enviado**.

21.GONDIN, L. F., SARTOR, I. F., HASEGAWA, M., YAMANE, I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 71-75, set. 1999.

22.GONZÁLEZ, L., BUXTON, D., ATXAERANDIO, R., ADURIZ, G., MALEY, S., MARCO, J. C., CUERVO, L. A. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. **Veterinary Record**, London, v. 144, n. 6, p. 145-150, fev. 1999.

23.GOTTSTEIN. B., HENTRICH, B., WYSS, R., THÜR, B., BUSATO, A., STÄRK, K. D., MÜLLER, N. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 679-691, abr. 1998.

24.GUEDES, M. H., GUIMARÃES, A. M., ROCHA, C. M., HIRSCH, C. Frequency of anti-*Neospora caninum* antibodies in cows and fetuses from Municipalities of southern Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Belo Horizonte, v. 17, n. 4, p. 189-194, out-dez. 2008.

25.GUIMARÃES, J. S. J., SOUZA, S. L., BERGAMASCHI, D. P., GENNARI, S. M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 124, n. 1-2, p. 1-8, set. 2004.

26.HELMAN, R. G., STAIR, E. L., LEHENBAUER, T. W., RODGERS, S., SALIKI, J. T. Neosporal abortion in Oklahoma cattle with emphasis on the distribution of brain lesions in aborted fetuses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 10, n. 3, p. 292-295, jul. 1998.

27.HUBBERT, W. T., STALHEIM, O. H., BOOTH, G. D. Changes in organ weights and fluid volumes during growth of the bovine fetus. **Growth**, Philadelphia, v. 36, n. 3, p. 217-233, set. 1972.

28.IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: out. 2009.

29.INNES, E. A., WRIGHTA, S. E., MALEYA, S., RAEA, A., SCHOCKA, A., KIRVARA, E., BARTLEYA, P., HAMILTONA, C., CAREYB, I. M., BUXTON, D. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 31, n. 13, p. 1523-1534, nov. 2001.

30. JAMALUDDIN, A. A., CASE, J. T., HIRD, D. W., BLANCHARD, P. C., PEAUROI, J. R., ANDERSON, M. L. Dairy cattle abortion in California: evaluation of diagnostic laboratory data. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 8, n. 2, p. 210-218, abr. 1996.

31. JENKINS, M., BASZLER, T., BJÖRKMAN, C., SCHARES, G., WILLIAMS, D. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 631-636, mai. 2002.

32. KASHIWAZAKI, Y., GIANNEECHINI, R. E., LUST, M., GIL, J. Seroepidemiology of neosporosis in dairy cattle in Uruguay. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 120, n. 1-2, p. 139-144, fev. 2004.

33. KIM, J. H., LEE, J. K., LEE, B. C., PARK, B. K., YOO, H. S., HWANG, W. S., SHIN, N. R., KANG, M. S., JEAN, Y. H., YOON, H. J., KANG, S. K., KIM, D. Y. Diagnostic survey of bovine abortion in Korea: with special emphasis on *Neospora caninum*. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 64, n. 12, p. 1123-1127, dez. 2002.

34. LANDIS, J. R., KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, p. 159-174, 1977.

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

36. 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**, Belo Horizonte, v. 15, n. 3, p. 105-109, 2006.

- 37.MINEO, T. W., ALENIUS, S., NÄSLUND, K., MONTASSIER, H. J., BJÖRKMAN, C. Distribution of antibodies against *Neospora caninum*, BVDV and BHV-1 among cows in Brazilian dairy herds with reproductive disorders. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Belo Horizonte, v. 15, n. 4, p. 188-192, out-dez. 2006.
- 38.MINERVINO, A. H., RAGOZO, A. M., MONTEIRO, R. M., ORTOLANI, E. L., GENNARI, S. M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle from Santarém, Pará, Brazil. **Research in Veterinary Science**, London, v. 84, n. 2, p. 254-256, abr. 2008.
- 39.MOORE, D. P., CAMPERO, C. M., ODEÓN, A. C., POSSO, M. A., CANO, D., LEUNDA, M. R., BASSO, W., VENTURINI, M. C., SPÄTH, E. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 107, n. 4, p. 303-316, ago. 2002.
- 40.MOORE, D. P., CAMPERO, C. M., ODEÓN, A. C., CHAYER, R., BIANCO, M. A. Reproductive losses due to *Neospora caninum* in a beef herd in Argentina. **Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, Berlim, v. 6, n. 304-308, ago. 2003.
- 41.MOORE, D. P. Neosporosis in South America. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 127, n. 2, p. 87-97, jan. 2005.
- 42.MOORE, D. P., REGIDOR-CERRILLO, J., MORRELL, E., POSO, M. A., CANO, D. B., LEUNDA, M. R., LINSCHINKY, L., ODEÓN, A. C., ODRIOZOLA, E., ORTEGA-MORA, L. M., CAMPERO, C. M. The role of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in spontaneous bovine abortion in Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 156, n. 3-4, p. 163-167, out. 2008.

43. MOORE, D. P., PÉREZ, A., AGLIANO, S., BRACE, M., CANTÓN, G., CANO, D., LEUNDA, M. R., ODEÓN, A. C., ODRIÓZOLA E., CAMPERO, C. M. Risk factors associated with *Neospora caninum* infections in cattle in Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 161, n. 1-2, p. 122-125, abr. 2009.
44. MORALES, E., TRIGO, F. J., IBARRA, F., PUENTE, E., SANTACRUZ, M. Neosporosis in Mexican dairy herds: lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 125, n. 1, p. 58-63, jul. 2001.
45. MUNHOZ, A. D., FLAUSINO, W., SILVA, R. T., ALMEIDA, C. R., LOPES, C. W. Distribution of anti-*Neospora caninum* antibodies in dairy cows at Municipalities of Resende and Rio Claro in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Belo Horizonte, v. 15, n. 3, p. 101-104, jul-set. 2006.
46. OSAWA, T., WASTLING, J., ACOSTA, L., ORTELLADO, C., IBARRA, J., INNES, E. A. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Paraguay. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 110, n. 1-2, p. 17-23, dez. 2002.
47. OSHIRO, L. M., MATOS, M. F., DE OLIVEIRA, J. M., MONTEIRO, L. A., ANDREOTTI, R. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Belo Horizonte, v. 16, n. 3, p. 133-138, jul-set. 2007.
48. OTRANTO, D., LLAZARI, A., TESTINI, G., TRAVERSA, D., FRANGIPANE DI REGALBONO, A., BADAN, M., CAPELLI, G. Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 118, n. 1-2, p. 7-18, dez. 2003.
49. PATITUCCI, A. N., CHARLESTON, W. A., ALLEY, M. R., O'CONNOR, R. J., POMROY, W. E. Serological study of a dairy herd with a recent history of

Neospora abortion. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 47, n. 1, p. 28-30, fev. 1999.

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

51.PESCADOR, C. A., CORBELLINI, L. G., OLIVEIRA, E. C., RAYMUNDO, D. L., DRIEMEIER, D. Histopathological and immunohistochemical aspects of *Neospora caninum* diagnosis in bovine aborted fetuses. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 150, n. 1-2, p. 159-163, nov. 2007.

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

53. QUINTANILLA-GOZALO, A., PEREIRA-BUENO, J., TABARÉS, E.; INNES, E. A.; GONZÁLEZ-PANIELLO, R.; ORTEGA-MORA, L. M. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 8, p. 1201-1208, ago. 1999.

54.RAZMI, G. R., MALEKI, M., FARZANEH, N., TALEBKHAN GAROUSSI, M., FALLAH, A. H. First report of *Neospora caninum*-associated bovine abortion in Mashhad area, Iran. **Parasitology Research**, Berlim, v. 100, n. 4, p. 755-757, mar. 2007.

55.SAGER, H., FISCHER, I., FURRER, K., STRASSER, M., WALDVOGEL, A., BOERLIN, P., AUDIGÉ, L., GOTTSTEIN, B. A Swiss case-control study to assess

Neospora caninum-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 102, n.1-2, p. 1-15, dez. 2001.

56.SANDERSON, M. W., GAY, J. M., BASZLER, T. V. *Neospora caninum* seroprevalencia and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 90, n. 1-2, p. 15-24, jun. 2000.

57.SANTOS, S. L., COSTA, K. S., GONDIM, L. Q., DA SILVA, M. S. A., UZÊDA, R. S., ABE-SANDES, K., GONDIM, L. F. Investigation of *Neospora caninum*, *Hammondia* sp., and *Toxoplasma gondii* in tissues from slaughtered beef cattle in Bahia, Brazil. **Parasitology Research**, Berlim, v. 106, n. 2, p. 457-461, jan. 2010.

58.SÖNDGEN, P., PETERS, M., BÄRWALD, A., WURM, R., HOLLING, F., CONRATHS, F. J., SCHARES, G. Bovine neosporosis: immunoblot improves foetal serology. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 102, n. 4, p. 279-290, dez. 2001.

59.STÅHL, K., BJÖRKMAN, C., EMANUELSON, U., RIVERA, H., ZELADA, A., MORENO-LÓPEZ, J. A prospective study of the effect of *Neospora caninum* and BVDV infections on bovine abortions in a dairy herd in Arequipa, Peru. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 75, n. 3-4, p. 177-188, ago. 2006.

60.THURMOND, M. C., ANDERSON, M. L., BLANCHARD, P. C. Secular and seasonal trends of *Neospora* abortion in California dairy cows. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 81, n. 3, p. 364-367, jun. 1995.

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

62.VIANNA L. C., SARTOR, I. F., PITUCO, E. M., OKUDA, L. H., CAMARGO, C. N., KRONKA, S. N. Incidence and transplacental transmission of *Neospora caninum* in primiparous females from *Bos indicus* slaughtered in Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 387-92, 2008.

63.WOUDA, W., MOEN, A. R., VISSER, I. J. R., VAN KNAPEN, F. Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 9, n. 2, p. 180-185, abr. 1997.

64.YAO, L., YANG, N., LIU, Q., WANG, M., ZHANG, W., QIAN, W. F., HU, Y. F., DING, J. Detection of *Neospora caninum* in aborted bovine fetuses and dam blood samples by nested PCR and ELISA and seroprevalence in Beijing and Tianjin, China. **Parasitology**, Oxford, v. 136, n. 11, p. 1251–1256, ago. 2009.

CAPÍTULO 4: Genetic characterization of *Neospora caninum* isolates from clinical samples of zebuine fetuses obtained in abattoirs in Goiás, Brazil

Genetic characterization of *Neospora caninum* isolates from clinical samples of zebuine fetuses obtained in abattoirs in Goiás, Brazil

Abstract

The *Neospora caninum* microsatellite markers were applied to clinical samples. Genotyping technology by fluorescently labelled DNA fragment analysis was used in combination with DNA sequencing for those markers which complex repetitive sequences. Nineteen DNA samples from 15 brains, and four hearts of naturally infected non-aborted zebuine fetuses from abattoirs in Goiás, Brazil, where *N. caninum* had been detected by nested-PCR of the ITS1 rRNA region, were analyzed using these microsatellites. Seven complete, or almost complete allele profiles were obtained from six fetuses. In a unique microregion (Meia Ponte) of Goiás, three distinct profiles of *N. caninum* may be identified, with two alleles for the same marker detected in a unique fetus, probably infected with two different strains. A new allele was described for one of the microsatellites. The multilocus analysis performed here showed a preliminary discriminate between individual isolates according to their geographical origin. These are the first results obtained for the molecular characterization of isolates of *N. caninum* from infected zebuine fetuses in South America, revealing for the first time that there are genotype differences on isolates responsible by fetal transmission in zebuine fetuses.

KEY WORDS: *Bos indicus*, Microsatellites, Multilocus genotyping, Neosporosis

Introduction

Neospora caninum is a protozoan of the phylum Apicomplexa that has emerged as the major diagnosed cause of abortion in dairy cattle (DUBEY et al., 2007), and probably in zebuine cows too (VIANNA et al., 2008). It is widely accepted that neosporosis is maintained in the herd primarily by repeated transplacental transmission, nevertheless neosporosis maybe transmitted to

intermediate hosts by consumption of oocysts shed by definitive host (horizontal transmission) (DUBEY et al., 2007).

Different factors affect the outcome of bovine neosporosis during the pregnancy, including the quantity and duration of parasitemy, the gestation age of fetal infection, the effectiveness of the fetal immune response against the parasite and, additionally the virulence of *N. caninum* isolates implicated with infection (INNES et al. 2005; COLLANTES-FERNÁNDEZ et al. 2006; DUBEY et al. 2006; ROJO-MONTEJO et al., 2009a).

The global distribution and broad host range of the parasites, together with their capacity for sexual reproduction, suggest significant biological and genetic diversity in *N. caninum*. The biological diversity has been reported among some isolates in their capacity to produce pathology using experimental murine (LINDSAY et al., 1995; ATKINSON et al., 1999; COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006) and in bovine infections (ROJO-MONTEJO et al., 2009a), as well as in their behavior in *in vitro* studies (SCHOCK et al., 2001; PEREZ-ZABALLOS et al., 2005; ROJO-MONTEJO et al., 2009b).

Genetic diversity in *N. caninum* have been also demonstrated employing different molecular techniques and genetical markers (ATKINSON et al., 1999; SCHOCK et al., 2001; GONDIM et al., 2004; REGIDOR-CERRILLO et al., 2006; BECK et al., 2009; PEDRAZA-DÍAZ et al., 2009).

Random Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR) and sequence analysis of rDNA internal transcribed spacer 1 (ITS-1) regions have been used to demonstrate intraspecies genetic diversity of *N. caninum* (ATKINSON et al., 1999; SPENCER et al., 2000; SCHOCK et al., 2001; GONDIM et al., 2004). However, these techniques employ as markers genomic regions that are insufficiently polymorphic to differentiate between *N. caninum* isolates, and with some limitations, for a broad use in field studies, like the inconvenience of the influence of exogenous DNA at least with RAPD-PCR, being more applicable for cultured parasites.

Microsatellite sequences have showed to be the most suitable polymorphic markers for typing of *N. caninum* isolates, having been applied to genetic characterization in a set of isolates obtained from cattle and canine worldwide with the demonstration of an extensive intra-species diversity

(REGIDOR-CERRILLO et al., 2006, 2008; AL-QASSAB et al., 2009; BASSO et al., 2009a,b; GARCÍA-MELO et al., 2009; PEDRAZA-DÍAZ et al., 2009; ROJO-MONTEJO et al., 2009b).

Also called simple sequence repeats (SSRs), these markers are repetitive short DNA sequences (2-6 base pair), stable *in vivo* and *in vitro* passages (REGIDOR-CERRILLO et al., 2008; BASSO et al., 2009a,b; GARCÍA-MELO et al., 2009; ROJO-MONTEJO et al. 2009a), that are ubiquitously distributed in the genome of eukaryotic and prokaryotic organisms, containing tandem repeats of this DNA motif, with extensive polymorphism in sequence and length (AL-QASSAB et al., 2009). They can be found both in protein-coding and non-coding regions, presenting this high polymorphism due to the allelic repeat length variation more likely to mutate than protein-coding sequences (BASSO et al., 2009b).

This way, REGIDOR-CERRILLO et al. (2006) had examined nine *in vitro*-grown *N. caninum* isolates by multilocus microsatellite analysis and described 12 polymorphic microsatellite loci for *N. caninum* that exhibited three to nine separate alleles. The microsatellite markers can be easily typed by molecular DNA-techniques, including PCR amplification, fragment analysis or sequencing. Furthermore, microsatellite analysis has been improved and these markers have been used to genetic characterization of *N. caninum* from healthy and clinically infected animals (REGIDOR-CERRILLO et al., 2008; BASSO et al., 2009a,b; PEDRAZA-DÍAZ et al., 2009).

This method may prove useful for the identification of infection sources in molecular epidemiological studies and circulation of isolates in a delimited region. Estimates can be made of the allele frequencies within populations, and comparison of the profiles obtained in different farms, regions and countries, could be studied providing information on the genetic relatedness of geographically separated parasite populations, and allow estimation of the gene flow between them (OURA et al., 2003).

Moreover the diagnosis, the genetic characterization and discrimination of different *N. caninum* isolates maybe central to the prevention, surveillance and apply of suitable control measures for bovine neosporosis, particularly given that

currently there is no broadly applicable treatment regimen for apicomplexan diseases (BECK et al., 2009).

Nevertheless, detailed information about the genetic diversity among different geographical isolates of *N. caninum* is scant (AL-QASSAB et al., 2009). Further molecular-epidemiological studies are needed to understand the population structure of this parasite, the circulation of different genotypes across the world on evolution of *N. caninum*, and how genetic diversity influences the epidemiology, clinical presentation and pathogenicity in neosporosis.

New information could be provided by the analysis of *N. caninum* isolates from infected but non-aborted fetuses, necessary to determine the actual genetic diversity of this parasite as it was proposed for aborted fetuses by PEDRAZA-DÍAZ et al. (2009).

Here, we report the genetic analysis of *N. caninum* isolates from clinical samples of zebuine (*Bos indicus*) fetuses naturally infected by vertical transmission.

Materials and Methods

Sample collection

Samples were obtained from dead zebuine fetuses *Bos indicus* at a local commercial slaughterhouse of Goiás from April to August 2006. Data of the location of the lots of fetuses were recorded.

During the slaughtering, a total of 195 fetuses were obtained, 585 fresh different sections from brain, heart and liver were collected of which and stored at -80 °C until DNA extraction.

DNA extraction and ITS-1 PCR amplification

DNA was prepared from 20 mg of bovine tissues using a commercially available kit (Real Pure, Durviz, Patema, Spain) according to the manufacturer's

instructions. The concentration of DNA was determined by spectrophotometric analysis at A260 / 280 and all DNA samples were adjusted to a final concentration of 60 ng/mL. DNA samples were stored at -20 °C until PCR analysis.

Detection of *N. caninum* DNA in samples obtained from bovine tissues was carried out by a specific nested-PCR amplification of internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequence using the oligonucleotides described by BUXTON et al. (1998). Secondary amplification product of 213 base-pairs (bp.) was visualized by 1.8% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. To avoid false positive reactions, DNA extraction, PCR sample preparation and electrophoresis were performed in separate rooms with different sets of instruments and aerosol barrier tips and disposable gloves were employed. Positive and negative controls, respectively the DNA from *N. caninum* tachyzoites maintained in cell cultures and ultrapure water, were included at all stages and for all batches.

PCR amplification of microsatellites

A total of nine markers described by REGIDOR-CERRILLO et al. (2006) were amplified using sets of nested-PCRs well developed for each genetic marker to determine the genetic profile of *N. caninum* isolates infecting the population analyzed here. DNA isolated from tissues samples were analyzed by the microsatellites MS4, MS5, MS6A, MS6B, MS7, MS8, MS10, MS12 and MS21 of *N. caninum*, as described by REGIDOR-CERRILLO et al. (2006) and PEDRAZA-DÍAZ et al. (2009). Microsatellite markers and primers for primary and secondary reactions are shown in Table 1. The primers were specific for *N. caninum* amplifying a fragment of DNA around 300 bp.

A quantity of 300 ng of DNA extracted from tissue samples were used as template in each reaction. DNA amplification was performed in 25 µL total volume containing 2.5 µL 1x PCR buffer, 0.75 µL 50 mM MgCl₂, 0.50 µL 10 mM dNTPs, 1.0 µL 10 pmol of each primer, and 1 unit of DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain). After the primary amplification, 5.0 µL of a 1:5 dilution of the PCR product were added to the secondary amplification reaction mixture.

Table 1 - Microsatellite markers and primers used in this study.

Marker	Repeat	External PCR Primers (5'-3')		Internal PCR Primers (5'-3')	
		forward	reverse	forward	reverse*
MS4	(AT) _n	CTACCCCTGGGAGTGAAT	GCTCGTGTAAGACTCTGAA	AGAAGAAGAAACGCGGAATG	TCTGAAACGAATCCCTTGG
MS5	(TA) _n	GTCTCGATACCCTCATTGAA	TTGACACAAAACAAAACAGC	AATCAGGACTCCGTACACC	CCAGAGAGTCCCACATCTC
MS6A	(TA) _n	AGATCTCTTCTGCCACGTA	AGCTCATTAAAGATTGCAGGA	TCCGCGTGTGGTTTATCT	TGCGCATGCACGAATAATAG
MS6B	(AT) _n			GCACTCATGGGATTTTGTAGG	AAAAATCAATGCACCTGATCG
MS7	(TA) _n	AATATGAGGCGTAGAGAGC	AGAAGCCCTCCGTGTTTC	GATCCAACCTCGGCGAGATAC	CGTTCCCTTCCCAAATCTTC
MS8	(AT) _n	TGCTCAAGTTGTTCTAACG	ATTAAGAACACCCGAGACG	ACACTCGCCTTTCCTTTGTG	CACACAGGCCAGTTGAAAAG
MS10	(ACT) _n - (AGA) _n - (TGA) _n	GGACACAAAAGTGAGGAA	ACAAGAGTAAACGCGAAAAA	CTATCACAGCCGTGAGTGTTG	CGCGCTATCCTTTATTCT
MS12	(GT) _n	CCTTTCTTCTTGCTTCA	CGAGCAAAAACGCACTT	CCAGCATTTCTTCTCCTT	CAAAAACGCACTTTCTTTTCG
MS21	(TACA) _n	GGCTGTGAGCATAACGGT	CCTAATCGACAGCAGATGA	TGTGAGCATAACGGTGGTTC	TTTCTACCCTCCCCTTCACC

For the primary amplification, samples were subjected to one cycle at 94°C for 5 min., 35 cycles of 94°C for 1 min., 54°C for 1 min., and 72°C for 1 min., with a final 72°C for 10 min. And for secondary amplification, 35 cycles of 94°C for 1 min., 62°C for 1 min. and 72°C for 1 min., and a final 72°C for 10 min. When amplification was not achieved in the second round of the PCR reaction, 5 µL of the first PCR product without dilution was also tested in a second round of PCRs. Positive and negative controls were included at all stages and for all batches as mentioned above. Five µL aliquots of the PCR products were visualized under UV light in 1% agarose/ethidium bromide gel.

Automated allele sizing

Allele assignment was performed according to the sizes obtained by capillary electrophoresis for all microsatellite markers.

The size of alleles amplified in each sample were determined by fragment analysis using reverse primers fluorescent-end-labelled with 6-FAM in the secondary PCR.

Dilutions of PCR products were prepared in sterile distilled water to a concentration of approximately 1/10-1/20 ng/µL. Then 13.75 µL of HiDi formamide and 0.25 µL of Gene Scan-500 (LIZ) Size Standards (Applied Biosystems, Foster City, CA) were added to 1 µL of each diluted PCR product. Size of fluorescent PCR-products was determined using a 48-capillary 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems) and the GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems) as size standard at the *Unidad Genómica del Parque Científico de Madrid* and analyzed with the GeneMapper® V 3.5 Software.

Sequencing of microsatellites

The microsatellite markers called MS7 and MS10 were sequenced as reported by REGIDOR-CERRILLO et al. (2006). PCR products amplified with non-labelled primers for these microsatellites were purified using the GENE CLEAN

Turbo kit (QBiogene, California, USA) according the manufacturer's instructions and then sequenced in both directions using the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and a 3730 DNA analyser (Applied Biosystems) at the Unidad Genómica del Parque Científico de Madrid. Sequences were analyzed using BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.1 (Hall, 1999) (Copyright© 1997-2004 Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad, California 92008, USA).

Data analysis

A multilocus genotype for each genomic DNA sample was generated by combining the data for each allele at the nine loci analyzed. For each allele was designated a Roman numeral according to the length of the repeat (allele size) and the differences found in the sequence as was reported by REGIDOR-CERRILLO et al. (2006). When sequencing of MS10 was not achieved but size was determined, each non-sequenced allele was identified by a capital letter according to the amplicon size.

Results

Parasite detection by ITS-1 PCR

N. caninum DNA was detected in 40 (20.51%) of all 195 fetuses by ITS-1 PCR. From them, a total of 41 samples from tissues was PCR positive, represented by 32 (78.57%) brains, seven (16.67%) hearts and two (4.76%) livers. Thirty one fetuses were positive only in brain, three in heart and two in liver. Four fetuses were positive in brain and heart, and no parasite was detected simultaneously in the heart and liver or in the three organs of the same animal.

Microsatellite amplification, allelic variation and multilocus analysis

In 21 fetuses (17 fetal brain tissues, three fetal heart tissues and two fetal liver tissues) nested-PCR failed to amplify any microsatellite. Of the remaining 19 fetuses only one or two microsatellite markers were amplified and identified from 13 tissue samples (12 fetal brain tissues, one fetal heart tissue) and more than three markers were obtained exclusively from six tissue samples (three fetal brain tissues and three fetal heart tissues). The amplification's rate of each marker from each tissue was summarized in Table 2.

Table 2 - Nested-PCR efficiency measured by the amplification rate of each microsatellite in the total of analyzed samples (32 brains, 7 hearts and 2 livers).

Marker	Rate of amplification (%)		
	brain	heart	liver
MS4	70.00 (7/10)	30.00 (3/10)	0.00
MS5	70.00 (5/7)	30.00 (2/7)	0.00
MS6A	75.00 (3/4)	25.00 (1/4)	0.00
MS6B	75.00 (3/4)	25.00 (1/4)	0.00
MS7	90.00 (8/9)	10.00 (1/9)	0.00
MS8	100.00 (2/2)	0.00	0.00
MS10	50.00 (3/6)	50.00 (3/6)	0.00
MS12	70.00 (6/9)	30.00 (3/9)	0.00
MS21	100.00 (3/3)	0.00	0.00

The length of repetitive motive and the size of allele amplified for each marker and the complete list of the alleles signed with their corresponding number are given in Table 3.

There was no apparent correlation between the number of repeats and the degree of polymorphism. The largest allele number was found for the microsatellites MS4 e MS5, exhibiting five alleles, while the MS6B and MS21 markers were found to be monomorphic for this set of samples. The MS7, MS8 and MS12 showed two different alleles. The remaining microsatellite markers MS6A and MS10 displayed, respectively, three and four different alleles.

Table 3 - Allele sizes and number allocation for each of the nine markers for microsatellite analysis of *Neospora caninum*.

Marker	Repeat	Allele size (bp.)	Allele No.
MS4	(AT) ₁₆	296	2
	(AT) ₁₇	298	3
	(AT) ₁₈	300	4
	(AT) ₁₉	302	5
	(AT) ₂₀	304	6
MS5	(TA) ₁₁	304	1
	(TA) ₁₂	306	2
	(TA) ₁₉	320	7
	(TA) ₁₇	316	8
	(TA) ₁₈	318	10
MS6A	(TA) ₁₄	302	3
	(TA) ₁₅	304	4
	(TA) ₁₇	308	8
MS6B	(AT) ₁₂	289	2
MS7	(TA) ₁₀	279	1
	(TA) ₁₁	281	5
MS8	(AT) ₁₃	289	1
	(AT) ₁₂	287	7
MS10	(ACT) _x -	298	A ^A
	(AGA) _y -(TGA) _z		
	(ACT) _x -	301	B ^A
	(AGA) _y -(TGA) _z		
	(ACT) _x -	307	C ^A
	(AGA) _y -(TGA) _z		
	(ACT) ₆ -	304	28
	(AGA) ₁₄ -		
MS12	(TGA) ₁₀		
	(GT) ₁₆	308	2
MS21	(GT) ₁₄	304	4 ^B
	(TACA) ₁₀	303	1

^A Alleles A, B, C from MS10 marker were assigned with a capital letter according to their size because sequencing was not achieved. According to this and previous studies (REGIDOR-CERRILLO et al 2006, 2008) the allele A could be the alleles 1 (ACT)₅-(AGA)₁₄-(TGA)₉, 10 (ACT)₆-(AGA)₁₃-(TGA)₉, 14 (ACT)₇-(AGA)₁₂-(TGA)₉, 18 (ACT)₇-(AGA)₁₃-(TGA)₈, or 21 (ACT)₆-(AGA)₁₄-(TGA)₈ and those not currently identified with a size of 298 bp. Similarly allele B, the alleles No. 2 (ACT)₆-(AGA)₁₄-(TGA)₉, 17 (ACT)₆-(AGA)₁₃-(TGA)₁₀, 22 (ACT)₆-(AGA)₁₅-(TGA)₈, 26 (ACT)₅-(AGA)₁₅-(TGA)₉ (301 bp.) and the allele C, the alleles 3 (ACT)₆-(AGA)₁₇-(TGA)₈, 15 (ACT)₆-(AGA)₁₆-(TGA)₉, 29 (ACT)₆-(AGA)₁₅-(TGA)₁₀ (307 bp.)

^B New allele.

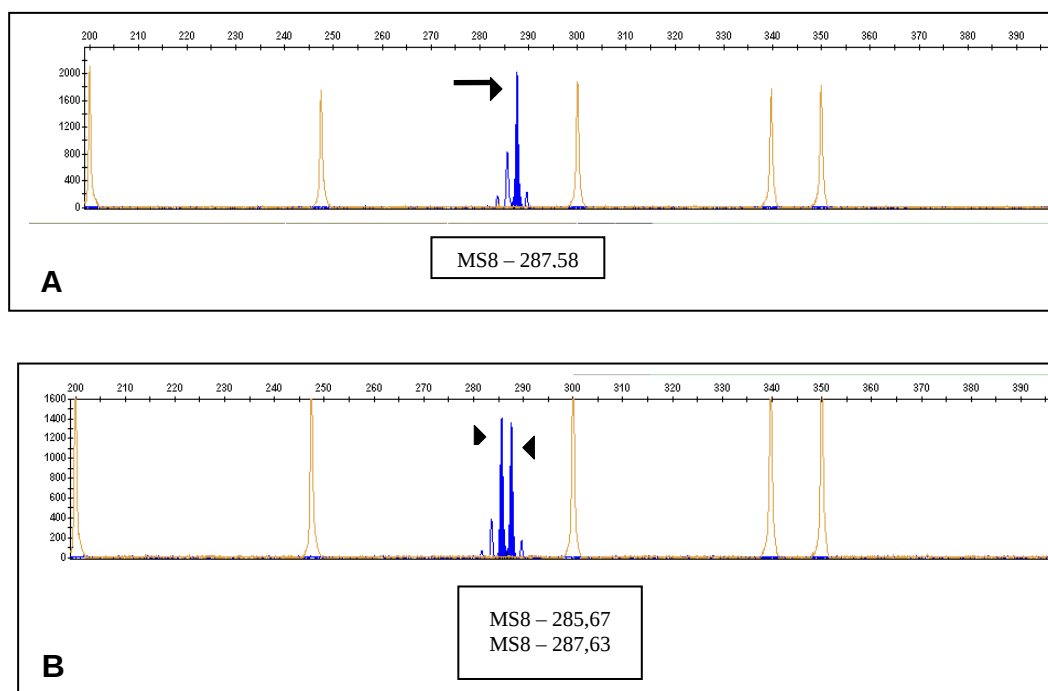


Figure 1 - Graphs obtained with the GeneMapper® V 3.5 Software. Graph A showing a unique peak (large arrow) for one microsatellite locus (MS8) representing one allele in the brain of fetus no. 180. Graph B presenting a double peak (head arrows) for the same locus (MS8), indicating the detection of two alleles in a unique sample (brain of fetus no. 190). Peaks sizes are measured in base pairs and are shown in the boxes underneath peaks.

Multilocus profiles with three or more microsatellite markers were obtained for only six fetuses numbered 102, 155, 156, 180, 190, 200 (Table 4), originated from the geographical regions represented at the follow map (Figure 2). For one of these fetuses (102), no data of the location was obtained, and two of them (180 and 190) had come from a same microregion (Meia Ponte) and one of them revealed 2 profiles simultaneously, since two alleles were amplified and observed for MS8 in fetus no. 190 (Figure 1).

Table 4 - Summary of microsatellite analysis obtained for *Neospora caninum*.

N. of fetus	Fetal age (m)	Geographical origin (microregion)	Microsatellites loci and alleles								
			MS4	MS5	MS6A	MS6B	MS7	MS8	MS10	MS12	MS21
14 (brain)	9	ND	—	1	—	—	5	—	—	—	—
15 (brain)	8	ND	—	—	—	—	5	—	—	—	—
17 (brain)	4	ND	—	—	—	—	1	—	—	—	—
18 (brain)	6	ND	—	—	—	—	—	—	—	2	—
20 (brain)	6	ND	—	2	—	—	1	—	—	—	—
34 (brain)	8	ND	6	—	—	—	—	—	—	—	—
39 (brain)	8	ND	—	—	—	—	—	—	—	2	—
49 (brain)	7	ND	—	—	—	—	1	—	—	—	—
102 (heart) ^d	6	ND	3	—	—	—	1 ^a	—	C ^b	—	—
152 (brain)	7	Vale do Rio dos Bois	—	—	—	—	—	—	A ^b	—	—
154 (brain)	7	Vale do Rio dos Bois	—	—	—	—	—	—	—	—	—
155 (heart) ^d	7	Vale do Rio dos Bois	3	7	—	—	—	—	B ^b	2	—
156 (heart) ^d	5	Rio Vermelho	3	10	4	2	—	—	A ^b	2	—
177 (brain)	7	Meia Ponte	2	—	—	—	—	—	—	4	—
180 (brain) ^d	6	Meia Ponte	4	8	3	2	1 ^a	1	28 ^a	2	1
190 (brain) ^d	7	Meia Ponte	3	10	8	2	1 ^a	1 ^c	28 ^a	—	1
7 ^c											
198 (brain)		Porangatu	3	—	—	—	—	—	—	—	—
200 (brain) ^d	7	Porangatu	5	8	4	2	1	—	—	2	1
204 (heart)	5	Porangatu	—	—	—	—	—	—	—	2	—

ND – no information data

^a MS7 sequenced for all samples and MS10 sequenced for two samples.^b The MS10 marker from 102, 152, 155 Y 156 fetuses were not sequenced.^c Two alleles for MS8 marker were detected in the fetus no. 190.^d Multilocus profiles with amplification of three or more microsatellite markers.

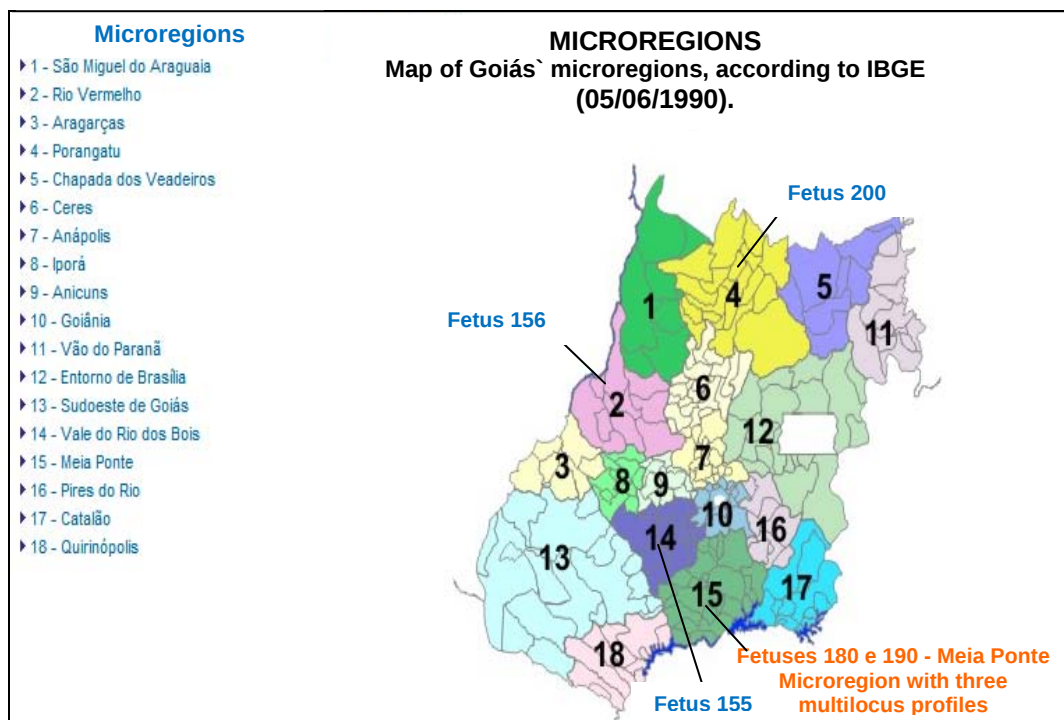


Figure 2 - Geographical origin of fetuses in Goiás, typed by microsatellite analysis.

Discussion

Most of the markers used in the present study have been further applied for the molecular characterization of isolates from calves and fetuses from Spain (REGIDOR- CERRILLO et al., 2008; PEDRAZA-DÍAZ et al., 2009; ROJO-MONTEJO et al., 2009a), and from dog isolates from Portugal (BASSO et al., 2009a,b) having proven their usefulness for the identification and genetic characterization of isolates of *N. caninum*.

It is known that levels of parasitemy are highly variable in natural infections and they are frequently low. The amplification of microsatellites could not be achieved for all samples analyzed here and was more successful for those in which the amplification of the ITS-1 fragment was more intense. This could indicate the fact that 21 of 40 PCR positive zebuine fetuses analyzed did not amplify any microsatellite marker from DNA. The parasite load in those samples might have been higher, but it should be considered that these samples were collected in 2006, were proceeded from non-aborted fetuses, and the risk of some

of them be partially autolyzed, added to the freezing at -80 °C for long periods of time, might have affected the integrity of the DNA.

With the set of markers applied in this kind of sample with probable low parasite load for the reasons mentioned above, it could be deduced, by Table 2, that the brain was shown the tissue sample with larger amplification rate of microsatellites, varying from 50 to 100%. The brain is the tissue sample where more positive results are observed by the amplification of the ITS-1 fragment, being considered the reference organ by several studies (PEREIRA-BUENO et al., 2003; COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006; CABRAL et al., 2009).

How one of the constraints for molecular epidemiological studies is this low number of parasites in most of tissue samples commented before, the authors BASSO et al. (2009b) and PEDRAZA-DÍAZ et al. (2009) reported the use of the nested-PCR protocols for an increase of sensitivity in the analysis of clinical samples where lower concentrations of parasite DNA are present, and the application of the microsatellite technique is, so, less efficient than the *in vitro* isolates, even so only six zebuine fetuses from slaughtered cows bred at the region object of the investigation showed, for the first time, complete or almost complete profiles.

The number of alleles for each microsatellite amplified from fetal samples ranged from 1 to 5. All alleles identified in the present work were previously observed in other studies (REGIDOR-CERRILLO et al., 2006, 2008; ROJO-MONTEJO et al., 2009a), with the exception of allele 4 described here for MS12 (Table 3).

In relation of a possible low or high polymorphism, a cautious analysis should be done of Tables 3 and 4 due of the low number of samples that amplified microsatellites markers. In the analysis of the number of alleles by the number of samples that amplified the marker, the most polymorphic microsatellite was the MS8, in which a unique allele was detected for each isolate (two alleles in two amplified). After that, the higher polymorphism in the present study was observed for MS6A and MS5 (75.00 and 71.43%, respectively), followed by MS10 (66.67%), MS4 (50.00%), MS21 (33.33%), MS6B (25%), MS7 (22.22%) and MS12 (22.22%).

The applicability of the most polymorphic marker MS8 should also be important when detecting two alleles at this locus in a unique sample (fetus no. 190), that will be discussed later.

For AL-QASSAB et al. (2009) the most polymorphic marker was the MS10. As well as it occurred for REGIDOR-CERRILLO et al. (2006, 2008) and PEDRAZA-DÍAZ et al. (2009), our results showed a high polymorphism for MS10 and MS5 (>65%). Although the sequencing of three alleles at this locus MS10 (Table 3) was not achieved, probably for the low amount of DNA, the allele assignment was performed with a capital letter to difference from the remaining alleles within this locus, and the sequences observed for this marker at the present work was not described previously for any *N. caninum* isolate.

In the analysis of the multilocus genotype for each genomic DNA sample, it was observed seven different profiles from samples with more than three microsatellites amplified, considered here enough for genetic characterization of *N. caninum*. No one exhibited identical genetic patterns – the opposite occurred: all produced unique multilocus genotypes, distinct to each other and from those worldwide isolates already identified and published in previous studies (REGIDOR-CERRILLO et al., 2006, 2008; BASSO et al., 2009b; PEDRAZA-DÍAZ et al., 2009; ROJO-MONTEJO et al., 2009a), possible being new genetically different isolates of the *N. caninum* species.

As the purpose of the present work was the identification of genotype differences on isolates responsible by fetal transmission of *N. caninum* in zebuine fetuses, an epidemiological analysis was not conducted here due to the low number of samples and consequently to the low number of different isolates that could be analyzed, even so it could be guaranteed that the individual DNA-microsatellite patterns observed here were not previously reported for any *N. caninum* isolate profile described before (REGIDOR-CERRILLO et al. 2006, 2008; AL-QASSAB et al., 2009; GARCÍA-MELO et al. 2009; ROJO-MONTEJO et al. 2009a).

They are the first indications of the genetic analysis of the probable distinct *N. caninum* strains naturally infecting zebuine cattle from Goiás, Brazil. In the same way, complete or almost complete profiles, in natural clinical samples, were observed by PEDRAZA-DÍAZ et al. (2009) in aborted *Bos taurus* fetuses.

Table 4 and Figure 2 intend to affirm the high variability for *N. caninum*, represented by the fact that in a unique region (Goiás) distinct isolates are surrounding with more than one profile per property, and more than that, in a unique microregion (Meia Ponte), three distinct profiles of *N. caninum* may be identified, showing the outcome of a preliminary screen for diversity amongst local isolates in their repetitive DNA.

Despite the similarity between the types is close to zero, the growing need of more markers and larger number of samples should be wanted to the continuous analysis of this variability. BECK et al. (2009) point out the importance of microsatellite markers for the recognition of an increased frequency of mixed infections, just as it happened with PEDRAZA-DÍAZ et al. (2009), which assumed the occurrence of a multiplicity of infection by two or more isolates.

In consideration to MALLON et al. (2003) that the parasite is considered to be haploid, only a single allele would be detected in each isolate unless the host had been infected with more than one parasite genotype, that seems have happened with PEDRAZA-DÍAZ et al. (2009) and with one fetus of the present work (Fetus 190, MS8 – see Table 4), probably infected with two different strains, with clearly different size of products, possibly corresponding the detection of multiple infection by two isolates genetically different (Figure 1).

It is known that samples which showed multiple alleles at one locus also tended to show multiple alleles at other loci (ANDERSON et al., 1999), but this did not happen here. These observations raise concerns about the stability of microsatellite repetitive sequences and their use for genotyping (AL-QASSAB et al., 2009). Given this stability of these markers after in vitro and in vivo passages of the parasite observed here and in previous studies (REGIDOR-CERRILLO et al., 2006, 2008; BASSO et al., 2009b), the coexistence of different isolates in a farm might be due to different routes of infection, or to the acquisition or transit of infected animals from different locations (PEDRAZA-DÍAZ et al., 2009). Further study will determine the value of this approach through future epidemiological and population genetic studies (AL-QASSAB et al., 2009).

The results evidenced that it is quite possible that *N. caninum* isolates may have different population structures, depending on the geographical areas and conditions of zebu breeding, or in which samples are collected. For

comparative purposes, and to establish definitive conclusions about, it is reasonable, to fortify the preliminary genetic diversity observed for *N. caninum* in this area, further studies involving larger number of field samples from the same location as well as additional epidemiological information regarding the origin of the animals in the farm, the presence of dogs and the evaluation of possible feed contamination.

And probably may be required, for investigation, more parasite load in clinical samples from more diverse geographical areas in Goiás, to permit the knowledge of the local population structure and your parasite route of transmission.

Future pathogenic characterization of these isolates will contribute to the investigation of the relationship between isolate virulence and the outcome of infection, as well as other epidemiological features, such as a further analysis of transmission.

Anyway, it is worth to emphasize that these are the first results obtained for the molecular characterization of isolates of *N. caninum* from infected zebuine fetuses, not just in Goiás, but even so in South America, revealing for the first time that there are genotype differences on isolates responsible by fetal transmission in zebuine breed.

Conclusion

With no evaluation of the isolate virulence or of the intensity of infection, to our knowledge, these are the first results of genotype differences responsible by fetal infection in zebuine in South America. A new allele was detected and specific multilocus profiles were obtained and were not described previously for any *N. caninum* isolate, confirming the high discrimination power of these genetic markers. Further studies are needed in this area to investigate the genetic diversity of field *N. caninum* isolates infecting zebu herds of cattle.

Acknowledgment

This work was supported by CAPES and MECD-Spain.

References

1. AL-QASSAB, S., REICHEL, M. P., IVENS, A., ELLIS, J. T. Genetic diversity amongst isolates of *Neospora caninum*, and the development of a multiplex assay for the detection of distinct strains. **Molecular and Cellular Probes**, Londres, v. 23, n. 3-4, p. 132-139, jun-ago. 2009.
2. ANDERSON, T. J., SU, X. Z., BOCKARIE, M., LAGOG, M., DAY, K. P. Twelve microsatellite markers for characterization of *Plasmodium falciparum* from finger-prick blood samples. **Parasitology**, London, v. 119, n. 2, p. 113-125, ago. 1999.
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**, London, v. 118, n. 4, p. 363-370, abr. 1999.
4. BASSO, W., HERRMANN, D. C., CONRATHS, F. J., PANTCHEV, N., VRHOVEC, M. G., SCHARES, G. First isolation of *Neospora caninum* from the faeces of a dog from Portugal. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 159, n. 2, p. 162-166, fev. 2009a.
5. BASSO, W., SCHARES, S., BÄRWALD, A., HERRMANN, D. C., CONRATHS, F. J., PANTCHEV, N., VRHOVEC, M. G., SCHARES, G. Molecular comparison of *Neospora caninum* oocyst isolates from naturally infected dogs with cell culture-derived tachyzoites of the same isolates using nested polymerase chain reaction to amplify microsatellite markers. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 160, n. 1-2, p. 43-50, mar. 2009b.

6. BECK, H. P., BLAKE, D., DARDÉ, M. L., FELGER, I., PEDRAZA-DÍAZ, S., REGIDOR-CERRILLO, J., GÓMEZ-BAUTISTA, M., ORTEGA-MORA, L. M., PUTIGNANI, L., SHIELS, B., TAIT, A., WEIR, W. Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 175-189, jan. 2009.

7. 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**, London, v. 118, n. 4, p. 267-279, mai. 1998.

8. COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., RODRÍGUEZ-BERTOS, A., ARNÁIZ-SECO, I., MORENO-BURGOS, B., ADURIZ, G., ORTEGA-MORA, L. Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine foetuses. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, n. 3, p. 629-641, fev. 2006.

9. DUBEY, J. P., BUXTON, D., WOUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 134, n. 4, p. 267-289, mai. 2006.

10. DUBEY, J. P., SCHARES, G., ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 20, n. 2, p. 323-367, abr. 2007.

11. GARCÍA-MELO, D. P., REGIDOR-CERRILLO, J., ORTEGA-MORA, L. M., COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., DE OLIVEIRA, V. S. F., OLIVEIRA, M. A. P., SILVA, A. C. Isolation and biological characterisation of a new isolate of *Neospora caninum* from an asymptomatic calf in Brazil. **Acta Parasitologica**, Warszawa, v. 54, n. 2, p. 180-185, 2009.

12. GONDIM, L. F., LASKI, P., GAO, L., MCALLISTER, M. M. Variation of the internal transcribed spacer 1 sequence within individual strains and among

different strains of *Neospora caninum*. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 90, n. 1, p. 119-122, 2004.

13.INNES, E. A., WRIGHT, S., BARTLEY, P., MALEY, S., MACALDOWIE, C., ESTEBAN-REDONDO, I., BUXTON, D. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 108, n. 1-2, p. 29-36, out. 2005.

14.LINDSAY, D. S., LENZ, S. D., COLE, R. A., DUBEY, J. P., BLAGBURN, B. L. Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 81, n. 2, p. 313-315, abr. 1995.

15.MALLON, M. E., A. MACLEOD, J. M.WASTLING, H. SMITH, AND A. TAIT Multilocus genotyping of *Cryptosporidium parvum* Type 2: Population genetics and sub-structuring. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, p. 207-218, 2003.

16.OURA, C. A., ODONGO, D. O., LUBEGA, G. W., SPOONER, P. R., TAIT, A., BISHOP, R. P. A panel of microsatellite and minisatellite markers for the characterisation of field isolates of *Theileria parva*. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 33, n. 14, p. 1641-1653, dez. 2003.

17.PEDRAZA-DÍAZ, S., MARUGÁN-HERNÁNDEZ, V., COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., REGIDOR-CERRILLO, J., ROJO-MONTEJO, S., GÓMEZ-BAUTISTA, M., ORTEGA-MORA, L. M. Microsatellite markers for the molecular characterization of *Neospora caninum*: Application to clinical samples. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 166, n. 1-2, p. 38-46, dez. 2009.

18.PÉREZ-ZABALLOS, F. J., ORTEGA-MORA, L. M., 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. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 91, n. 3, p. 507-510, jun. 2005.

- 19.REGIDOR-CERRILLO, J., PEDRAZA-DÍAZ, S., GÓMEZ-BAUTISTA, M., ORTEGA-MORA, L. M. Multilocus microsatellite analysis reveals extensive genetic diversity in *Neospora caninum*. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 92, n. 3, p. 517-524, jun. 2006.

- 20.REGIDOR-CERRILLO, J., GOMEZ-BAUTISTA, M., PEREIRA-BUENO, J., ADURIZ, G., NAVARRO-LOZANO, V., RISCO-CASTILLO, V., FERNANDEZ-GARCÍA, A., PEDRAZA-DÍAZ, S., ORTEGA-MORA, L. M Isolation and genetic characterization of *Neospora caninum* from asymptomatic calves in Spain. **Parasitology**, London, v. 135, n. 14, p. 1651–1659, dez. 2008.

- 21.ROJO-MONTEJO, S., COLLANTES-FERNANDEZ, E., REGIDOR-CERRILLO, J., ALVAREZ-GARCIA, G., MARUGAN-HERNANDEZ, V., PEDRAZA-DIAZ, S., BLANCO-MURCIA, J., PRENAFETA, A., ORTEGA-MORA, L. M. Isolation and characterization of a bovine isolate of *Neospora caninum* with low virulence. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 159, n. 1, p. 7-16, jan. 2009a.

- 22.ROJO-MONTEJO, S., COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., BLANCO-MURCIA, J., RODRÍGUEZ-BERTOS, A., RISCO-CASTILLO, V., ORTEGA-MORA, L. M. Experimental infection with a low virulence isolate of *Neospora caninum* at 70 days gestation in cattle did not result in foetopathy. **Veterinary Research**, Ottawa, v. 40, n. 5, p. 49, set-out. 2009b.

- 23.SCHOCK, A., INNES, E. A., YAMANE, I., LATHAM, S. M., WASTLING, J. M. Genetic and biological diversity among isolates of *Neospora caninum*. **Parasitology**, London, v. 123, n. 1, p. 13-23, jul. 2001.

- 24.SPENCER, J. A., WITHEROW, A. K., BLAGBURN, B. L. A random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction technique that differentiates between *Neospora* species. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 86, n. 6, p. 1366-1368, dez. 2000.

25.VIANNA L. C., SARTOR, I. F., PITUCO, E. M., OKUDA, L. H., CAMARGO, C. N., KRONKA, S. N. Incidence and transplacental transmission of *Neospora caninum* in primiparous females from *Bos indicus* slaughtered in Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 387-92, 2008.

CAPÍTULO 5: Considerações finais

Como a descoberta de *N. caninum* vem sendo considerada causa de abortamento bovino desde a década de 80 em várias partes do mundo, informações relacionadas à ocorrência da infecção e ao seu impacto em zebuínos se faz necessária.

Nos últimos anos têm ocorrido progressos na compreensão da patogênese da neosporose bovina, que influenciam o desenvolvimento da gestação e a capacidade do animal em levá-la adiante. Entretanto, a infecção tem sido mais estudada em animais taurinos, tanto na análise dos seus fatores de risco como no seu diagnóstico e caracterização genética. Valoriza-se neste trabalho então, o reconhecimento da infecção e a complexidade genética de *N. caninum* em *Bos indicus*.

Assim, os resultados obtidos permitiram verificar a ocorrência de transmissão vertical deste protozoário em zebuínos, diagnosticando a enfermidade e o quadro lesional em fetos de fêmeas destinadas ao abate. Além de relatar, pela primeira vez, a variabilidade genética encontrada para o parasito na espécie zebuína na América do Sul.

Embora não tenha havido concordância entre as provas diagnósticas pelos índices de positividade obtidos, não permitindo correlacionar seus resultados, a transmissão vertical de *N. caninum* em zebuínos pôde ser avaliada por RIFI, por PCR, com a detecção do DNA parasitário em tecidos fetais e por histopatologia com análise das lesões, possivelmente provocadas pelo parasito nos principais órgãos.

Baseado nos resultados apresentados no segundo capítulo pode-se afirmar que apesar de demonstrar a presença da infecção em uma população e a ocorrência da transmissão vertical, a sorologia por si só se mostrou insuficiente como técnica de detecção da enfermidade quando comparada ao PCR e à histopatologia.

O método de RIFI executado apresentou uma baixa sensibilidade na avaliação da transmissão vertical de *N. caninum* em zebuínos quando comparada às outras duas técnicas descritas no terceiro capítulo, no entanto, não deixou de demonstrar elevada repetibilidade e precisão como técnica complementar.

Como exposto no terceiro capítulo, pôde-se observar que o cérebro é o sítio onde mais se detectou o parasito por PCR, independente do período de gestação, corroborando com estudos que indicam a persistência do parasito neste órgão. Portanto, a análise do mesmo é indispensável para realizar o diagnóstico da infecção. O coração é o segundo órgão em que mais freqüentemente se detectou o parasito, seguido do fígado. Nessa mesma ordem ocorreu a freqüência de apresentação das lesões histopatológicas características e consistentes com a neosporose bovina.

Do grande número de amostras com lesões sugestivas de infecção por protozoários, características ou consistentes com neosporose, a infecção por *N. caninum* foi aqui verificada pela detecção do DNA parasitário por PCR e pela presença simultânea de necrose e inflamação no cérebro associada com inflamação no coração, mesmo quando PCR negativo.

Com relação aos resultados histopatológicos, sugere-se a confirmação dos mesmos por IHQ. No entanto, poderíamos não obter resultados positivos devido à baixa carga parasitária das amostras, por não serem tecidos de fetos abortados cuja parasitemia geralmente é maior.

Pela obtenção de amostras positivas pelos três métodos como observado acima, pode-se assegurar que realmente faz-se necessária a associação de técnicas para o diagnóstico da neosporose fetal bovina, não se podendo estipular um único método a ser aplicado.

A indicação de uma técnica ou outra seria então dependente da necessidade de determinada situação, como por exemplo, ao buscar por resultados negativos, a alta especificidade da técnica de RIFI se adequaria; na pretensão de maior número de resultados positivos, a alta sensibilidade do histopatológico seria favorável, no entanto dependente de confirmação.

A baixa concordância entre as técnicas não deixa de ser justificável. Fatores como a idade fetal e o tipo amostral analisado, proveniente de animais não abortados e obtidos ao abate, poderiam prejudicar, respectivamente, as reações de RIFI e PCR.

No capítulo quarto o estudo forneceu os primeiros indícios de que existem diferentes isolados presentes no Estado de Goiás infectando zebuínos, os quais provavelmente possuiriam diferenças de patogenicidade entre si.

Com o conhecimento da influência do sistema de produção leiteiro ou de corte, e do manejo intensivo ou extensivo dos animais, sobre o comportamento epidemiológico da enfermidade, e que a maioria dos dados disponíveis para *N. caninum*, mesmo em gado de corte, se referem a animais taurinos, neste quarto capítulo, demonstrou-se pela primeira vez perfis genéticos do parasito infectando zebuínos, distintos dos já identificados para animais taurinos. Ressalta-se no entanto, a necessidade da continuidade desse pioneirismo dos achados genéticos para *Bos indicus*, ampliando o número de amostras de DNA obtidas de fetos zebuínos positivos a serem analisadas em estudos futuros.

Logo, para valorizar mais os resultados originais encontrados com expressiva variabilidade genética, estudos subseqüentes são ainda necessários para o uso dos microssatélites como marcadores de virulência, a serem utilizados em amostras de campo para a análise sucessiva da complexidade genética de *N. caninum* e da epidemiologia molecular da neosporose.

Sem a pretensão de supor uma maior resistência do zebuíno à infecção por *N. caninum*, tal como em outros modelos parasitários, acredita-se que a virulência dos isolados aqui presentes, infectando esta raça nas microrregiões analisadas no Estado de Goiás, seja baixa, justificando as taxas encontradas e a reduzida carga parasitária detectada por PCR. Baixa parasitemia esta que dificultaria a quantificação orgânica do parasito por PCR quantitativa em tempo real, a qual poderia ser associada às variações existentes na virulência entre os possíveis diferentes isolados de *N. caninum* observados.

Os resultados alcançados nesse trabalho, comprovando a ocorrência da transmissão vertical do parasito, apontam um potencial comportamento endêmico da infecção por *N. caninum* no rebanho zebuíno comercial no Estado de Goiás, justificando a baixa carga parasitária e a presença de lesões menos severas nos fetos.