



**CLAYTON ISRAEL NOGUEIRA**

**ESTUDO PROSPECTIVO DE *NEOSPORA CANINUM* EM  
CÃES DO SUL DE MINAS GERAIS**

**LAVRAS-MG**

**2012**

**CLAYTON ISRAEL NOGUEIRA**

**ESTUDO PROSPECTIVO DE *NEOSPORA CANINUM* EM CÃES DO SUL DE MINAS  
GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Clínica, Cirurgia e Patologia Veterinária, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Mary Suzan Varaschin

**LAVRAS-MG**

**2012**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Nogueira, Clayton Israel.

Estudo prospectivo de *Neospora caninum* em cães do sul de Minas Gerais / Clayton Israel Nogueira. – Lavras : UFLA, 2012.  
113 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.  
Orientador: Mary Suzan Varaschin.  
Bibliografia.

1. Neosporose. 2. Reação em cadeia da polimerase. 3. Imuno-  
histoquímica. 4. *Toxoplasma gondii*. 5. Soroprevalência. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD –636.70896968

**CLAYTON ISRAEL NOGUEIRA**

**ESTUDO PROSPECTIVO DE *NEOSPORA CANINUM* EM CÃES DO SUL DE MINAS  
GERAIS**

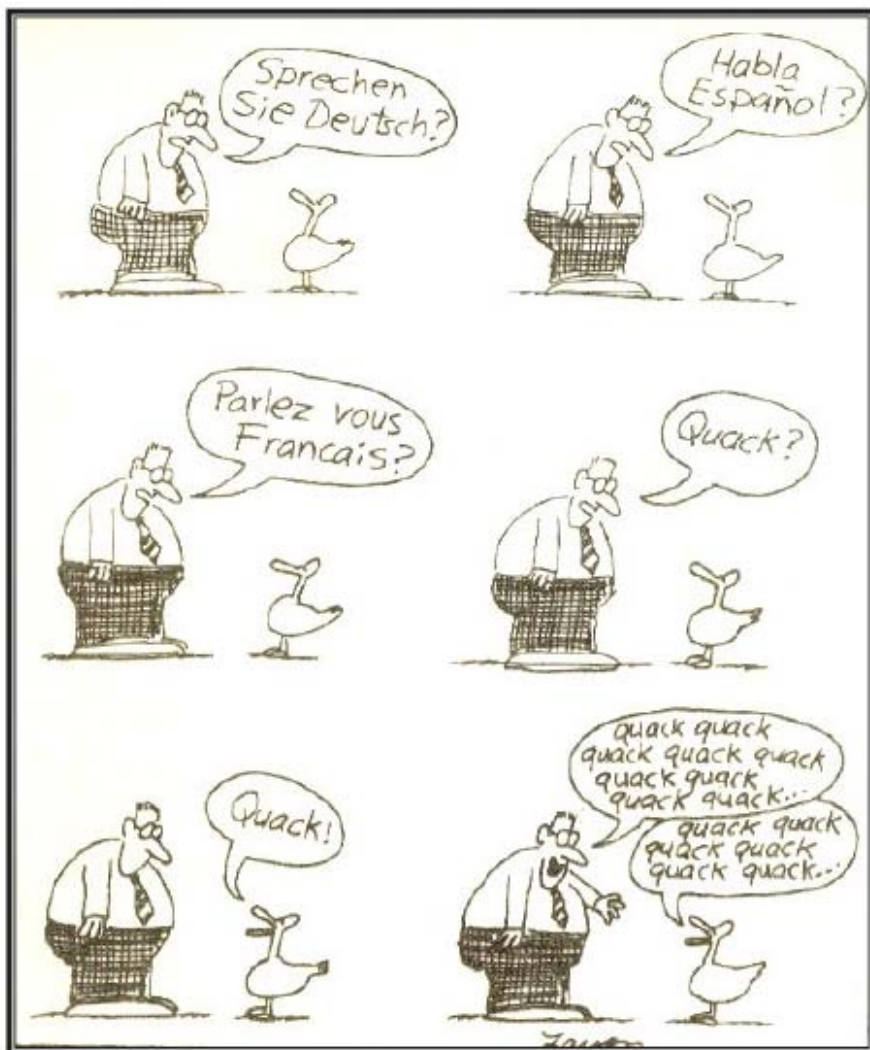
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Clínica, Cirurgia e Patologia Veterinária, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2012

Dra. Ana Paula Peconick	UFLA
Dr. Pedro Soares Bezerra Jr.	UFLA
Dra. Rosemeri de O. Vasconcelos	UNESP/Jaboticabal

Dra. Mary Suzan Varaschin  
Orientadora

**LAVRAS-MG  
2012**



“Understanding Animals” (The Far Side – Gary Larson)

A todos os animais que se sacrificaram para a realização deste trabalho e que tanto me ensinaram, dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar a Deus, por sua incessante fidelidade, dando-me sabedoria e forças para evoluir sempre.

Aos meus pais, Edson e Rita, ao meu irmão Edinho, e a todos os meus familiares, sempre acreditando no meu potencial e incentivando a seguir adiante.

A minha orientadora Professora Doutora Mary Suzan Varaschin, pela dedicação, amizade, risadas, paciência e sapiência.

Aos componentes da banca avaliadora, pelo auxílio tão importante nesta etapa e pelas contribuições na melhoria deste trabalho.

Aos colegas mestrandos, por toda a ajuda, especialmente à Camila por acompanhar essa jornada de perto ao longo de dois anos; e ao Léo, que se tornou um verdadeiro irmão de todos os momentos, dentro da universidade e fora dela.

A todos os meus estagiários do Setor de Patologia Veterinária-UFLA, especialmente à Karen, Rafael Costa e Xacy (Lucas) sempre dispostos em ajudar e sempre atentos ao pouco que eu tinha para lhes ensinar! Sejam sanguessugas!

A todos os outros mestrandos (Priscila, Débora, Priscilla, Yasmin e Willer) e professores do Setor de Patologia Veterinária pela ajuda e momentos de descontração e alegria extralaboratoriais.

A todos os meus amigos, de perto ou distantes, que torceram para que este sonho se realizasse.

À Capes pela concessão da bolsa de estudos durante esses dois anos.

A todos os animais, fundamentais para o meu aprendizado, que me mostraram, e mostram diariamente, que o que sabemos é sempre pouco e me fazem querer buscar sempre mais.

## RESUMO

*Neospora caninum* é considerado um importante agente causador de abortos em bovinos, porém se desconhece sua frequência e real importância como causador de lesões e doença clínica em cães da região Sul de Minas Gerais. Este estudo foi dividido em duas partes. Na primeira, determinou-se a soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e investigou-se os fatores de risco relacionados à sorologia em cães de zonas urbana e rural de propriedades com diferentes atividades econômicas (produção de leite ou de café) em Minas Gerais, Brasil. Para isso, 703 amostras de sangue de cães foram coletadas e um questionário contendo diversas variáveis epidemiológicas foi respondido por cada proprietário do animal no momento da coleta. O soro obtido foi analisado para anticorpos anti-*N. caninum* por teste de imunofluorescência indireta (RIFI $\geq$ 1:50). Dos 703 cães, 80 (11,4%) foram positivos para *N. caninum*. Cães que não recebiam ração industrial, de áreas rurais, de propriedades leiteiras principalmente com histórico de aborto bovino, que eram utilizados para caça, que apresentavam histórico de distúrbios reprodutivos apresentaram maiores chances de soropositividade ( $p < 0,05$ ). Para a segunda parte do estudo, um total de 104 cães com sinais neurológicos e musculares ou histórico de doenças ou terapias imunossupressoras recentes foram necropsiados e avaliados histopatologicamente à procura de lesões compatíveis com infecção por protozoários. Lesões, como encefalite, miosite e miocardite não supurativas, foram encontradas em 47 cães (45,2%). Quatro animais apresentaram estruturas parasitárias semelhantes a grupos de taquizoítos ou cistos de protozoários no coração ou no sistema nervoso central. Desses, dois animais apresentaram marcação imuno-histoquímica positiva apenas para *Toxoplasma gondii*. Em outro cão, ocorreu marcação imuno-histoquímica tanto para *N. caninum* como para *T. gondii*. Para o quarto cão, não foi possível realizar a análise imuno-histoquímica. Em todos os 104 cães também foi realizada PCR convencional (utilizando o par de *primers* Lav1/Tim11) em amostras de cérebro e coração, cujo produto de 588pb da região ITS1 foi sequenciado em quatro amostras (coração e cérebro) de dois cães. Obteve-se similaridade de 98 e 99% com várias sequências de *T. gondii* depositadas no GenBank. Os achados do presente estudo sugerem que *N. caninum* não é um agente importante como causador de lesões patológicas ou doença clínica em cães da região estudada e que cães da zona rural, produtoras de leite, possuem mais chances de contato com o agente. A PCR, utilizando-se os *primers* Lav1/Tim11 mostrou-se uma técnica bastante útil para diagnosticar infecção por protozoário, porém faz-se necessário o sequenciamento genético para diferenciar as espécies *T. gondii* e *N. caninum*.

Palavras-chave: Neosporose. Soroprevalência. Imuno-histoquímica. Reação em Cadeia da Polimerase. *Toxoplasma gondii*.

## ABSTRACT

*Neospora caninum* is considered an important causative agent of abortions in cattle, but it is unknown its frequency and real importance as a cause of injury and clinical disease in dogs from southern Minas Gerais, Brazil. This study was divided in two parts. The first was conducted to determine the seroprevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies and to investigate the risk factors related to antibodies anti-*N. caninum* in dogs from urban and rural areas with distinct economics pattern (milk and coffee production) in Minas Gerais, Brazil. For this purpose, 703 blood samples were collected from dogs and questionnaires addressing epidemiological aspects were given to each dog owner. The sera were analyzed for anti-*N. caninum* antibodies by indirect fluorescent antibody tests (IFAT  $\geq$  1:50). Of the 703 dogs, 80 (11.4%) were positive for *N. caninum*. Dogs which don't receive industrial food, from rural areas, from dairy farms mainly with history of bovine abortion, dogs used for hunting, with history of reproductive disorders, had higher odds of seropositivity ( $p < 0,05$ ). For the second part of the study, a total of 104 dogs with neurological and muscular signs or history of recent immunosuppressive diseases or therapy was necropsied and evaluated, histopathologically, to search for compatible lesions with protozoal infection. Lesions, like nonsuppurative encephalitis, myositis and myocarditis were found in 47 dogs (45.2%). Four animals showed parasitic structures like tachizoits groups or protozoan cysts in the heart or central nervous system. Two of them presented positive immunohistochemical labeling only for *Toxoplasma gondii*. In another dog, there was positive labeling to both *N. caninum* and *T. gondii*. For the fourth dog, it wasn't possible to perform immunohistochemical analysis. For all 104 dogs, it was realized convencional PCR (using the pair of primers Lav1/Tim11) in samples of brain and heart, and the product of 588bp from ITS1 region was sequenced in four samples (brain and heart) from two dogs. It was obtained 98 and 99% of similarity with several sequences of *T. gondii* deposited in GenBank. The findings of the present study suggests that *N. caninum* isn't an important agent causing pathological lesions or clinical disease in dogs from studied area and dogs from rural area, specially dairy areas, have more chances of contact with the agent. PCR, using the primers Lav1/Tim11 is useful to diagnosis protozoal infection, but it is necessary genetic sequencing to differentiate *N. caninum* from *T. gondii*.

Keywords: Neosporosis. Seroprevalence. Immunohistochemistry. Polymerase Chain Reaction. *Toxoplasma gondii*.



## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Ciclo de vida de <i>Neospora caninum</i> .....	21
----------	--	----

### SEGUNDA PARTE

#### ARTIGO 1

Figura 1	Localização da área de estudo. 1: Microrregião de Varginha; 2: Microrregião de Lavras.....	73
----------	--	----

#### ARTIGO 2

Figura 1	Cérebro de caprino controle-positivo mostrando cisto de <i>Neospora caninum</i> (seta). Técnica biotina-estreptavidina-peroxidase. DAB. Obj.40x.....	105
Figura 2	Córtex cerebral de canino controle-positivo mostrando taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> marcados isolados ou em grupos (setas). Técnica biotina-estreptavidina-peroxidase. DAB. Obj.40x.....	105
Figura 3	Encéfalo (colículo rostral) de cão (animal C) evidenciando área de discreta gliose focal (seta). H.E. Obj.20x.....	106
Figura 4	Córtex cerebral de cão (animal D) evidenciando cistos basofílicos de protozoários dentro do citoplasma de um neurônio (seta) ou próximos de vasos sanguíneos (cabeças de seta) associados a células inflamatórias. H.E. Obj.40x...	106
Figura 5	Coração de cão (animal B) mostrando infiltrado inflamatório mononuclear moderado entre as fibras cardíacas. H.E. Obj.20x.....	107
Figura 6	Coração de cão (animal A) evidenciando a presença de grupo de taquizoítos dentro de uma fibra cardíaca (seta). H.E. Obj.40x.....	107
Figura 7	Coração de cão (animal B) evidenciando a presença de taquizoítos delimitados dentro de fibra cardíaca (seta). H.E.Obj.40x.....	108

Figura 8	Coração de cão (animal B) mostrando marcação imunohistoquímica anti- <i>Toxoplasma gondii</i> positiva de taquizoítos. Método biotina-estreptavidina-peroxidase. DAB. Obj.40x.....	108
Figura 9	Coração de cão (animal B) mostrando marcação imunohistoquímica anti- <i>Neospora caninum</i> negativa, evidenciando somente marcação periférica (seta). Método biotina-estreptavidina-peroxidase. DAB. Obj.40x.....	109
Figura 10	Cérebro de cão (animal C) evidenciando marcação imunohistoquímica anti- <i>Toxoplasma gondii</i> positiva de cisto tecidual (seta). Método biotina-estreptavidina-peroxidase. DAB. Obj.40x.....	109
Figura 11	Cérebro de cão (animal D) mostrando marcação imunohistoquímica anti- <i>Neospora caninum</i> positiva de cisto tecidual. Note cisto sem marcação (seta). Método biotina-estreptavidina-peroxidase. DAB. Obj.40x.....	110
Figura 12	Cérebro de cão (animal D) evidenciando marcação imunohistoquímica anti- <i>Toxoplasma gondii</i> positiva de cistos teciduais. Método biotina-estreptavidina-peroxidase. DAB. Obj.40x.....	110
Figura 13	Bandas de DNA visualizadas após eletroforese de material amplificado por PCR. Linhas: 1 e 8) marcador <i>ladder</i> 100bp; 2) controle positivo (588pb); 3) controle negativo; 4) cérebro animal B; 5) coração animal B; 6) cérebro animal D; 7) coração animal D. Gel agarose 1%. Brometo de etídeo.....	111
Figura 14	Sequência de alinhamento da região espaçadora transcrita de <i>Neospora caninum</i> (Registro L49389 GenBank) e <i>Toxoplasma gondii</i> (Registro L49390 GenBank). A homologia de nucleotídeos é mostrada por *. As regiões de anelamento do <i>primer</i> Lav1 (retângulo superior) e do <i>primer</i> Tim11 (retângulo inferior) são exatamente iguais entre as duas espécies (Adaptado de Payne <i>and</i> Ellis, 1996).....	112

## LISTA DE QUADROS

### PRIMEIRA PARTE

Quadro 1	Prevalência de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> em cães de diferentes estados brasileiros.....	23
----------	--	----

### SEGUNDA PARTE

#### ARTIGO 2

Quadro 1	Resultados histopatológicos, Imuno-histoquímicos e moleculares dos cães necropsiados entre janeiro/2010 a dezembro/2011 na Universidade Federal de Lavras-MG, e que apresentaram estruturas parasitárias em cortes histológicos.....	113
----------	--	-----

## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE

#### ARTIGO 1

Tabela 1	Distribuição dos títulos de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> detectados pelo teste de imunofluorescência indireta (RIFI $\geq$ 1:50) em cães de Minas Gerais, Brasil.....	74
Tabela 2	Prevalência de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> detectados pelo teste de imunofluorescência indireta (RIFI $\geq$ 1:50) em cães das zonas urbana, rural e urbana com acesso à rural de Minas Gerais, Brasil.....	74
Tabela 3	Prevalência de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> detectados pelo teste de imunofluorescência indireta (RIFI $\geq$ 1:50) em cães de diferentes grupos etários de Minas Gerais, Brasil.....	75
Tabela 4	Fatores associados à soroprevalência de <i>Neospora caninum</i> em cães de Minas Gerais, Brasil.....	76
Tabela 5	Fatores relacionados às residências e propriedades associados à soroprevalência de <i>Neospora caninum</i> em cães de Minas Gerais, Brasil.....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS

Dr/Dra	Doutor(a)
MED	Mediana
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
Obj.	Objetiva
Pb	Pares de bases
pH	Potencial hidrogeniônico
Prof <sup>a</sup>	Professora
Q1/4	Primeiro quartil
Q3/4	Terceiro quartil

## LISTA DE SIGLAS

ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CPK	Creatina-fosfoquinase
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
dNTP	Desoxirribonucleosídeo Trifosfatado (do inglês, <i>Deoxyribonucleoside Triphosphate</i> )
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético (do inglês, <i>Ethylenediamine Tetracetic Acid</i> )
ELISA	Teste de Ensaio Imunossorbente Ligado à Enzima (do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
HE	Hematoxilina e Eosina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de Confiança
IFAT	Teste de Imunofluorescência Indireta (do inglês, <i>Indirect Fluorescent Antibody Test</i> )
IgG	Imunoglobulina G
IHQ	Imuno-histoquímica
ITS1	Região Espaçadora Transcrita Interna 1 (do inglês, <i>Internal Transcribed Spacer</i> )
MG	Minas Gerais
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
PAS	Ácido Periódico de <i>Schiff</i> (do inglês, <i>Periodic Acid-Schiff</i> )
PBS	Tampão Fosfato Salina (do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
rDNA	DNA ribossomal
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês, <i>Ribonucleic Acid</i> )
SNC	Sistema Nervoso Central
TAN	Teste de Aglutinação de <i>Neospora</i>
TBE	Tris-Borato-EDTA
UFLA	Universidade Federal de Lavras
UNESP	Universidade Estadual Paulista

## LISTA DE SÍMBOLOS

°	Símbolo masculino para números ordinais
x	Por; vezes
>	Maior que
<	Menor que
≥	Maior ou igual a
≤	Menor ou igual a
=	Igual a
n	Número; número absoluto
%	Porcentagem; por cento
®	Marca Registrada
mg	Miligrama(s)
mL	Mililitro(s)
L	Litro(s)
μL	Microlitro(s)
M	Molar
μM	Micromolar
μm	Micrometro(s)
°C	Graus Centígrados
U	Unidade(s)
V	Volts

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
1	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	17
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	20
2.1	<b>Ciclo de vida de <i>Neospora caninum</i></b> .....	20
2.2	<b>Estudos soropidemiológicos</b> .....	22
2.3	<b>Neosporose clínica canina</b> .....	24
2.4	<b>Diagnóstico</b> .....	26
2.4.1	<b>Exames de patologia clínica</b> .....	26
2.4.2	<b>Testes sorológicos</b> .....	27
2.4.3	<b>Exames patológicos</b> .....	28
2.4.4	<b>Teste de imuno-histoquímica</b> .....	31
2.4.5	<b>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento genético</b> .....	32
2.5	<b>Profilaxia e controle</b> .....	33
3	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	34
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	35
	 <b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS</b>	
	<b>ARTIGO 1 “FATORES ASSOCIADOS À SOROPREVALÊNCIA DE <i>NEOSPORA CANINUM</i> EM CÃES DE ZONAS URBANA E RURAL PRODUTORAS DE LEITE E CAFÉ DE MINAS GERAIS, BRASIL”</b> .....	46
	<b>Resumo</b> .....	46
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	47
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	49
3	<b>RESULTADOS</b> .....	53
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	56
5	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	62
	 <b>Artigo 2 “ESTUDO DA OCORRÊNCIA DE <i>NEOSPORA CANINUM</i> EM CÃES NECROPSIADOS NA REGIÃO SUL DE MINAS GERAIS, BRASIL, POR MEIO DE HISTOPATOLOGIA, IMUNO-HISTOQUÍMICA E TÉCNICAS MOLECULARES”</b> .....	79
	<b>Resumo</b> .....	79
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	80
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	83
3	<b>RESULTADOS</b> .....	87
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	90
5	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	96



**PRIMEIRA PARTE**  
**ESTUDO PROSPECTIVO DE *NEOSPORA CANINUM* EM CÃES DO SUL DE MINAS**  
**GERAIS**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A neosporose é uma doença parasitária causada pelo protozoário do filo Apicomplexa *Neospora caninum*, parasito intracelular obrigatório e formador de cistos (DUBEY et al., 2002). O relato inicial do achado de um protozoário em tecidos de cães com sintomatologia semelhante à toxoplasmose foi feito na Noruega por Bjerkås, Mohn e Presthus (1984), quando o mesmo foi verificado em uma ninhada de cães da raça boxer com meningoencefalite e miosite. Ao microscópio óptico, o parasito lembrava *Toxoplasma gondii*, mas não reagia imuno-histoquimicamente com anticorpos anti-*T. gondii*. Porém, Dubey et al. (1988), estudando tecidos de cães arquivados, confirmaram tratar-se de uma outra espécie de protozoário, sendo este denominado *N. caninum*.

Embora haja a descrição da ocorrência da doença em várias espécies, atualmente ela é considerada mais importante como causadora de distúrbios reprodutivos em bovinos, como abortamento e nascimento de natimortos, ocasionando perdas econômicas em todo o mundo (DUBEY et al., 2002). No Brasil, a neosporose em cães é pouco investigada e a maioria dos estudos se restringe à soroprevalência, sendo escassos o diagnóstico clinicopatológico e o isolamento de *N. caninum*. Na Bahia, esse parasito foi isolado de um canino, naturalmente infectado, com manifestação clínica de incoordenação motora e paresia (GONDIM et al., 2001).

A neosporose também é frequentemente descrita em cães imunossuprimidos. Segundo Lindsay, Dubey e Duncan (1999), a maioria dos filhotes de uma ninhada infectada apresenta manifestações clínicas. Alguns filhotes podem carregar a infecção subclínicamente com possível reativação após eventos imunossupressores, como corticoterapia, quimioterapia (LA PERLE et al., 2001) ou doenças intercorrentes, como a leishmaniose

(CRINGOLI et al., 2002; TARANTINO et al., 2001), causando alterações cutâneas, neurológicas ou musculares (LINDSAY; DUBEY; DUNCAN, 1999).

No Brasil, estudos utilizando diferentes testes laboratoriais, pontos de corte e grupos populacionais, mostram que a soroprevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em cães varia de 3,1 a 67,6% (ANDREOTTI et al., 2006; AZEVEDO et al., 2005; BENETTI et al., 2009; CUNHA FILHO et al., 2008; DUBEY; SCHARES, 2011; FERNANDES et al., 2004; FIGUEREDO et al., 2008; FRIDLUND-PLUGGE et al., 2008; GENNARI et al., 2002; JESUS; ALMEIDA; ATTA, 2007; LOPES A. P. et al., 2011; MINEO et al., 2001; MORAES et al., 2008; VALADAS et al., 2010). Em Lavras, um estudo realizado com animais atendidos em clínicas veterinárias privadas, no período de agosto de 2000 a abril de 2002, demonstrou uma soroprevalência de 3,1% (GUIMARÃES et al., 2009).

Estudos realizados no Sul de Minas Gerais vêm demonstrando *N. caninum* como um agente importante em casos de distúrbios reprodutivos em rebanhos bovinos leiteiros e caprinos (GUEDES et al., 2008; VARASCHIN et al., 2011). Somado a isso, a presença do parasito foi detectada por estudos imuno-histoquímicos e por PCR em tecidos de fetos bovinos (SANTOS et al., 2011) e de caprino recém-nascido e placenta de cabra proveniente de propriedade com histórico de aborto (VARASCHIN et al., 2012).

Dentre os testes sorológicos para o diagnóstico nas várias espécies animais, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) foi o primeiro teste utilizado para demonstração de anticorpos anti-*N. caninum*, sendo considerado de referência quando outros ensaios são comparados (BJÖRKMAN; UGGLA, 1999).

Na pesquisa das lesões microscópicas, achados como infiltrado inflamatório não supurativo em musculatura esquelética e miocárdio, assim como a presença de gliose, manguitos perivasculares e necrose tecidual no

encéfalo, são muito utilizados no diagnóstico, mesmo que presuntivo, da neosporose (DUBEY; LINDSAY, 1996). No entanto, as manifestações clínicas e as lesões causadas pelo *T. gondii* e *N. caninum* são semelhantes, exigindo o uso de outras técnicas mais específicas, como a imuno-histoquímica (CORBELLINI et al., 2002; PESCADOR et al., 2007b) e/ou as provas moleculares (DUBEY; BUXTON; WOUUDA, 2006) para confirmação da etiologia.

A viabilização das técnicas de diagnóstico molecular, baseadas na detecção de porções do genoma de *N. caninum*, ofereceu, entre outros benefícios, a possibilidade de superar alguns problemas de diagnóstico, principalmente em relação à baixa sensibilidade (MEDINA et al., 2006; PAYNE; ELLIS, 1996). Como a maior parte do genoma de *N. caninum* ainda não foi sequenciada, praticamente todos os trabalhos que utilizaram a PCR, para diagnóstico e filogenia, partiram de sequências altamente conservadas nos eucariotos, marcadamente a região gênica ITS1, codificadora de RNA ribossomal (PAYNE; ELLIS, 1996) e a região denominada de Nc-5 (YAMAGE; FLECHTNER; GOTTSTEIN, 1996). A região denominada de ITS1 é muito empregada, atualmente, com o objetivo diagnóstico, pois essa sequência apresenta-se espécie-específica em relação aos demais parasitos do Filo Apicomplexa e, além disso, normalmente apresenta ampliações consistentes e compatíveis, com elevada sensibilidade (OKEOMA et al., 2004).

O objetivo desta dissertação é, por meio de um estudo prospectivo, pesquisar a presença de *Neospora caninum* em cães da região Sul de Minas Gerais, realizando **(a)** estudo soropidemiológico, mostrando a soroprevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em diversos grupos populacionais de cães e análise dos fatores relacionados à mesma; **(b)** estudo de lesões compatíveis com a infecção por *N. caninum*, em cães necropsiados, e confirmação da mesma por marcação imuno-histoquímica, PCR e sequenciamento genético.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Ciclo de Vida de *Neospora caninum*

*N. caninum* pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidia, subordem Eimeriina e família Sarcocystidae, assim como os gêneros *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, *Hammondia* e *Besnoitia* (DUBEY et al., 1988).

Os cães são hospedeiros definitivos e intermediários para *N. caninum* (DUBEY et al., 2002; McALLISTER et al., 1998). O ciclo de vida do parasito apresenta três estágios infecciosos bem típicos: taquizoítos, cistos teciduais e oocistos (Figura 1). Os taquizoítos e os cistos são estágios encontrados nos hospedeiros intermediários e podem ocorrer intracelularmente (DUBEY et al., 2002). Os taquizoítos são ovoides, lunares ou globulares, medem de 3 a 7 x 1 a 5µm (dependendo do estágio de divisão) e dividem-se em dois zoítos por endodiogenia. Em carnívoros infectados, os taquizoítos são encontrados dentro de macrófagos, células polimorfonucleares, neurônios, fibroblastos, endotélio vascular, miócitos, células tubulares renais e hepatócitos (DUBEY et al., 1998). Os cistos são redondos a ovalados e são encontrados principalmente no sistema nervoso central e musculatura esquelética (DUBEY et al., 2002; PETERS et al., 2001).

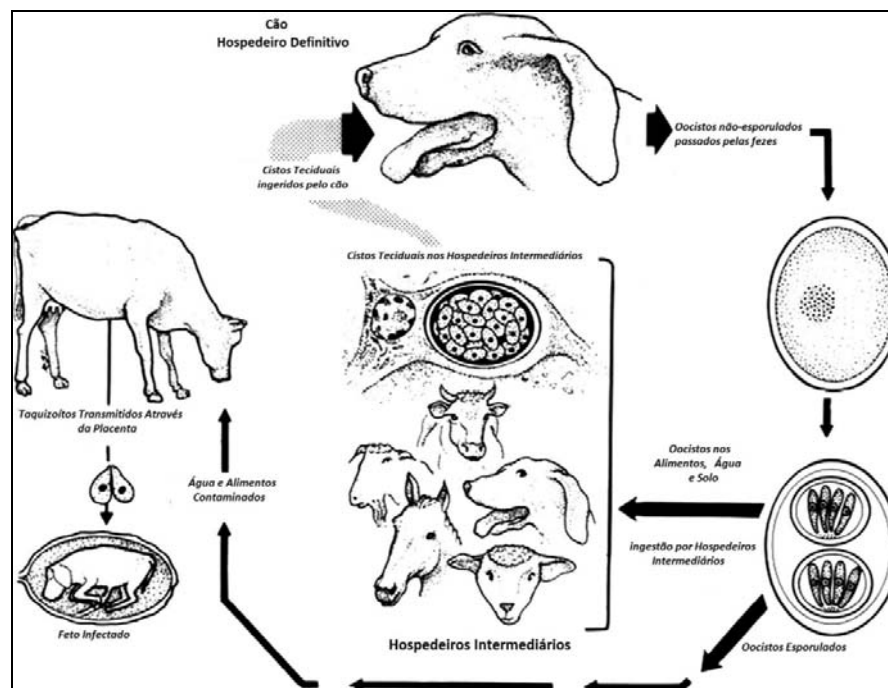


Figura 1 Ciclo de vida de *Neospora caninum*  
 Fonte: Adaptado de Dubey (2003)

Os caninos (*Canis familiaris*) (McALLISTER et al., 1998), o coiote (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004), o dingo (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e o lobo-cinzento (*Canis lupus*) (DUBEY et al., 2011) são os hospedeiros definitivos conhecidos para *N. caninum*, eliminando oocistos não esporulados pelas fezes. Estes são morfologicamente semelhantes aos oocistos de *Toxoplasma gondii* e de *Hammondia* spp, e se tornam esporulados no meio ambiente (DUBEY et al., 2002).

Os canídeos podem adquirir a infecção por meio da ingestão de tecidos infectados oriundos de hospedeiros intermediários (DIJKSTRA et al., 2001; LINDSAY; DUBEY; DUNCAN, 1999; McALLISTER et al., 1998). Do ponto de vista epidemiológico, é importante a demonstração dos oocistos nas fezes dos hospedeiros definitivos. Essa pode ser obtida com o uso de técnicas moleculares, já que os oocistos são difíceis de serem identificados nas fezes, além de serem morfologicamente semelhantes aos de outras espécies (DUBEY, 2003).

Normalmente os cães eliminam poucos oocistos e por um curto período de tempo (BASSO et al., 2001a). Os oocistos, excretados ainda não esporulados, tornam-se esporulados dentro de três a sete dias, dividindo-se em dois esporocistos com quatro esporozoítos cada, fase em que são infectantes (MELO; LEITE; LEITE, 2005). A fase enteroepitelial desse parasita nos cães não está bem definida e, do mesmo modo, muito pouco é conhecido da frequência de sua eliminação e sobre a resistência dos oocistos fora do hospedeiro (CEDILLO et al., 2008).

Em cadelas naturalmente infectadas, pode haver transmissão transplacentária e, geralmente, os sinais clínicos são consequência dessa infecção congênita. Acredita-se que cadelas cronicamente infectadas desenvolvem parasitemia durante a gestação, infectando os fetos. Ninhadas sucessivas da mesma mãe, subclínicamente infectada, podem nascer infectados, embora talvez aconteça em taxas reduzidas. A maioria dos filhotes de uma ninhada apresenta manifestações clínicas. No entanto, outros filhotes podem carregar a infecção subclínicamente com possível reativação, causando alterações cutâneas, neurológicas ou musculares, após eventos imunossupressores, como corticoterapia, quimioterapia ou doenças intercorrentes (LINDSAY; DUBEY; DUNCAN, 1999).

## **2.2 Estudos soropidemiológicos**

No Brasil, estudos de soroprevalência mostram variações amplas quanto aos títulos de anticorpos anti-*N. caninum* analisados, conforme demonstra o quadro 1.

Quadro 1 Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães de diferentes estados brasileiros

Cidade/Estado	População do Estudo	Prevalência (%)	Referência
Lavras-MG	CH	3,1	Guimarães et al. (2009)
RS	U	5,5	Cunha Filho et al. (2008)
Uberlândia-MG	CH	6,7	Mineo et al. (2001)
PB	U/R	8,4	Azevedo et al. (2005)
São Paulo-SP	D	10,0	Gennari et al. (2002)
PA	R	11,1	Valadas et al. (2010)
PR	U	12,7	Fridlund-Plugge et al. (2008)
PA	E	14,0	Valadas et al. (2010)
PR	PU	15,7	Fridlund-Plugge et al. (2008)
Uberlândia-MG	PU	18,9	Fernandes et al. (2004)
RS	R	20,4	Cunha Filho et al. (2008)
Uberlândia-MG	R	21,7	Fernandes et al. (2004)
São Paulo-SP	E	25,0	Gennari et al. (2002)
PR	R	25,3	Fridlund-Plugge et al. (2008)
Botucatu-SP	FC	25,4	Moraes et al. (2008)
PE	D	28,3	Figueredo et al. (2008)
PI	U	30,2	Lopes, M. G. et al. (2011)
Uberlândia-MG	U	32,0	Fernandes et al. (2004)
Salvador-BA	U	32,7	Jesus, Almeida e Atta (2007)
MT	FL	67,6	Benetti et al. (2009)

U: Urbana; PU: Periurbana; R: Rural; CH: Clínicas/Hospitais Veterinários; FL: Fazenda de Leite; FC: Fazenda de Corte; D: Domiciliados; E: Errantes.

A infecção natural em cães é descrita mundialmente, sendo que a soroprevalência varia entres os países e entre diferentes regiões dentro de um



mesmo país. Em uma mesma região, a soroprevalência pode variar de acordo com a raça do animal, a sua utilidade (caça, pastoreio ou de estimação), a procedência do mesmo (urbano x rural, cão de rua x animal de estimação), o tipo de alimentação, dentre outros fatores (SICUPIRA et al., 2012). A infecção é mais frequente em cães de áreas rurais (fazenda de corte ou leiteiras), como o demonstrado por vários autores (FERNANDES et al., 2004; FERROGLIO et al., 2007; HADDADZADEH et al., 2007; SICUPIRA et al., 2012). Basso et al. (2001b), num estudo em 320 cães da Argentina, tanto da área rural como urbana, obtiveram uma soropositividade de 48,0% em cães de fazendas leiteiras e 54,2% em cães de fazendas de gado corte, sendo que, os cães de áreas urbanas apresentaram uma positividade de 26,2%. Isso se deve ao fato de os animais daquelas áreas terem maior facilidade de contato com carne e vísceras bovinas infectadas ou pelo hábito de caçar pequenos mamíferos, enquanto os cães domiciliados, criados em áreas urbanas, são alimentados principalmente com rações comerciais. Dentro da propriedade rural, Paradies et al. (2007) encontraram soroprevalência maior em animais que são criados soltos do que nos que ficam fechados ou acorrentados. Alguns estudos sorológicos sugerem que a soroprevalência aumenta com a idade, possivelmente devido à ingestão constante de tecidos infectados (ANDREOTTI et al., 2006; BASSO et al., 2001b); é mais alta em machos, pelo hábito mais errante que das fêmeas (KRAMER; DERISO; TRANQUILLO, 2004); e é mais frequente em cães sem raça definida que em cães puros (FERNANDES et al., 2004).

### **2.3 Neosporose clínica canina**

Nos cães, os sinais clínicos da neosporose são muitos semelhantes aos da toxoplasmose, exceto pelos déficits neurológicos e musculares, os quais são predominantes na primeira. Os sinais clínicos poderão variar de acordo com o

órgão afetado, sendo que em infecções congênicas poderá ocorrer morte fetal prematura, mumificação, reabsorção fetal e o nascimento de crias fracas. Embora o aborto seja o principal achado da doença nos bovinos, não há registros de aborto por *N. caninum* em cães (DUBEY; LINDSAY, 1996).

Animais de qualquer idade podem ser infectados, mas parece que filhotes são mais acometidos, principalmente pela forma neurológica. Geralmente, os casos mais graves da doença ocorrem justamente nos filhotes congenitamente infectados. Esses cães jovens desenvolvem paralisia dos membros posteriores, que evolui de forma progressiva (MELO; LEITE; LEITE, 2005). No cão adulto, são descritas incoordenação e paresia dos membros posteriores (GONDIM et al., 2001).

Os sinais neurológicos, que dependem do sítio parasitado, podem se expressar como hiperextensão rígida dos membros posteriores, dificuldade em deglutir, paralisia mandibular, flacidez e atrofia musculares e paralisia de nervos faciais (BARBER; TREES, 1996; DUBEY, 2003; DUBEY; LINDSAY, 1996). Os membros posteriores são mais gravemente afetados que os anteriores e, frequentemente, apresentam-se em hiperextensão rígida. A causa dessa hiperextensão não é conhecida, mas provavelmente ocorre em decorrência de uma combinação de paralisia do neurônio motor superior e miosite, que resulta em uma contratura fibrosa progressiva rápida dos músculos, podendo causar a fixação do joelho (artrogrifose). Outros sinais incluem fraqueza progressiva dos membros posteriores, evoluindo para tetraplegia, inclinação cervical, incapacidade para apreender o alimento ou disfagia, regurgitação (secundária ao megaesôfago), ataxia, tremores de cabeça, andar hipermétrico, hiperreflexia, incontinência, anorexia, polidipsia, pirexia, convulsões, alterações de comportamento e colapso súbito por causa da miocardite. Os cães não desenvolvem manifestações centrais graves e se mantêm alertas (BARBER;

PAYNE-JOHNSON; TREES, 1996; DUBEY, 2003; DUBEY; LINDSAY, 1996; MELO; LEITE; LEITE, 2005).

Têm sido relatados também casos de dermatite, miocardite e pneumonia (BARBER; TREES, 1996; DUBEY, 2003; DUBEY; LINDSAY, 1996). Neosporose cutânea tem sido descrita em cães imunossuprimidos por doenças concomitantes, como a leishmaniose (CRINGOLI et al., 2002; TARANTINO et al., 2001) ou por terapia medicamentosa (LA PERLE et al., 2001).

## **2.4 Diagnóstico**

Para o diagnóstico da neosporose, além de uma anamnese muito bem conduzida e dos sinais clínicos, devem ser realizados vários tipos de exames laboratoriais *ante-mortem*, e, quando o caso permitir, o diagnóstico *post-mortem* (MELO; LEITE; LEITE, 2005).

### **2.4.1 Exames de patologia clínica**

Os achados hematológicos e bioquímicos de cães com neosporose variam, dependendo dos órgãos envolvidos e, em geral, não são úteis para confirmar um diagnóstico de neosporose. Ao hemograma, poderá ser vista leucopenia. Nos casos em que os músculos estão envolvidos, a atividade plasmática das enzimas creatina-fosfoquinase (CPK) e aspartato amino-transferase (AST) estarão elevadas; assim, a atividade da CPK pode ajudar a diferenciar uma miosite de uma paresia/paralisia puramente neurológica. A alanina amino-transferase (ALT) sérica está aumentada em cães que desenvolvem inflamação hepática (BARBER; TREES, 1996; GREENE, 2006).

O exame do líquido cefalorraquidiano (líquor) poderá indicar uma condição infecciosa e inflamatória, devido ao aumento na quantidade de

proteínas e células inflamatórias, e a presença de taquizoítos no sedimento indicará um diagnóstico de encefalomielite protozoária (BARBER; TREES, 1996).

Nas fezes de cães, os oocistos de *N. caninum* (medindo de 10-14µm) são muito similares, morfológicamente, aos de *Hammondia heydorni* e podem ser visualizados utilizando a técnica de flotação (SCHARES et al., 2001).

#### **2.4.2 Testes sorológicos**

A partir do primeiro isolamento de *N. caninum*, testes sorológicos como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), teste de aglutinação de *Neospora* (TAN) e vários testes do ensaio imunossorbente ligados à enzima (ELISA), foram desenvolvidos para o diagnóstico em cães, bovinos e outros animais potencialmente hospedeiros (ATKINSON et al., 2000). A RIFI foi o primeiro teste utilizado para demonstração de anticorpos anti-*N. caninum*, sendo considerado de referência quando outros ensaios são comparados (BJÖRKMAN; UGGLA, 1999). Na realidade, a sorologia ainda deve ser vista de forma presuntiva, porque a presença de anticorpos não é diagnóstica para a doença clínica, já que muitos cães soropositivos permanecem saudáveis (MELO; LEITE; LEITE, 2005).

Na RIFI, como antígenos, são utilizados taquizoítos íntegros e o teste detecta anticorpos direcionados para antígenos presentes sobre a superfície do parasita. Nas espécies do filo Apicomplexa, os antígenos de membrana são considerados mais específicos que os componentes intracelulares (BJÖRKMAN; UGGLA, 1999). O valor do “*cut-off*” para RIFI pode diferir de um laboratório para o outro, mas frequentemente os títulos situam-se na faixa de 1:50 (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2008; FIGUEREDO et al., 2008; REGIDOR-CERRILLO et al., 2010; SICUPIRA et al., 2012), mesmo alguns

pesquisadores considerando um limiar de 1:200 como indicativo de soropositividade (DUBEY; LINDSAY, 1996; SILVA et al., 2007).

Títulos positivos podem existir em cães previamente expostos que possam estar infectados, mesmo assintomáticos, com valores de 1:800 ou mais durante anos. Anticorpos maternos podem ser passados para os filhotes, levando a interpretações falso-positivas. Contudo, quando os filhotes não estão infectados, esses níveis caem após o 32º dia de vida (GREENE, 2006). Barber, Payne-Johnson e Trees (1996) chegaram a encontrar títulos de anticorpos de até 1:51200 em um filhote com sintomatologia neuromuscular.

Em um estudo, Barber e Trees (1998) observaram que cadelas com altos títulos de anticorpos (1:12800) puderam transmitir o parasito para 35 a 96% da descendência, com alta incidência da doença clínica nos filhotes. Cadelas com título de anticorpos entre 1:200 a 1:800 tiveram uma taxa de transmissão placentária de 20 a 44% e cadelas com baixos títulos transmitiram o parasito para apenas 4 a 14% dos filhotes, sendo que a maioria destes nasceu assintomática.

### **2.4.3 Exames patológicos**

Lesões macroscópicas causadas pelo *N. caninum* são raras, porém durante a necropsia, nos casos de neosporose canina, poderão ser vistas áreas multifocais de necrose no SNC e fígado; fibrose, mineralização e estrias branco-amareladas na musculatura esquelética, especialmente no diafragma; hepatomegalia, pneumonia, hipoplasia cerebelar e dermatite ulcerativa (DUBEY; LINDSAY, 1996).

Em caninos, amostras do cérebro, pulmões, coração, fígado, esôfago, intestino, baço, linfonodos, pâncreas, rins, língua e musculatura estriada devem ser coletadas para análise histopatológica (BASSO et al., 2005; JESUS;

ALMEIDA; ATTA, 2007; MESECK et al., 2005). A ocorrência de cistos é descrita somente no cérebro, medula espinhal (BARR et al., 1995, DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006) e no músculo esquelético (PETERS et al., 2001), porém taquizoítos já foram observados em células de diversos órgãos de animais infectados (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006; DUBEY; LINDSAY, 1996).

Filhotes, com menos de seis meses de idade, com infecção disseminada, podem apresentar estágios parasitários no timo, fígado, rins, estômago, adrenais, pele, dentre outros tecidos. Encefalomielite não supurativa, polirradiculoneurite, ganglioneurite, miosite (de todos os músculos estriados) e miofibrose são os achados histológicos predominantes (GREENE, 2006).

No SNC, a distribuição das lesões é descrita em ordem decrescente de intensidade na substância cinzenta cortical, diencéfalo, mesencéfalo, cerebelo e medula oblonga (HELMAN et al., 1998). Há uma tendência para o córtex ter mais lesões do que a porção média e superior do tronco cerebral. No entanto, necrose cortical e inflamação do cerebelo podem ser os achados predominantes em alguns cães (GREENE, 2006). Barber, Payne-Johnson e Trees (1996) reportaram que a substância cinzenta é mais gravemente afetada no cérebro, enquanto na medula espinhal ocorre mais frequentemente na substância branca.

Barber, Payne-Johnson e Trees (1996) argumentam que há uma ampla distribuição inicial dos taquizoítos na fase aguda da doença, com uma subsequente restrição aos tecidos neuromusculares, sendo que os músculos mais frequentemente afetados em cães são o quadríceps femoral, masseter e músculos temporais, mas também foram vistos na musculatura do esôfago e cardíaca.

As lesões histopatológicas produzidas pela neosporose em várias espécies animais são caracterizadas por infiltrado de células inflamatórias, composto basicamente por mononucleares, o qual pode ser encontrado principalmente no SNC, coração, músculo esquelético, fígado (CORBELLINI et al., 2002; DUBEY; LINDSAY, 1996) e pulmão

(PESCADOR et al., 2007a), associadas ou não a áreas multifocais de necrose (CORBELLINI et al., 2002).

As lesões produzidas no cérebro consistem de encefalite não supurativa, caracterizada por múltiplos focos de infiltrados inflamatórios mononucleares, geralmente ao redor de um centro de necrose, gliose (CORBELLINI et al., 2002; DUBEY; LINDSAY, 1996; HELMAN et al., 1998; VARASCHIN et al., 2012) e manguitos perivasculares multifocais (CORBELLINI et al., 2002; HELMAN et al., 1998; VARASCHIN et al., 2012). No coração, se observa miocardite não supurativa moderada à acentuada (CORBELLINI et al., 2002; HELMAN et al., 1998) e as lesões hepáticas consistem de infiltrado mononuclear periportal e focos de necrose hepatocelular associado com trombose intrassinusoidal (BARR et al., 1990).

Em infecções bovinas experimentais, na placenta foi observada necrose das vilosidades placentárias fetais, necrose e inflamação nas áreas adjacentes ao septo materno e inflamação na base das carúnculas maternas (MALEY et al., 2006).

Poucas estruturas parasitárias são observadas na coloração de hematoxilina e eosina (HE) (CORBELLINI et al., 2002; DUBEY, 2003; DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006). Estas podem ser detectadas em diversos órgãos, sendo que, em cães, os cistos só foram visualizados no sistema nervoso e musculatura esquelética. Os cistos de *N. caninum* apresentam uma parede mais espessa ( $>1\mu\text{m}$ ) que os de *T. gondii* ( $<0,5\mu\text{m}$ ) e, por isso, esta cora-se positivamente à técnica histoquímica de PAS (ácido periódico de Schiff) apenas para *N. caninum* (DUBEY et al., 2002).

#### 2.4.4 Teste de imuno-histoquímica

A presença e caracterização do parasita, por meio da técnica de imuno-histoquímica, associada ou não às lesões, é uma das formas de diagnóstico, amplamente utilizada para a neosporose (DUBEY et al., 2007; LINDSAY; DUBEY; DUNCAN, 1999; PESCADOR et al., 2007a). Um dos principais diagnósticos diferenciais para a neosporose é a toxoplasmose e a imuno-histoquímica permite a distinção entre os parasitas, por ser uma técnica específica (DUBEY et al., 2002).

A imuno-histoquímica pode ter mais de 80% de sensibilidade diagnóstica (CORBELLINI et al., 2002) e permite uma melhor visualização das estruturas parasitárias nos tecidos, sendo extremamente importante nas fases iniciais e/ou em lesões discretas (BARR et al., 1990; CORBELLINI et al., 2002). Os últimos autores visualizaram grupos de taquizoítos ao redor de vasos sanguíneos, associados à resposta inflamatória mínima, no encéfalo de dois fetos bovinos de quatro meses de idade.

Um dos anticorpos (policlonais) mais frequentemente utilizados e com resultados positivos, é o anti-*N. caninum*, produzido em cabras (Veterinary Medical Research Development, Pullman, USA) (CORBELLINI et al., 2002; HELMAN et al., 1998), associado à técnica da “Biotina-Estreptavidina-Peroxidase”, que é frequentemente descrita como tendo resultados positivos (CORBELLINI et al., 2002; PESCADOR et al., 2007a). No entanto, Park et al. (2007) relatam um caso de toxoplasmose cutânea em um gato com dupla marcação imuno-histoquímica para *T. gondii* e *N. caninum*, comentando que reações inespecíficas podem ocorrer quando se utilizam anticorpos policlonais.

Por meio dessa técnica, são descritos números variáveis de taquizoítos marcados com o anticorpo anti-*N. caninum*, mais frequentemente no encéfalo e



em menor número de casos no miocárdio (CORBELLINI et al., 2002; HELMAN et al., 1998). Grande ou pequena quantidade de cistos encefálicos, associados ou não às lesões, pode ser positiva por essa técnica (CORBELLINI et al., 2002; HELMAN et al., 1998).

#### **2.4.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento genético**

A PCR pode ser usada para detectar especificamente *N. caninum* e para diferenciar a infecção por outros protozoários (GREENE, 2006). No caso da PCR para cães, os principais tecidos escolhidos para detecção do parasito são o cérebro, cordão medular, musculatura esquelética, coração, pulmões, fígado, baço, rins e glândulas salivares (DIJKSTRA et al., 2001; GONDIM et al., 2001).

A viabilização das técnicas de diagnóstico molecular, baseadas na detecção de porções do genoma de *N. caninum*, ofereceu, entre outros benefícios, a possibilidade de superar alguns problemas de diagnóstico, principalmente em relação à sensibilidade insuficiente (MEDINA et al., 2006; PAYNE; ELLIS, 1996). Desde meados da década de 1990, várias foram as estratégias desenvolvidas nesse sentido, destacando-se as técnicas de sequenciamento de material genômico clonado (MARSH; GAUTHIER; VASTA, 1995), PCR simples e “*Nested*” (ELLIS, 1998; PAULA et al., 2004), testes de hibridização de DNA (MULLER et al., 1996), “*multiplex*” PCR (MESECK et al., 2005) e “*real-time*” PCR (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006; GHALMI et al., 2008).

Como a maior parte do genoma de *N. caninum* ainda não foi sequenciada, praticamente todos os trabalhos que desenvolveram PCRs para diagnóstico e filogenia partiram de seqüências altamente conservadas nos eucariotos, marcadamente a região gênica codificadora de RNA ribossomal ITS1 (PAYNE; ELLIS, 1996) e a região denominada de Nc-5 (YAMAGE; FLECHTNER; GOTTSTEIN, 1996).

## 2.5 Profilaxia e controle

As recomendações para a profilaxia e controle da infecção por *N. caninum* têm sido direcionadas no sentido de evitar colocar em reprodução cadelas soropositivas que já tenham apresentado sintomatologia compatível ou mesmo que tenham produzido filhotes infectados e doentes (MELO; LEITE; LEITE, 2005).

Em relação à transmissão horizontal, deve-se evitar que esses carnívoros se alimentem de carne ou vísceras cruas, principalmente os animais de áreas rurais (DIJKSTRA et al., 2001).

Os fetos abortados e restos placentários devem ser descartados em locais adequados, para prevenir o seu consumo por cães, já que não existem vacinas comerciais efetivas disponíveis no mercado (MELO; LEITE; LEITE, 2005).

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A infecção por *Neospora caninum* ocorre em cães da região Sul de Minas Gerais, sendo que a soroprevalência de anticorpos anti-*N. caninum* é maior em cães da zona rural, principalmente de propriedades leiteiras e com histórico de aborto bovino, que não se alimentam de ração comercial, que apresentam histórico de distúrbios reprodutivos e que são utilizados para caça. No entanto, ele não é um importante agente causador de lesões ou doença clínica nos cães.

O uso específico dos *primers* Lav1/Tim11 em PCR do tipo convencional é útil na detecção de infecção protozoária. No entanto, para diferenciação entre *N. caninum* e *Toxoplasma gondii* é necessária a realização de *nested* ou *semi-nested* PCR ou sequenciamento genético.

## REFERÊNCIAS

ANDREOTTI, R. et al. Occurrence of *Neospora caninum* in dogs and its correlation with visceral leishmaniasis in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 135, n. 3/4, p. 375-379, 2006.

ATKINSON, R. et al. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 16, p. 110-114, 2000.

AZEVEDO, S. S. et al. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 79, n. 1, p. 51-56, 2005.

BARBER, J. S.; PAYNE-JOHNSON, C. E.; TREES, A. J. Distribution of *Neospora caninum* within the central nervous system and other tissues of six dogs with clinical neosporosis. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 37, p. 568-574, 1996.

BARBER, J. S.; TREES, A.J. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. **Veterinary Record**, London, v. 139, p. 439-43, 1996.

BARBER, J. S.; TREES, A. J. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, p. 57-64, 1998.

BASSO, W. et al. Confirmed clinical *Neospora caninum* infection in a Boxer puppy from Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 131, p. 299-303, 2005.

BASSO, W. et al. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 87, n. 3, p. 612-18, 2001a.

BASSO, W. et al. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms and from urban areas of Argentina. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 87, n. 4, p. 906-7, 2001b.

BARR, B. C. et al. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 27, n. 5, p. 354-61, 1990.

BARR, B. C. et al. Diagnosis of bovine foetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. **Veterinary Record**, London, v. 137, p.611-613, 1995.

BENETTI, A.H. et al. Inquiry of antibodies anti-*Neospora caninum* in dairy cattle, dogs and rural workers of the south-west region of Mato Grosso State. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, p. 29-33, 2009. Supl.1.

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.

BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 10, p. 1497-507, 1999.

CEDILLO, C. J. R. et al. Models for experimental infection of dogs fed with tissue from fetuses and neonatal cattle naturally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 154, p. 151-155, 2008.

COLLANTES-FERNANDEZ, E. et al. Comparison of *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions between epidemic and endemic bovine abortion cases. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 142, p. 187-191, 2006.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E. et al. Seroprevalence and risk factors associated with *Neospora caninum* infection in different dog populations in Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 152, p. 148-151, 2008.

CORBELLINI, L. G. et al. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 103, p. 195-202, 2002.

CRINGOLI, G. et al. Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 106, p. 307-13, 2002.

CUNHA FILHO, N. S. et al. Fatores de risco e prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães urbanos e rurais do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, p. 301-306, 2008. Supl.1.

DIJKSTRA, T. et al. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrums spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 31, p. 747-752, 2001.

DUBEY, J. P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 134, p. 267-289, 2006.

DUBEY, J. P. et al. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, p. 1293-1304, 1998.

DUBEY, J. P. et al. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 181, p. 382-387, 2011.

DUBEY, J. P. et al. Neosporosis in Beagle dogs: clinical signs, diagnosis, treatment, isolation and genetic characterization of *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 149, p. 158-166, 2007.

DUBEY, J. P. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 193, p. 1269-1283, 1988.

DUBEY, J. P. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidian. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 32, p. 929-946, 2002.

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

DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 41, p. 1-16, 2003.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals – The last five years. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 180, p. 90-108, 2011.

ELLIS, J. T. Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, p. 1053-1060, 1998.

FERNANDES, B. C. T. M. et al. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 123, p. 33-40, 2004.

FERROGLIO, E. et al. Seroprevalence of Antibodies to *Neospora caninum* in Urban and Rural Dogs in North-West Italy. **Zoonoses and Public Health**, Berlin, v. 54, p. 135-139, 2007.

FIGUEREDO, L. A. et al. Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs from Pernambuco, Northeast Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 157, p. 9-13, 2008.

FRIDLUND-PLUGGE, N. et al. Frequency of antibodies against *Neospora caninum* in stray and domiciled dogs from urban, periurban and rural areas from Paraná state, southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, n. 4, p. 222-226, 2008.

GENNARI, S. M. et al. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 106, n. 2, p. 177-179, 2002.

GHALMI, F. et al. Detection of *Neospora caninum* in dog organs using real time PCR systems. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 155, p. 161-167, 2008.

GONDIM, L. F. P. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 34, p. 159-161, 2004.

GONDIM, L. F. P. et al. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 101, p. 1-7, 2001.

GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3th ed. Canada: Elsevier, 2006. 1387 p.

GUEDES, M. H. P. et al. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas e fetos provenientes de municípios do sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, n. 4, p. 189-194, 2008.

GUIMARÃES, A. M. et al. Factors associated the seropositivity for *Babesia*, *Toxoplasma*, *Neospora* e *Leishmania* in dogs attended at nine veterinary clinics in the municipality of Lavras, MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, p. 49-53, 2009. Suppl. 1.

HADDADZADEH, H. R. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from rural and urban environments in Tehran, Iran. **Parasitology Research**, Berlin, v. 101, p. 1563-1565, 2007.



HELMAN, R. G. et al. Neosporal abortion in Oklahoma cattle with emphasis on the distribution of brain lesions in aborted fetuses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 10, p. 292-295, 1998.

JESUS, E. E. V.; ALMEIDA, M. A. O.; ATTA, A. M. Anti-neosporal IgG and IgE antibodies in canine neosporosis. **Zoonoses and Public Health**, Berlin, v. 54, p. 387-92, 2007.

KING, J. S. et al. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 945-950, 2010.

KRAMER, L.; DERISO, L.; TRANQUILLO, V. M. Analysis of risk factors associated with seropositivity to *Neospora caninum* in dogs. **Veterinary Record**, London, v. 154, p. 692-693, 2004.

LA PERLE, K. M. D. et al. Cutaneous neosporosis in two adult dogs on chronic immunosuppressive therapy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 13, p. 252-255, 2001.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 82, p. 327-33, 1999.

LOPES, M. G. et al. Presence of antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* in dogs from Piauí. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 20, n. 2, p. 111-114, 2011.

LOPES, A. P. et al. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in Dogs From Northeastern Portugal. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 97, n. 3, p. 418-20, 2011.

MALEY, S. W. et al. Characterization of the immune response in the placenta of cattle experimentally infected with *Neospora caninum* in early gestation. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 135, p. 130-141, 2006.

MARSH, A. G.; GAUTHIER, J. D.; VASTA, G. R. A semiquantitative PCR assay for assessing *Perkinsus marinus* infections in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 81, n. 4, p. 577-83, 1995.

McALLISTER, M. M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, 1998.

MEDINA, L. et al. Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, Mexico. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 136, p. 187-191, 2006.

MELO, C. B.; LEITE, R. C.; LEITE, R. C. Infecção por *Neospora caninum* em cães e outros carnívoros. **Revista CFMV**, Brasília, v. 11, n. 35, p. 32-43, 2005.

MESECK, E. K. et al. Use of a multiplex polymerase chain reaction to rapidly differentiate *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* in an adult dog with necrotizing myocarditis and myocardial infarct. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 17, p. 565-568, 2005.

MINEO, T. W. P. et al. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 98, n. 4, p. 239-245, 2001.

MORAES, C. C. G. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães da microrregião da serra de Botucatu, estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, n. 1, p. 1-6, 2008.

MULLER, N. et al. Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, p. 2850-2852, 1996.

OKEOMA, C. M. et al. The use of PCR to detect *Neospora caninum* DNA in the blood of naturally infected cows. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 122, p. 307-315, 2004.

PARADIES, P. et al. Risk factors for canine neosporosis in farm and kennel dogs in southern Italy. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 145, p. 240-244, 2007.

PARK, C. H. et al. Cutaneous Toxoplasmosis in a Female Japanese Cat. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 44, p. 683-687, 2007.

PAULA, V. S. et al. 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, p. 581-585, 2004.

PAYNE, S.; ELLIS, J. Detection of *Neospora caninum* DNA by the Polymerase Chain Reaction. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 26, p. 347-51, 1996.

PESCADOR, C. A. et al. Histopathological and immunohistochemical aspects of *Neospora caninum* diagnosis in aborted fetuses. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 150, p. 159-63, 2007a.

PESCADOR, C. A. et al. Perdas reprodutivas associadas com infecção por *Toxoplasma gondii* em caprinos no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 4, p. 167-171, 2007b.

PETERS, M. et al. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 31, p. 1144-1148, 2001.

REGIDOR-CERRILLO, J. et al. *Neospora caninum* infection in stray and farm dogs: seroepidemiological study and oocyst shedding. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 174, p. 332-5, 2010.

SANTOS, D. S. et al. *Neospora caninum* in bovine fetuses of Minas Gerais, Brazil: genetic characteristics of rDNA. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 20, n. 4, p. 281-288, 2011.

SCHARES, G. et al. *Hammondia heydorni*-like oocysts shed by a naturally infected dog and *Neospora caninum* NC-1 cannot be distinguished. **Parasitology Research**, Berlin, v. 87, p. 808-816, 2001.

SICUPIRA, P. M. L. et al. Factors associated with infection by *Neospora caninum* in dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 185, p.305-308, 2012.

SILVA, D. A. O. et al. Evaluation of serological testes for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 143, p. 234-244, 2007.

TARANTINO, C. et al. *Leishmania infantum* and *Neospora caninum* simultaneous skin infection in a young dog in Italy. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 102, p. 77-83, 2001.

VALADAS, S. et al. Occurrence of antibodies anti-*Neospora caninum*, anti-*Toxoplasma gondii*, and anti-*Leishmania chagasi* in serum of dogs from Pará State, Amazon, Brazil. **Parasitology Research**, Berlin, v. 107, n. 2 , p. 453-457, 2010.

VARASCHIN, M. S. et al. Congenital neosporosis in goats from the State of Minas Gerais, Brazil. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 50, n. 1, p. 63-67, Mar. 2012.

VARASCHIN, M. S. et al. Fatores associados a soroprevalência de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em rebanhos caprinos na região sul de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 1, p. 53-58, 2011.

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, p. 272-79, 1996.

**SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**

**ARTIGO 1**

(Este artigo será submetido à revista *Veterinary Parasitology*)

**FATORES ASSOCIADOS À SOROPREVALÊNCIA DE *Neospora caninum* EM CÃES DE ZONAS URBANA E RURAL PRODUTORAS DE LEITE E CAFÉ DE MINAS GERAIS, BRASIL**

**FACTORS ASSOCIATED WITH SEROPREVALENCE OF *Neospora caninum* IN DOGS FROM URBAN AND RURAL AREAS OF MILK AND COFFEE PRODUCTION IN MINAS GERAIS STATE, BRAZIL**

**Resumo**

Este estudo foi realizado para determinar a soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e investigar os fatores de risco relacionados à sorologia em cães de zonas urbana e rurais com diferentes padrões de atividades econômicas (produção de leite e de café) em Minas Gerais, Brasil. Para isto, 703 amostras de sangue de cães foram coletadas e um questionário contendo variáveis epidemiológicas foi respondido por cada proprietário do animal no momento da coleta. O soro obtido foi analisado para anticorpos anti-*N. caninum* por teste de imunofluorescência indireta (RIFI $\geq$ 1:50). Dos 703 cães, 80 (11,4%) foram positivos para *N. caninum*. Cães que não recebiam ração industrial, de áreas rurais, de propriedades leiteiras principalmente com histórico de aborto bovino,

que eram utilizados para caça, que apresentavam histórico de distúrbios reprodutivos apresentaram maiores chances de soropositividade ( $p < 0,05$ ).

**Palavras-Chave:** neosporose; canino; soropidemiologia; fatores de risco.

## 1. Introdução

*Neospora caninum* é um protozoário Apicomplexa, família Sarcocystidae (Dubey et al., 1988) que apresenta o cão (*Canis familiaris*) (McAllister et al., 1998), o coiote (*Canis latrans*) (Gondim et al., 2004), o dingo australiano (*Canis lupus dingo*) (King et al., 2010) e o lobo cinzento (*Canis lupus*) (Dubey et al., 2011) como hospedeiros definitivos.

A neosporose é mundialmente reconhecida como uma das principais causas de aborto, natimortos e infertilidade em bovinos (Dubey, 2003). Nos cães, o parasito pode atingir diversos órgãos, principalmente o sistema nervoso central, além de músculos, coração, fígado, rins, pulmões e pele, causando sintomas como paralisia neuromuscular progressiva, principalmente dos membros pélvicos, dificuldade de deglutição, paralisia de mandíbula, flacidez e atrofia musculares e até insuficiência cardíaca (Dubey & Lindsay, 1996; Dubey, 2003).

Nos cães, esta doença é transmitida por meio da infecção vertical (placentária) e horizontal (ingestão de cistos em tecidos de hospedeiros intermediários) (Dubey et al., 2007). Estudos realizados no Brasil, utilizando



diferentes técnicas sorológicas, mostram a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em cães provenientes de diferentes estados brasileiros, com grandes diferenças na soroprevalência entre os diversos grupos populacionais, variando de 3,1 a 67,7% (Gennari et al., 2002; Cañón-Franco et al., 2003; Azevedo et al., 2005; Andreotti et al., 2006; Jesus et al., 2007; Romanelli et al., 2007; Cunha Filho et al., 2008; Figueredo et al., 2008; Fridlund-Plugge et al., 2008; Moraes et al., 2008; Benetti et al., 2009; Valadas et al., 2010). Em Minas Gerais, o estado maior produtor leiteiro do país, a soroprevalência varia de 3,1 a 14% em distintos grupos populacionais e regiões estudadas (Mineo et al., 2001; Fernandes et al., 2004; Mineo et al., 2004; Guimarães et al., 2009) e a presença do parasito tem sido demonstrada, Imuno-histoquimicamente ou por PCR, em fetos bovinos (Santos et al., 2011) e, congenitamente em caprinos (Varaschin et al., 2012), no entanto há poucos estudos soropidemiológicos envolvendo grupos populacionais rurais neste estado.

Embora estudos realizados no Brasil apontem que cães de zona rural apresentam maior soroprevalência se comparados aos de área urbana (Fernandes et al., 2004; Sicupira et al., 2011), até o momento não há pesquisas que comparem a soroprevalência entre diferentes ambientes rurais com distintas atividades econômicas, o que é uma característica econômica do Brasil. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em cães da área urbana (sem ou com sintomatologia neuromuscular) e rural

(propriedades de gado de leite ou de cultivo de café), além de avaliar os possíveis fatores de risco associados à soropositividade desses animais nesses distintos ambientes.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1 Local do estudo*

Este estudo foi realizado em duas microrregiões do estado de Minas Gerais, Brasil: Lavras e Varginha (Figura 1). O estado de Minas Gerais, localizado na região sudeste, é atualmente o maior produtor de leite do país, com uma produção de 8,4 bilhões de litros de leite durante o ano de 2010 (27,3% de toda a produção nacional neste período), além de ser também o maior produtor nacional de café, produzindo 2,9 milhões de toneladas, metade de toda a produção nacional (IBGE, 2011).

A Microrregião de Lavras possui um rebanho bovino efetivo de 131 mil cabeças e produz aproximadamente 123 milhões de litros de leite/ano, enquanto a microrregião de Varginha se destaca na produção cafeeira, apresentando uma produção aproximada de 157 mil toneladas de café/ano em 120 mil hectares de área plantada (IBGE, 2011).

## 2.2 Amostragem

A amostragem dos cães foi calculada com base na população humana das duas regiões de estudo, que é de aproximadamente 580 mil habitantes. Para o cálculo da relação cão: homem, foi usada a proporção de um cão para cada dez habitantes (Reichmann et al., 1999), estimando-se um total de 58 mil cães.

Para o cálculo do tamanho amostral (Thrusfield, 2007), foi utilizado o programa EpiInfo (versão 6.0), com um intervalo de confiança de 95%, erro máximo de 5% e prevalência esperada de 20%, segundo estudos anteriores (Souza et al., 2002; Cañón-Franco et al., 2003; Oliveira et al., 2004), resultando em uma amostragem de 245 cães. Um total de 703 amostras de soro foi coletado, perfazendo 500 cães da Microrregião de Lavras e 203 cães da Microrregião de Varginha.

## 2.3 Coleta de sangue e questionário

O sangue de cada animal foi coletado por punção das veias cefálica ou jugular, utilizando-se agulhas de calibre 20G e tubos tipo Vacutainer sem anticoagulante, totalizando 3mL. O sangue foi centrifugado a 2000 x g, durante 10 minutos, e o soro obtido foi armazenado a -20°C até o momento da realização dos testes sorológicos.

Durante a coleta, foi endereçado a cada proprietário um questionário contendo variáveis, inerentes ao animal ou à propriedade, que pudessem estar

relacionadas à infecção por *N. caninum*. As informações coletadas incluíam gênero; idade; raça; local de criação; tipo de alimentação (comida caseira, ração industrial ou carne crua/restos de placenta/fetos abortados); forma de criação (criado sempre preso, sempre solto ou temporariamente solto); utilidade do cão (companhia, guarda, caça ou pastoreio); se o cão já havia apresentado ou apresentava doença neuromuscular no momento da coleta; se o animal estava sob tratamento imunossupressor (corticoterápico ou quimioterápico) ou com doença imunossupressora concomitante; se o cão já havia apresentado ou apresentava algum distúrbio reprodutivo (abortos, natimortos, crias fracas ou infertilidade); a finalidade da propriedade rural (criação de gado de leite, gado de corte, plantio, criação de outra espécie animal); se havia histórico de aborto em bovinos na propriedade; e qual era o destino de fetos abortados e placenta da propriedade. Para algumas variáveis, não foram possíveis obter informações ou histórico dos cães (cães errantes atendidos nos hospitais veterinários ou adotados por um abrigo protetor de animais) ou estas não foram respondidas pelos proprietários. Nestes casos, os animais foram excluídos e a análise da variável foi realizada apenas com os dados de cães cuja resposta pode ser obtida.

#### 2.4 Reação de Imunofluorescência Indireta

O teste de imunofluorescência indireta foi utilizado para detectar anticorpos IgG anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii*, conforme

descrito por Dubey et al. (1988) e Fernandes et al. (2004). No caso de *N. caninum*, foram utilizadas lâminas contendo taquizoítos do isolado NC-1 (Dubey et al., 1988) e, para *T. gondii*, taquizoítos do isolado RH (Camargo, 1964). As amostras de soro foram diluídas em solução PBS (*Phosphate Buffered Saline*) pH 7,2, 0,01M, e 20 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) de cada soro-teste foram colocados em cada pocinho da lâmina e incubados em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos. Após isso, as lâminas foram lavadas duas vezes com solução PBS, durante cinco minutos cada lavagem, e com água destilada (duas lavagens intervaladas de cinco minutos cada). As lâminas foram secadas à temperatura ambiente e, posteriormente, incubadas com anticorpo anti-IgG canino-conjugado com fluoresceína (Sigma-Aldrich FITC F-7884) diluído a 1:32 em PBS, por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. As lâminas foram novamente lavadas, como descrito anteriormente, e montadas com glicerina tamponada com tampão fosfato (pH 8,0; 0,5M). Controles positivo e negativo, previamente testados, foram colocados juntamente em cada uma das lâminas. Os soros foram testados em diluições série 2 (twofold), iniciando a 1:50 (*N. caninum*) e, para *T. gondii*, apenas titulação inicial (1:64) foi realizada. Foram consideradas positivas as amostras em que havia completa fluorescência periférica dos taquizoítos, semelhante ao descrito por Paré et al. (1995), sendo que fluorescência parcial ou apical foram consideradas negativas para aquela diluição analisada.

### 2.5 Análise estatística

Para a análise estatística, o banco de dados foi montado no programa Epidata 3.1 e a análise estatística por meio do software SPSS 17.0. Foi feita a análise descritiva de todas as variáveis. Cada um dos potenciais fatores de risco incluídos no questionário foi comparado individualmente, usando tabelas de contingência 2x2, com uma variável categórica representando a soropositividade dos animais (positivo ou negativo). A significância de cada uma dessas associações foi determinada por testes de qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Para as associações significativas ( $p \leq 0,05$ ), foi calculada a *Odds Ratio* (OR) com o intervalo de confiança, em nível de 95%. Para testar a associação entre a soroprevalência de *N. caninum* e a idade, também foi realizada análise não-paramétrica com teste de Kruskal-Wallis, para comparação de medianas.

## 3. Resultados

Anticorpos anti-*N. caninum* foram detectados em 80/703 cães (11,4%), sendo que os animais positivos apresentaram títulos que variaram de 50 a 6400 (Tabela 1).

Dos 703 cães testados, 11,5% (81) dos cães eram errantes, 25,9% (182) pertenciam à zona urbana (112 da microrregião de Lavras e 70 de Varginha), 59,9% (421) à zona rural (291 da região produtora de leite e 130 de café) e 2,7% (19) de zona urbana com acesso à rural (Tabela 2). Cães de zona rural

apresentaram maior risco de soropositividade em relação aos de zona urbana ( $p=0.05$ ; OR:1.779; IC95%:0.980-3.230).

A tabela 3 ilustra o resultado relativo à idade dos cães e a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum*. Os animais foram distribuídos em quatro grupos etários: 0-1ano; 1-4anos; 4-8anos; >8 anos. A mediana de idade dos cães soronegativos foi de três anos (Q1/4=1; MED=3; Q3/4=5) e de cinco anos (Q1/4=3; MED=5; Q3/4=7) para os soropositivos ( $p=0,000$ ; Kruskal-Wallis: 3,98).

Quando comparado o tipo de criação dos cães e a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum*, cães sem acesso à rua (14/159), com acesso constante à rua (43/308) ou com acesso temporário à rua (16/152) apresentaram riscos semelhantes de se infectarem por *N. caninum* ( $p>0,05$ ), embora cães criados sempre soltos tenham apresentado soroprevalência superior.

Os resultados das prevalências de anticorpos anti-*N. caninum* encontradas e das outras variáveis analisadas relacionadas ao animal estão representados na tabela 4. Dentre os animais soropositivos, machos foram mais prevalentes (60,0%) que fêmeas (40,0%) ( $p>0,05$ ) e cães de raça pura ou sem raça definida apresentaram risco semelhante de infecção por *N. caninum* ( $p>0,05$ ). Histórico de disfunções reprodutivas foi considerado fator de risco ( $p=0,015$ ; OR:2,607; IC95%:1,177-5,775), enquanto não houve diferença estatística entre cães que apresentam histórico de doença neuromuscular ou

imunossupressão ( $p > 0,05$ ). Não houve associação entre a prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e soroprevalência de *Neospora caninum*. Cães que não se alimentavam de ração ( $p = 0,000$ ; OR:2,534; IC95%:1,543-4,161) apresentaram maior risco à neosporose que aqueles que consumiam apenas ração industrial canina.

A tabela 5 demonstra os resultados relacionados às características da residência/propriedade e a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum*. Cães usados para guarda ( $p = 0,000$ ; OR:2,905; IC95%:1,768-4,773) ou para caça ( $p = 0,000$ ; OR:4,902; IC95%:2,230-10,779) foram mais susceptíveis se comparados àqueles que não eram utilizados para estas finalidades, e animais cujos proprietários responderam não ser utilizados como companhia apresentam maior risco de infecção ( $p = 0,012$ ; OR:2,010; IC95%:1,155-3,500). Cães que possuíam contato, ou que havia a possibilidade de contato e/ou ingestão de fetos abortados ou placentas, apresentaram 3,2 vezes mais chance de se infectarem por *N. caninum* ( $p = 0,000$ ; OR:3,218; IC95%:1,865-5,551). Cães de propriedades rurais de gado de leite ( $p = 0,016$ ; OR:3,460; IC95%:1,189-10,069) ou das que apresentavam histórico de aborto bovino ( $p = 0,002$ ; OR:3,087; IC95%:1,468-6,491) mostraram maiores riscos de infecção por *N. caninum*, enquanto cães de propriedade de corte ou de cultivo agrícola (café) não mostraram associação com a sorologia ( $p > 0,05$ ).



#### 4. Discussão

A prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* encontrada neste estudo foi de 11,4% (80/703), a qual é inferior à reportada em outros países, como a de 16,36% encontrada na Polônia (Ploneczka & Mazurkiewicz, 2008), 27,0% no Irã (Yakhchali et al., 2010), 32,0% no México (Cruz-Vázquez et al., 2008), 37,8% na Argentina (Basso et al., 2001), 43,6% na Espanha (Regidor-Cerrillo et al., 2010) e 48,4% na Costa Rica (Palavicini et al., 2007), porém superior aos 2,9% reportados na Hungria (Hornok et al., 2006) e 3,6% na Áustria (Wanha et al., 2005). No Brasil, a soroprevalência varia amplamente de 3,1 a 67,7% (Dubey and Schares, 2011). Figueredo et al. (2008) explicam que a prevalência pode variar entre regiões e dentro duma mesma região, já que as diferentes populações podem estar expostas a diversos fatores de risco.

Os títulos de anticorpos anti-*N. caninum* variaram de 1:50 a 1:6400, com grande quantidade de cães (68,75%) apresentando baixos títulos (1:50 a 1:200), semelhante aos resultados de Fernandes et al. (2004). Títulos acima de 800 são sugestivos de neosporose clínica (Barber & Trees, 1996), no entanto, no presente estudo, não houve associação entre a soroprevalência e o histórico, atual ou anterior, de doença neuromuscular. Semelhantemente aos achados de Malmasi et al. (2007), a alta frequência de cães com títulos abaixo de 800 sugere que grande parte da infecção nos cães ocorre de forma subclínica. Embora Mineo et al. (2001) e Plugge et al. (2011) recomendem a inclusão dos exames

sorológicos para neosporose no diagnóstico de doença neuromuscular em cães, aparentemente esta doença parece não ter importância clínica na região estudada.

Dentre os animais positivos, 58/73 (79,5%) eram oriundos de zona rural. Diversos estudos também demonstram que a soroprevalência é maior em cães de zona rural em relação aos de área urbana (Fernandes et al., 2004; Ferroglio et al., 2007; Haddadzadeh et al., 2007; Sicupira et al., 2011). Este fato pode ser explicado pela maior exposição destes animais ao protozoário, devido ao hábito de caçar pequenos mamíferos e pássaros, os quais são hospedeiros intermediários potenciais do parasito, além da maior chance de ingestão de oocistos ambientais ou de cistos presentes em tecidos bovinos.

Os cães soropositivos tenderam a ser mais velhos, se comparados aos soronegativos, com maior soroprevalência para aqueles acima de quatro anos de idade. Alta correlação entre a taxa de infecção e a idade também foi relatada por Haddadzadeh et al. (2007). O papel da idade na soropositividade sugere que a maioria dos cães adquire a infecção no período pós-natal (Basso et al., 2001; Andreotti et al., 2006), ou seja, a transmissão horizontal é mais importante que a vertical entre a população canina (Yakhchali et al., 2010).

Embora cães criados sempre soltos tenham apresentado maior soroprevalência, esta não foi significativamente diferente dos mantidos sempre presos ou temporariamente soltos. Estes resultados são semelhantes ao reportado

por Cunha Filho et al. (2008), porém opostos aos de Azevedo et al. (2005), Paradies et al. (2007) e Collantes-Fernández et al. (2008) que encontraram associação significativa entre cães criados soltos e a soroprevalência para *N. caninum*, quando comparados com animais criados dentro de casa ou presos. Há uma maior probabilidade de contato com oocistos ambientais ou com cistos e taquizoítos em tecidos de hospedeiros intermediários para os cães que tem acesso à rua.

Não houve associações significativas quanto ao sexo e raça dos cães, semelhante ao encontrado por outros autores (Cañón-Franco et al., 2003; Sánchez et al., 2003; Wanha et al., 2005; Hornok et al., 2006; Romanelli et al., 2007; Yakhchali et al., 2010), entretanto, Gozdzik et al. (2011) encontraram maior prevalência entre caninos fêmeas. Fernandes et al. (2004) observaram maior soroprevalência em cães sem raça definida e Cringoli et al. (2002) associaram a raça Boxer como fator de risco à infecção por *N. caninum*. Como a maior parte da população canina brasileira é composta por cães sem raça definida, a maior soroprevalência observada nesta população de cães pode ter ocorrido pelo maior tamanho amostral, conforme explicado por Fernandes et al. (2004).

Nenhuma associação entre a sorologia para *T. gondii* e a soroprevalência de *N. caninum* foi estabelecida, semelhante ao reportado por

Lopes et al. (2011), sugerindo que ambas as doenças não apresentam nenhuma correlação e que uma doença não predis põe à outra.

No presente estudo, o histórico de doenças reprodutivas foi considerado fator de risco à infecção por *N. caninum*, já que estes cães apresentaram 2,6 vezes mais chance de serem soropositivos. Alguns autores apontam que *N. caninum* pode causar disfunções reprodutivas em cães, incluindo morte fetal, mumificação, reabsorção, aborto, natimorto e nascimento de crias fracas (Dubey & Lindsay, 1996; Moura et al., 2011), no entanto, segundo o conhecimento dos autores, até o momento, não há nenhum estudo que compare a soroprevalência com a ocorrência de alterações reprodutivas em cães.

De acordo com o tipo de alimentação recebida, cães que não recebiam ração apresentaram risco 2,5 vezes maior do que aqueles que recebiam ração comercial como alimento. Paradies et al. (2007) e Sicupira et al. (2011) não encontraram diferença quanto ao tipo de alimentação recebida pelo cão. No entanto, Patitucci et al. (2001) observaram maior soropositividade em cães alimentados com dietas caseiras, incluindo carnes cruas. A ingestão de carne crua ou mal passada pode aumentar as chances de ingestão de taquizoítos ou de cistos teciduais presentes nos tecidos dos hospedeiros intermediários (Kramer et al., 2004), o que seria pouco provável de ocorrer naqueles animais que só consomem ração comercial.

Analisando a utilidade do cão, os animais que são utilizados para caça e guarda apresentaram maior soroprevalência ( $p < 0,05$ ). A maior parte dos cães de guarda era composta por cães de grande porte que eram utilizados para vigiar uma propriedade, porém criados soltos, o que poderia explicar alta soroprevalência neste grupo populacional. Nos animais de caça, seria esperada maior prevalência de anticorpos, devido ao hábito de caçar pequenos mamíferos silvestres ou possuírem contato com carcaças que são frequentemente, evisceradas a campo (Collantes-Fernández et al., 2008). Embora fosse esperada soroprevalência alta entre os cães usados para pastoreio, devido à íntima associação com bovinos (Cunha Filho et al., 2008), isto não foi observado no presente estudo, talvez pela pequena amostragem de cães utilizados para esta finalidade.

Os cães que apresentavam contato ou que tinham a possibilidade de contato ou ingestão de fetos abortados ou placenta foram considerados fator de risco à infecção ( $p < 0,05$ ). A ingestão de tecidos bovinos contaminados, principalmente placenta e fetos abortados, é um fator bastante conhecido relacionado à infecção em cães e ao ciclo da doença (Dijkstra et al., 2001; Dijkstra et al., 2002).

Cães de propriedades de gado de leite, principalmente aquelas com histórico de aborto bovino, apresentaram soroprevalência maior quando comparados aos de propriedades de gado de corte ou propriedades agrícolas de

cultivo de café. Cunha Filho et al. (2008) observaram maior prevalência em cães oriundos de propriedade de criação de gado de corte do que de leite no estado de Rio Grande do Sul, Brasil, talvez pelo modo de criação e manejo bovinos serem bastante diferente dos da região em questão.

O cão pode-se infectar verticalmente ou horizontalmente pelo *N. caninum*. A transmissão transplacentária tem sido demonstrada experimentalmente em cães (Dubey et al., 2007). Segundo Barber & Trees (1998), a transmissão vertical do *N. caninum* é altamente variável e é provável que a mesma não persista na ausência da infecção horizontal. Embora a soroprevalência do presente estudo tenha sido maior entre cães da zona rural do que aqueles da zona urbana, os achados sugerem que não basta o animal pertencer à zona rural, uma vez que a prevalência na região caracteristicamente não produtora de leite, como na região cafeeira, foi baixa, confirmando que há uma associação epidemiológica e parasitológica entre bovinos e caninos (Collantes-Fernández et al., 2008) e que os bovinos são necessários para a transmissão horizontal da doença e manutenção da mesma entre a população canina.

*Neospora caninum* está presente em cães da região sul de Minas Gerais e a soroprevalência é maior em cães de zona rural, principalmente nas propriedades leiteiras e que apresentam histórico de aborto bovino, que não se alimentam de ração comercial, utilizados para caça ou guarda, que possuem

contato ou ingerem restos placentários e fetos abortados e que apresentam histórico de distúrbios reprodutivos.

### **Agradecimentos**

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de mestrado e à FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo auxílio financeiro.

### **5. Referências**

Andreotti, R., Oliveira, J.M., Silva, E.A., Oshiro, L.M., Matos, M.F.C., 2006. Occurrence of *Neospora caninum* in dogs and its correlation with visceral leishmaniasis in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Vet. Parasitol.* 135, 375-379.

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

Barber, J.S., Trees, A.J., 1996. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. *Vet. Rec.* 139, 439-443.

Barber, J.S., Trees, A.J., 1998. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *Int. J. Parasitol.* 28(1), 57-64.

Basso, W., Venturini, L., Venturini, M.C., Moore, P., Rambeau, M., Unzaga, J.M., Campero, C., Bacigalupe, D., Dubey, J.P., 2001. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. *J. Parasitol.* 87(4), 906-907.

Benetti, A.H., Schein, F.B., Santos, T.R., Toniollo, G.H., Costa, A.J., Mineo, J.R., Lobato, J., Silva, D.A.O., Gennari, S.M., 2009. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais da região sudoeste do estado de Mato Grosso. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 18(1), 29-33.

Camargo, M.E., 1964. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 06, 117-118.

Cañón-Franco, W.A., Bergamaschi, D.P., Labruna, M.B., Camargo, L.M.A., Souza, S.L.P., Silva, J.C.R., Pinter, A., Dubey, J.P., Gennari, S.M., 2003. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brazil. *Vet. Parasitol.* 115, 71-74.

Collantes-Fernández, E., Gómez-Bautista, M., Miró, G., Álvarez-García, G., Pereira-Bueno, J., Frisuelos, C., Ortega-Mora, L.M., 2008. Seroprevalence and



risk factors associated with *Neospora caninum* infection in different dog populations in Spain. *Vet. Parasitol.* 152, 148-151.

Cringoli, G., Rinaldi, L., Capuano, F., Baldi, L., Veneziano, V., Capelli, G., 2002. Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dogs. *Vet. Parasitol.* 106, 307-313.

Cruz-Vázquez, C., Medina-Esparza, L., Marentes, A., Morales-Salinas, E., Garcia-Vázquez, Z., 2008. Seroepidemiological study of *Neospora caninum* infection in dogs found in dairy farms and urban areas of Aguascalientes, Mexico. *Vet. Parasitol.* 157, 139-143.

Cunha Filho, N.A., Lucas, A.S., Pappen, F.G., Ragozo, A.M.A., Gennari, S.M., Lucia Junior, T., Farias, N.A.R., 2008. Fatores de risco e prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães urbanos e rurais do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 17(1), 301-306.

Dijkstra, T., Eysker, M., Schares, G., Conraths, F.J., Wouda, W., Barkema, H.W., 2001. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int. J. Parasitol.* 31, 747-752.

Dijkstra, T.H., Barkemaa, H.W., Eysker, M.B., Hesselink, J.W., Wouda, W., 2002. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. *Vet. Parasitol.* 105, 99-104.

Dubey, J.P., 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.* 41, 1-16.

Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 67, 1-59.

Dubey, J.P., Carpenter, J.L., Speer, C.A., Topper, M.J., Uggla, A., 1988. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192(9), 1269-1285.

Dubey, J.P., Schares, G., Ortega-Mora, L.M., 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 323-367.

Dubey, J.P., Jenkins, M.C., Rajendran, C., Miska, K., Ferreira, L.R., Martins, J., Kwok, O.C., Choudhary, S., 2011. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 181(2-4), 382-387.

Fernandes, B.C.T.M., Gennari, S.M., Souza, S.L.P., Carvalho, J.M., Oliveira, W.G., Cury, M.C., 2004. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city of Uberlândia, Minas Gerais – Brazil. *Vet. Parasitol.* 123, 33-40.

Ferroglio, E., Pasino, M., Ronco, F., Benà, A., Trisciuglio, A., 2007. Seroprevalence of Antibodies to *Neospora caninum* in Urban and Rural Dogs in North-West Italy. *Zoonoses Public Health* 54(3-4), 135-139.

Figueredo, L.A., Dantas-Torres, F., de Faria, E.B., Gondim, L.F.P., Simões-Mattos, L., Brandão-Filho, S.P., Mota, R.A., 2008. Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs from Pernambuco, Northeast Brazil. *Vet. Parasitol.* 157, 9-13.

Fridlund-Plugge, N., Montiani-Ferreira, F., Richartz, R.R.T.B., Dal Pizzol, J., Machado Jr., P.C., Patrício, L.F.L., Rosinelli, A.S., Locatelli-Dittrich, R., 2008. Frequency of antibodies against *Neospora caninum* in stray and domiciled dogs from urban, periurban and rural areas from Paraná State, Southern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 17(4), 222-226.

Gennari, S.M., Yai, L.E., D'Auria, S.N., Cardoso, S.M., Kwok, O.C., Jenkins, M.C., Dubey, J.P., 2002. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of São Paulo, Brazil. *Vet. Parasitol.* 106(2), 177-179.

Gondim, L.F., McAllister, M.M., Pitt, W.C., Zemlicka, D.E., 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 34(2), 159-161

Goździk, K., Wrzesien, R., Wielgosz-Ostolska, A., Bién, J., Kozak-Ljunggren, M., Cabaj, W., 2011. Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* in dogs from urban areas in Central Poland. *Parasitol. Res.* 108, 991-996.

Guimarães, A.M., Rocha, C.M.B.M., Oliveira, T.M.F.S., Rosado, I.S., Morais, L.G., Santos, R.R.D., 2009. Fatores associados à soropositividade para *Babesia*, *Toxoplasma*, *Neospora* e *Leishmania* em cães atendidos em nove clínicas veterinárias do município de Lavras, MG. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 18(1), 49-53.

Haddadzadeh, H.R., Sadrebazzaz, A., Malmasi, A., Ardakani, H.T., Nia, P.K., Sadreshirazi, N., 2007. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from rural and urban environments in Tehran, Iran. *Parasitol. Res.* 101, 1563-1565.

Hornok, S., Edelhofer, R., Fok, E., Berta, K., Fejes, P., Répási, A., Farkas, R., 2006. Canine neosporosis in Hungary: Screening for seroconversion of household, herding and stray dogs. *Vet. Parasitol.* 137, 197-201.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2011. Produção da Pecuária Municipal (2010). Available from: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/default\\_pdf.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/default_pdf.shtm)>

Jesus, E.E.V., Almeida, M.A.O., Atta, A.M., 2007. Anti-neosporal IgG and IgE antibodies in Canine Neosporosis. *Zoonoses Public Health* 54, 387-392.

King, J.S., Slapeta, J., Jenkins, D.J., Al-Qassab, S.E., Ellis, J.T., Windsor, P.A., 2010. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 40(8), 945-950.

Kramer, L., De Risio, L., Tranquillo, V.M., Magnino, S., Genchi, C., 2004. Analysis of risk factors associated with seropositivity to *Neospora caninum* in dogs. *Vet. Rec.* 154(22), 692-693.

Lopes, M.G., Mendonça, I.L., Fortes, K.P., Amaku, M., Pena, H.F.J., Gennari, S.M., 2011. Presence of antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* in dogs from Piauí. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 20(2), 111-114.

Malmasi, A., Hosseininejad, M., Haddadzadeh, H., Badii, A., Bahonar, A., 2007. Serologic study of anti-*Neospora caninum* antibodies in household dogs and dogs living in dairy and beef cattle farms in Tehran, Iran. *Parasitol. Res.* 100, 1143-1145.

McAllister, M.M., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Jolley, W.R., Wills, R.A., McGuire, A.M., 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 28(9), 1473-1478.

Mineo, T.W.P., Silva, D.A.O., Costa, G.H.N., von Ancken, A.C.B., Kasper, L.H., Souza, M.A., Cabral, D.D., Costa, A.J., Mineo, J.R., 2001. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. *Vet. Parasitol.* 98, 239-245.

Mineo, T.W.P., Silva, D.A.O., Näsluna, K., Björkman, C., Uggla, A., Mineo, J.R., 2004. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* serological status of different canine populations from Uberlândia, Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56(3), 414-417.

Moraes, C.C.G., Megid, J., Pituco, E.M., Okuda, L.H., Del Fava, C., Stefano, E., Crocci, A.J., 2008. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães da microrregião da serra de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 17(1), 1-6.

Moura, A.B., Souza, A.P., Sartor, A.A., Bellato, V., Pisetta, G.M., Teixeira, E.B., Heusser Jr., A., 2011. *Neospora caninum* antibodies and risk factors in dogs from Lages and Balneário Camboriú, SC. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 63(1), 262-265.

Oliveira, J.M., Matos, M.F.C., Oshiro, L.M., Andreotti, R., 2004. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs in the urban area of Campo Grande, MS, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 13(4), 155-158.

Palavicini, P., Romero, J.J., Dolz, G., Jiménez, A.E., Hill, D.E., Dubey, J.P., 2007. Fecal and serological survey of *Neospora caninum* in farm dogs in Costa Rica. *Vet. Parasitol.* 149, 265-270.

Paradies, P., Capelli, G., Testini, G., Cantacessi, C., Trees, A.J., Otranto, D., 2007. Risk factors for canine neosporosis in farm and kennel dogs in southern Italy. *Vet. Parasitol.* 145, 240-244.

Paré, J., Hietala, S.K., Thurmond, M.C., 1995. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. Infection in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7(2), 273-275.

Patitucci, A.N., Perez, M.J., Rozas, M.A., Israel, K.F., 2001. Neosporosis canina: presencia de anticuerpos séricos en poblaciones caninas rurales y urbanas de Chile. *Arch. Med. Vet.* 33(2), 227-232.

Ploneczka, K., Mazurkiewicz, M., 2008. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dogs in south-western Poland. *Vet. Parasitol.* 153, 168-171.

Plugge, N.F., Ferreira, F.M., Richartz, R.R.T.B., Siqueira, A., Dittrich, R.L., 2011. Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* and/or *Toxoplasma gondii* in dogs with neurological signs. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 20(3), 202-206.

Regidor-Cerrillo, J., Pedraza-Diaz, S., Rojo-Montejo, S., Vazquez-Moreno, E., Arnaiz, I., Gomez-Bautista, M., Jimenez-Palacios, S., Ortega-Mora, L.M., Collantes-Fernandez, E., 2010. *Neospora caninum* infection in stray and farm dogs: seroepidemiological study and oocyst shedding. *Vet. Parasitol.* 174, 332-335.

Reichmann, M.L.A.B., Pinto, H.B.F., Nunes, V.F.P., 1999. Vacinação contra a raiva de cães e gatos. *Manuais 3*, Instituto Pasteur, São Paulo, 32pp.

Romanelli, P.R., Freire, R.L., Vidotto, O., Marana, E.R.M., Ogawa, L., De Paula, V.S.O., Garcia, J.L., Navarro, I.T., 2007. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. *Res. Vet. Sci.* 82, 202-207.

Sánchez, G.F., Morales, S.E., Martínez, M.J., Trigo, J.F., 2003. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. *Can. J. Vet. Res.* 67, 142-145.

Santos, D.S., Andrade, M.P., Varaschin, M.S., Guimarães, A.M., Hirsch, C., 2011. *Neospora caninum* in bovine fetuses of Minas Gerais, Brazil: genetic characteristics of rDNA. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 20(4), 281-288.



Sicupira, P.M.L., Magalhães, V.C.S., Galvão, G.S., Pereira, M.J.S., Gondim, L.F.P., Munhoz, A.D. Factors associated with infection by *Neospora caninum* in dogs in Brazil. *Vet. Parasitol.* (2011), doi:10.1016/j.vetpar.2011.09.029.

Souza, S.L.P., Guimarães Jr., J.S., Ferreira, F., Dubey, J.P., Gennari, S.M., 2002. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Paraná, Brazil. *J. Parasitol.* 88, 408-409.

Thrusfield, M. (Ed.), 2007. *Veterinary Epidemiology*. Blackwell Science, Oxford, 610pp.

Valadas, S., Minervino, A.H.H., Lima, V.M.F., Soares, R.M., Ortolani, E.L., Gennari, S.M., 2010. Occurrence of antibodies anti-*Neospora caninum*, anti-*Toxoplasma gondii*, and anti-*Leishmania chagasi* in serum of dogs from Pará State, Amazon, Brazil. *Parasitol. Res.* 107(2), 453-457.

Varaschin, M.S., Hirsch, C., Wouters, F., Nakagaki, K.Y.R., Guimarães, A.M., Santos, D.S., Bezerra Jr., P.S., Costa, R.C., Peconick, A.P., Langohr, I.M., 2012. Congenital neosporosis in goats from the State of Minas Gerais, Brazil. *Korean J. Parasitol.* (in press).

Wanha, K., Edelhofer, R., Gabler-Eduardo, C., Prosl, H., 2005. Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs and foxes in Austria. *Vet. Parasitol.* 128, 189-193.

Yakhchali, M., Javadi, S., Morshedi, A., 2010. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in stray dogs of Urmia, Iran. Parasitol. Res. 106, 1455-1458.

Figura 1 – Localização da área de estudo. 1: Microrregião de Varginha; 2: Microrregião de Lavras.

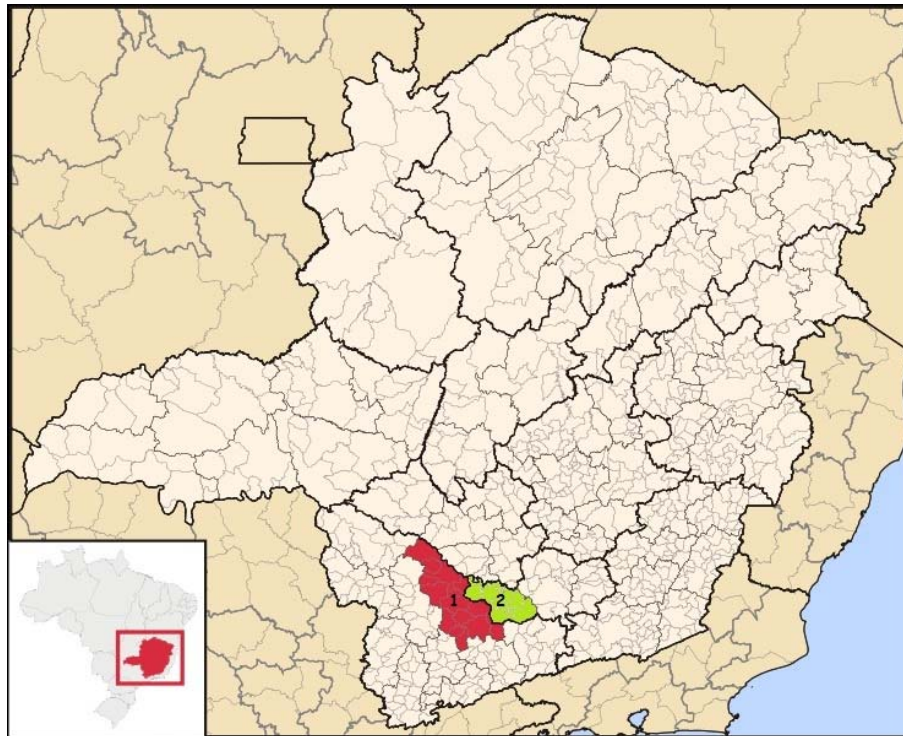


Tabela 1 – Distribuição dos títulos de anticorpos anti-*Neospora caninum* detectados pelo teste de imunofluorescência indireta (RIFI  $\geq$  1:50) em cães de Minas Gerais, Brasil.

<i>Título de anticorpos</i>	<i>n (amostras positivas)</i>	<i>%</i>
50	23	28,75
100	14	17,5
200	18	22,5
400	12	15,0
800	3	3,75
1600	6	7,5
3200	2	2,5
6400	2	2,5
<i>Total</i>	<i>80*</i>	<i>100,0</i>

\*Prevalência: 11,4% (80/703)

Tabela 2 – Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* detectados pelo teste de imunofluorescência indireta (IFAT  $\geq$  1:50) em cães das zonas urbana, rural e urbana com acesso à rural de Minas Gerais, Brasil.

<i>Área</i>	<i>Total analisado</i>	<i>Positivo</i>		<i>Negativo</i>	
		<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
Urbana	182	15	8,24a	167	91,76
Rural	421	58	13,78b	363	86,22
Urbana com acesso à Rural	19	-	- ab	19	100,0
<i>Total</i>	<i>622</i>	<i>73</i>	<i>11,74</i>	<i>549</i>	<i>88,26</i>

Diferentes letras na coluna:  $p < 0,05$ ; n: número de animais.

Tabela 3 – Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* detectados pelo teste de imunofluorescência indireta (RIFI  $\geq$  1:50) em cães de diferentes grupos etários de Minas Gerais, Brasil.

<i>Idade (anos)</i>	<i>Total analisado</i>	<i>Positivo</i>		<i>Negativo</i>	
		<i>n</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
0-1	158	-	- a	158	100,0
1-4	318	33	10,38b	285	89,62
4-8	165	31	18,79c	134	81,21
>8	60	16	26,67c	44	73,33
<i>Total</i>	<i>701</i>	<i>80</i>	<i>100,0</i>	<i>623</i>	<i>100,0</i>

Diferentes letras na coluna: p<0,05; n: número de animais.

Tabela 4 – Fatores associados à soroprevalência de *Neospora caninum* em cães de Minas Gerais, Brasil.

Variável	Sorologia para <i>Neospora caninum</i>				OR	IC95%	p
	Positivo (n=80)		Negativo (n=623)				
	n	%	n	%			
<i>Sexo</i>							0,570
Macho	48	11,97	353	88,03			
Fêmea	32	10,6	270	89,4			
<i>Raça</i>							0,884
Raça pura	24	11,65	182	88,35			
SRD	56	11,27	441	88,73			
<i>Histórico Atual ou Anterior de Doença Neuromuscular (N=700)</i>							0,365
Sim	12	9,16	119	90,84			
Não	68	11,95	501	88,05			
<i>Histórico Atual ou Anterior de Doença Reprodutiva (N=611)</i>					2,607	1,177-5,775	0,015
Sim	9	24,32	28	75,68			
Não	63	10,98	511	89,02			
<i>Sorologia para Toxoplasma gondii</i>							0,959
Negativo	51	11,33	399	88,67			
Positivo	29	11,46	224	88,54			
<i>Tipo de Alimentação (N=610)</i>							
<i>Ração</i>					2,534	1,543-4,161	0,000
Sim	37	8,71	388	91,29			
Não	36	19,46	149	80,54			
<i>Comida Caseira</i>							0,132
Sim	61	13,06	406	86,94			
Não	12	8,39	131	91,61			
<i>Restos Carcaça/Feto/Placenta</i>							0,201
Sim	14	16,09	73	83,91			
Não	59	11,28	464	88,72			

IC: intervalo de confiança; OR: *Odds Ratio*; SRD: cães sem raça definida.

Tabela 5 – Fatores relacionados às residências e propriedades associados à soroprevalência de *Neospora caninum* em cães de Minas Gerais, Brasil.

Variável	Sorologia para <i>Neospora caninum</i>				OR	IC95%	p
	Positivo (n=80)		Negativo (n=623)				
	n	%	n	%			
<i>Utilidade do Cão (N=617)</i>							
<i>Companhia</i>					2,010	1,155-3,500	0,012
Sim	52	10,30	453	89,70			
Não	21	18,75	91	81,25			
<i>Guarda</i>					2,905	1,768-4,773	0,000
Sim	38	20,43	148	79,57			
Não	35	8,12	396	91,88			
<i>Pastoreio</i>							0,587
Sim	3	15,79	16	84,21			
Não	70	11,71	528	88,29			
<i>Caça</i>					4,902	2,230-10,779	0,000
Sim	11	36,67	19	63,33			
Não	62	10,56	525	89,44			
<i>Possibilidade de Contato/Ingestão de Fetos/Placenta (N=583)</i>							
Sim	46	18,04	209	81,96	3,218	1,865-5,551	0,000
Não	21	6,40	307	93,6			
<i>Finalidade da Propriedade (N=276)</i>							
<i>Gado de Leite</i>					3,460	1,189-10,069	0,016
Sim	42	19,53	173	80,47			
Não	4	6,56	57	93,44			
<i>Gado de Corte</i>							0,154
Sim	2	7,14	26	92,86			
Não	44	17,74	204	82,26			
<i>Plantio</i>							0,301
Sim	18	20,0	72	80,0			
Não	28	15,05	158	84,95			
<i>Outras Espécies Animais</i>							0,650
Sim	10	14,93	57	85,07			
Não	36	17,31	172	82,69			
<i>Histórico de Aborto Bovino (N=202)</i>							
Sim	22	28,21	56	71,79	3,087	1,468-6,491	0,002
Não	14	11,29	110	88,71			
<i>Destino de Placenta e Fetos Abortados (N=190)</i>							
<i>Deixadas a Campo/Pasto</i>							0,417
Sim	35	19,44	145	80,56			

Não	3	30,0	7	70,0	
<i>Incinerado/Queimado</i>					0,174
Sim	3	33,33	6	66,67	
Não	35	19,34	146	80,66	
<i>Jogados em Lixo</i>					0,616
Sim	-	-	1	100,0	
Não	38	20,11	151	79,89	
<i>Jogados em Rio/Ribeirão</i>					0,616
Sim	-	-	1	100,0	
Não	38	20,11	151	79,89	
<i>Oferecidos aos Cães</i>					0,154
Sim	-	-	8	100,0	
Não	37	20,44	144	79,56	

IC: intervalo de confiança; OR: *Odds Ratio*.

**ARTIGO 2**

(Este artigo será submetido à revista *Veterinary Parasitology*)

**ESTUDO DA OCORRÊNCIA DE *NEOSPORA CANINUM* EM CÃES NECROPSIADOS  
NA REGIÃO SUL DE MINAS GERAIS, BRASIL, POR MEIO DE  
HISTOPATOLOGIA, IMUNO-HISTOQUÍMICA E TÉCNICAS MOLECULARES**

**OCCURRENCE STUDY OF *NEOSPORA CANINUM* IN NECROPSIED DOGS IN  
SOUTHERN MINAS GERAIS, BRAZIL, BY HISTOPATHOLOGY,  
IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND MOLECULAR TECHNIQUES**

**Resumo**

*Neospora caninum* tem se sobressaído como um agente importante causador de abortos em bovinos, porém se desconhece seu papel como agente causador de doenças em cães do sul de Minas Gerais. Um total de 104 cães com sintomatologia neurológica e muscular ou histórico de doenças ou terapias imunossupressoras recentes foi avaliado histopatologicamente à procura de lesões compatíveis com infecção por protozoários. Lesões, como encefalite, miosite e miocardite não-supurativa, foram encontradas em 47 cães. Quatro animais apresentaram estruturas parasitárias semelhantes a grupos de taquizoítos ou cistos de protozoários em coração ou sistema nervoso central. Destes, dois animais apresentaram marcação imuno-histoquímica positiva apenas para



*Toxoplasma gondii*. Em outro cão, ocorreu marcação imuno-histoquímica tanto para *N. caninum* como para *T. gondii* e, no quarto animal, não foi possível realizar a análise imuno-histoquímica. Em todos os 104 cães foi realizada PCR convencional (utilizando o par de primers Lav1/Tim11) em amostras de cérebro e coração, cujo produto de 588pb da região ITS1 foi sequenciado em quatro amostras (coração e cérebro) de dois dos animais. Obteve-se similaridade de 98 e 99% com várias sequências de *T. gondii* depositadas no GenBank. Estes achados sugerem que *N. caninum* não é um agente importante como causador de lesões patológicas ou doença clínica em cães da região estudada. A PCR, utilizando-se os primers Lav1/Tim11 mostrou-se uma técnica bastante útil para diagnosticar infecção por protozoário, porém faz-se necessário o sequenciamento genético para diferenciar as espécies *T. gondii* e *N. caninum*.

## **1. Introdução**

A neosporose, causada pelo Apicomplexa formador de cistos, *Neospora caninum*, é uma importante causa de distúrbios neuromusculares e mortalidade em cães em todo o mundo (Dubey and Lindsay, 1996; Lindsay and Dubey, 2000; Dubey, 2003). Desde sua descoberta em cães da Noruega (Bjerkås et al., 1984) e posterior descrição do agente causador como uma nova espécie (Dubey et al., 1988), a doença tem sido associada a alterações neuromusculares, cardíacas, pulmonares e cutâneas em cães, estando, algumas vezes, relacionada a

terapias ou outras doenças imunossupressoras (Peters et al., 2000; La Perle et al., 2001; Tarantino et al., 2001; Cringoli et al., 2002; Dubey and Schares, 2011).

Nos cães, o parasito pode atingir vários órgãos e formar cistos teciduais, levando à cronicidade da doença, sendo que a reativação do parasito pode ocorrer quando há algum evento que leve à depressão do sistema imunológico do hospedeiro (Georgieva et al., 2006).

A sorologia é um método de diagnóstico amplamente utilizado para detectar contacto prévio com o agente, e, dentre os métodos sorológicos, a reação de imunofluorescência indireta é considerada o “teste padrão-ouro”. No entanto, em casos de infecções muito precoces ou muito crônicas, com a formação de cistos, a sorologia pode ser negativa, mesmo com a presença do parasito no hospedeiro (Dubey and Schares, 2006).

Um método amplamente utilizado para diagnóstico é a histopatologia, onde lesões microscópicas de encefalite não-supurativa, com ou sem necrose, e proliferação de células da glia, assim como miosite e miocardite não-supurativas podem ser indicativos de lesões por protozoário (Dubey et al., 2006). A marcação histoquímica pelo Ácido Periódico de Schiff (PAS) também pode ser utilizada. Embora esta core tanto taquizoítos de *N. caninum* quanto de *T. gondii*, no caso de cistos, somente a parede do cisto de *N. caninum* é corada, a qual apresenta uma espessura igual ou superior a 1  $\mu\text{m}$  (Dubey et al., 2002).

Em muitas circunstâncias, o diagnóstico da neosporose canina tem sido realizado *post mortem* (Dubey et al., 1998). No entanto, nem sempre estruturas parasitárias são facilmente visualizadas mediante colorações de rotina pela histopatologia. Nestes casos, os métodos de diagnóstico direto, como a imuno-histoquímica e a reação em cadeia da polimerase (PCR) podem ser úteis (Dubey and Schares, 2006).

No Brasil, há apenas um relato de infecção natural por *N. caninum* e isolamento do parasito em um cão com histórico de incoordenação e paresia de membros posteriores e que havia recebido terapia imunossupressora prévia (Gondim et al., 2001). Em recentes estudos conduzidos pelo grupo de pesquisa dos autores do presente artigo (dados ainda não publicados), observou-se que a soroprevalência de *N. caninum* em cães de Minas Gerais é de 11,4%. Além disso, é alto o número de animais necropsiados na região com sintomatologia neurológica ou com histórico de eventos imunossupressores. Assim, o objetivo do presente estudo é verificar a ocorrência de *Neospora caninum* em cães necropsiados com lesões histopatológicas compatíveis com infecção protozoária, por meio de imuno-histoquímica, PCR e análise do material amplificado.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1 Análise Histopatológica e Imuno-histoquímica*

Para este estudo, foram utilizados 104 cães necropsiados entre janeiro de 2010 a dezembro de 2011. Estes cães foram encaminhados ao Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil, com histórico recente de sintomatologia neuromuscular ou doença ou terapia imunossupressora.

À necropsia, foram coletadas amostras de tecidos como sistema nervoso central – SNC – (medula espinhal, óbex, pedúnculo cerebelar, colículo caudal, colículo rostral, tálamo, cerebelo, córtex cerebral), coração, musculatura esquelética (músculos semitendinoso, semimembranáceo, bíceps femoral, bíceps e tríceps braquiais, masseter e temporal), fígado, pulmão, rim, baço, linfonodos, timo, ovário, testículo, útero e pele.

As amostras foram fixadas em formalina 10% tamponada (pH 7,2; 0,01M), processadas rotineiramente, incluídas em parafina, cortadas a 5µm de espessura, coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e analisadas por microscopia óptica.

Todos os animais que, à análise histopatológica, apresentaram lesões compatíveis com infecção por protozoários, como infiltrado inflamatório não-supurativo, presença de grupos de taquizoítos ou cistos, associados ou não a áreas de necrose (Peters et al., 2000; Basso et al., 2005), foram submetidos à

análise imuno-histoquímica utilizando-se a técnica biotina-estreptavidina-peroxidase (Dako LSAB + Peroxidase Kit), semelhante ao protocolo descrito por Bandini et al. (2011). Nos cortes histológicos, em lâminas silanizadas, após a desparafinização e a reidratação, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% por 30 minutos. A recuperação antigênica foi realizada por digestão enzimática, utilizando-se tripsina 0,1% (pH 7,8) por 10 minutos a 37°C, seguida de imersão das lâminas em tampão citrato (pH 6,0) e irradiação em forno micro-ondas doméstico por dois minutos, à potência máxima. Para o bloqueio das reações inespecíficas, as lâminas foram submergidas em leite desnatado (Molico®, Nestlé) a 5% (diluído em PBS), por uma hora. Os cortes foram incubados com anticorpo primário policlonal anti-*N. caninum* à diluição 1:2000 ou anti-*T. gondii* (VMRD, Pullman, USA), também à diluição 1:2000 (como diagnóstico diferencial), de acordo com a técnica descrita por Corbellini et al. (2002). A incubação com o anticorpo primário foi realizada em câmara úmida, a 37°C, por uma hora. A coloração final foi obtida usando o cromógeno DAB (3,3-diaminobenzidina, Dako) ou Vector Red (Vector NovaRed®), e contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Como controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por PBS e como controles positivos, foram utilizados cortes histológicos com lesões e cistos de *N. caninum* (Figura 1), provenientes de um caso natural em caprino (Varaschin et al., 2012) e *T. gondii* (Figura 2), provenientes da rotina de diagnóstico. Foram consideradas

positivas as lâminas que possuíam estruturas coradas consistentes com a morfologia do parasito.

As lâminas que apresentaram estruturas parasitárias foram também submetidas à coloração histoquímica com o Ácido Periódico de Schiff (PAS), objetivando evidenciar a parede dos cistos parasitários.

## 2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Sequenciamento Genético

Durante a necropsia, amostras do lobo frontal cerebral e do ápice do coração foram coletadas e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para a detecção molecular do parasito. O DNA foi extraído de 40mg de tecido, utilizando kit de extração comercial (Wizard SV Genomic DNA Purification System; Promega, Madison, USA), através da técnica de lise por proteinase K, segundo recomendações do fabricante. O DNA extraído da amostra foi quantificado por espectrofotometria e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento de realização da PCR.

Para a detecção de *N. caninum*, a região ITS1 do rDNA foi utilizada como alvo para amplificação. Para isto, foram utilizados os primers Lav 1 (Forward) 5'-CGG AAG GAT CAT TCA CAC G-3' e Tim 11 (reverse) 5'-CCC ACT GAA ACA GAC GTA CC-3', os quais amplificam um fragmento esperado de 588pb, situado entre as posições 4 e 592 dentro da região do DNA ribossomal de *N. caninum* (Santos et al., 2011).

Foram utilizados reagentes-padrão para as reações (Go Taq® Flexi DNA Polymerase; Set of dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Promega, Madison, USA). As reações foram ajustadas para um volume final de 20,0µL e as condições definidas para a PCR de cada reação foram: 4µL de Tampão da Taq-polimerase (5x Green GoTaq Flexi Buffer), 1,2µL MgCl<sub>2</sub> 25mM, 2,5mM dNTPs, 0,5U Taq DNA Polimerase, 10µM de cada primer e 100ng de DNA template. Como controle branco, foi utilizada água ultra pura Milli-Q no lugar da amostra de DNA e, como controle positivo, amostra extraída de placenta de cabra naturalmente infectada e certificada (Varaschin et al., 2012). Todas as reações foram realizadas em termociclador PT100 (MJ Research Incorporated, USA), usando as seguintes condições: 95°C por cinco minutos; 35 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação e abertura das fitas de DNA), alinhamento dos primers a 52°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos; e extensão final por 7 minutos a 72°C.

Para avaliar a eficácia da reação, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, na presença de tampão de corrida TBE (Tris-Borato-EDTA, pH 8,0; Tris 0,09M, ácido bórico 0,09M, EDTA 2mM), por uma hora a 100V. As bandas de DNA foram visualizadas, em transiluminador, utilizando-se SYBR Green (SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain; Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA) ou brometo de etídeo 0,5µg/mL (Sigma-Aldrich #E-1510) e comparadas com marcador molecular 100pb ou 1Kpb (DNA

latter, Promega, Madison, USA). As imagens foram capturadas (L-Pix Chemi Photo Digitizer; Loccus Biotecnologia, Brazil) para análise e edição.

Os “amplicons” das amostras positivas e do controle positivo foram quantificados por espectrofotometria e submetidos ao sequenciamento genético, através da técnica de dideoxi (Sanger et al., 1977), utilizando sequenciador automatizado (Laboratório Central de Biologia Molecular-UFLA), para subsequente confirmação da especificidade, utilizando-se o programa BLAST (NCBI) e análise de similaridade (GenBank®).

### **3. Resultados**

Dos 104 cães necropsiados, 47 apresentaram lesões inflamatórias e/ou necrotizantes em pelo menos um dos locais mais frequentemente acometidos por protozoários (sistema nervoso central, coração e, menos frequentemente, músculo esquelético). Entre estes, cinco apresentaram lesões envolvendo os três tecidos, 21 apresentaram comprometimento somente do sistema nervoso, cinco somente no coração, dez com lesões envolvendo sistema nervoso e coração, dois no coração e músculo esquelético, três no sistema nervoso e músculo esquelético e apenas um animal com lesão restrita ao músculo esquelético.

As lesões observadas no sistema nervoso central foram meningite não-supurativa (8/47), mielite não-supurativa (4/47), encefalite não-supurativa multifocal, caracterizada por manguitos perivasculares (30/47)



predominantemente linfoplasmocitários, associados a aumento difuso ou focal de células da glia (22/47) (Figura 3), necrose, muitas vezes já na forma de malácia (17/47), desmielinização (20/47), corpúsculos de inclusão eosinofílicos intranuclear em astrócitos/gemistócitos (7/47), vasculite (2/47) e cicatrização glial (2/47).

Estruturas parasitárias foram visualizadas em quatro cães. O quadro 1 descreve os principais achados histopatológicos, imuno-histoquímicos e moleculares dos cães que apresentaram estruturas parasitárias ao exame histopatológico.

No sistema nervoso, as estruturas encontravam-se na forma de taquizoítos e cistos de parede fina nos hemisférios cerebrais, tronco cerebral e medula espinhal de um canino com o diagnóstico de cinomose (animal D) e somente no córtex cerebral de um cão com um quadro de uremia (animal C). As estruturas parasitárias estavam em meio à inflamação não-supurativa (Figura 4) e/ou gliose.

No coração, observou-se pericardite não-supurativa (3/47), miocardite não-supurativa de moderada (Figura 5) a discreta, focal ou multifocal (15/47), necrose de miofibras (10/47), trombose (1/47), miocardite supurativa (3/47) e vasculite (1/47). Em dois cães (animais A e B) foram observados grupos de taquizoítos (Figuras 6 e 7) dentro das fibras cardíacas.

As lesões predominantes dos músculos esqueléticos foram miosite não-supurativa (9/47) associada a necrose de fibras (5/47), miosite supurativa (1/47) e fibrose (2/47).

Na coloração histoquímica com PAS, ocorreu marcação dos taquizoítos e bradizoítos, porém esta não ocorreu na parede do cisto.

O animal B apresentou marcação imuno-histoquímica positiva somente utilizando anticorpo anti-*T. gondii* (Figura 8), quando comparada àquela obtida com o anticorpo anti-*N. caninum* (Figura 9). O animal C mostrou reação imuno-histoquímica positiva somente anti-*T. gondii* (Figura 10). Diversos cistos teciduais estavam presentes no córtex parietal, frontal, tálamo, colículos e medula espinhal do animal D. Estes cistos apresentaram dupla marcação positiva (*N. caninum* e *T. gondii*) (Figura 11 e 12), com marcação intensa em alguns cistos, marcação fraca em outros e ausência de marcação em outros cistos para ambos os anticorpos utilizados. Não foi possível obter marcação imuno-histoquímica anti-*N. caninum* ou anti-*T. gondii* para o animal A, já que foi visualizado apenas um local com um grupo de taquizoítos e o mesmo não foi visualizado em cortes processados para análise imuno-histoquímica ou em outras regiões do coração.

Das 208 amostras analisadas molecularmente (coração e cérebro dos 104 cães), apenas dois cães apresentaram amplificação de DNA de protozoários (Figura 13), com primers utilizados para a detecção de *Neospora caninum*

(amostras de cérebro e coração dos cães B e D). As outras 102 amostras não apresentaram bandas (588pb) perceptíveis à eletroforese de nenhum dos tecidos testados. A análise do sequenciamento dos DNA amplicons obtidos pela PCR, utilizando o Software BlastN, confirmou sequência específica do protozoário *T. gondii*, com uma taxa de similaridade de mais de 97%. A análise do sequenciamento do controle positivo (placenta de cabra) apresentou 99% de similaridade com *Neospora caninum*.

#### **4. Discussão**

Os achados histopatológicos de encefalite não-supurativa, associada com necrose tecidual e gliose, além de miocardite mononuclear, encontrados em alguns cães deste estudo, são semelhantes às lesões causadas por protozoários como *N. caninum*, descritas por outros autores (Dubey et al., 1998; Basso et al., 2005; Dubey et al., 2007) e àquelas causadas por *T. gondii* (Dubey et al., 2006). Diferentemente, Peters et al. (2000) relataram a ocorrência de encefalite parcialmente supurativa e manguitos perivascularares com células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos em um cão com neosporose clínica.

Para um diagnóstico *post mortem* da neosporose, o SNC, particularmente o cérebro, é o tecido de escolha para a análise, mesmo o parasito podendo ser encontrado em outros órgãos, especialmente nos casos agudos (Barber et al., 1996). No presente estudo, foi possível detectar, por métodos

histopatológicos, estágios de protozoários no SNC e coração em quatro dos cães analisados.

Relatos de miocardite em cães são associados a vários agentes etiológicos, como bactérias, fungos, vírus, rickettsias e protozoários, como *Trypanosoma cruzi*, *Sarcosporidia* spp., *T. gondii* (Barr et al., 1991), *Sarcocystis* (Dubey et al., 2006) e *N. caninum* (Odin and Dubey, 1993; Dubey et al., 1998; Peters et al., 2000; Meseck et al., 2005). Como as lesões e os aspectos morfológicos podem ser semelhantes, principalmente entre *T. gondii* e *N. caninum* (Meseck et al., 2005), provas específicas, como a imuno-histoquímica e a PCR, devem ser utilizadas para diferenciação (Dubey et al., 2006).

Existem diversas diferenças morfológicas, genéticas, antigênicas e biológicas entre *T. gondii* e *N. caninum*. Um método inicial de distingui-los é pela espessura da parede do cisto tecidual, já que o *T. gondii* possui uma parede tão fina (<0,5 µm), que mal pode ser visualizada ou mensurada em microscopia óptica e reage negativamente à técnica de PAS (Dubey et al., 2002), semelhante aos resultados do presente estudo. Na coloração histoquímica com PAS, ocorreu marcação dos taquizoítos e bradizoítos, porém esta não ocorreu na parede do cisto, conforme descrito para *T. gondii* (Dubey et al., 2002).

Nishikawa et al. (2002) e Silva et al. (2007), estudando testes sorológicos, apontam diversos antígenos comuns às duas espécies, os quais poderiam interferir negativamente em testes sorológicos ou outras provas

diagnósticas. Reação cruzada pode ocorrer em testes Imuno-histoquímicos, dependendo do tipo de recuperação antigênica utilizada e da especificidade do anticorpo (Dubey and Lindsay, 1996), porém esta pode ser evitada utilizando-se anticorpos monoclonais específicos (Dubey et al., 2002). Park et al. (2007) apontam um caso de toxoplasmose cutânea em um gato com dupla marcação imuno-histoquímica para *T. gondii* e *N. caninum*, cujo diagnóstico definitivo só foi possível com detecção do material genético do parasito. Um cão do presente estudo (animal D) apresentou dupla marcação à imuno-histoquímica, não permitindo concluir previamente se foi devido à coinfeção ou a uma possível marcação cruzada. Neste caso, para verificar se esta dupla marcação foi devido a uma coinfeção ou apenas à reação cruzada imuno-histoquímica, foi necessária a realização de PCR e sequenciamento genético.

Dois animais (animais B e C) obtiveram bandas positivas de 588pb à PCR em amostras de cérebro e coração. No entanto, o sequenciamento confirmou-se tratar de *Toxoplasma gondii* (acima de 98% de homologia). Foi utilizado o mesmo par de primers utilizado no estudo de Santos et al. (2011), porém no presente estudo, houve amplificação de DNA de *T. gondii*, enquanto no estudo dos autores diagnosticou-se infecção por *N. caninum*. Pelo fato de ter sido realizada a PCR convencional e, analisando a sequência de nucleotídeos de *N. caninum* e *T. gondii* (Payne and Ellis, 1996), observa-se que no local de anelamento dos primers Lav1 (nucleotídeos 4 a 22 da porção de *N. caninum*

Strain Liverpool e de *T. gondii* Strain RH – Sequências GenBank L49389 e L49390) e Tim11 (nucleotídeos 575 a 592), a sequência de nucleotídeos nestas regiões é exatamente a mesma (Figura 14), ou seja, o primer amplifica a região ITS1 de ambos, *N. caninum* e *T. gondii*.

Santos et al. (2011) não obtiveram fetos positivos para *T. gondii*, utilizando estes primers à PCR, provavelmente pelo fato de este agente não ser importante na etiologia de abortos bovinos, como é *N. caninum* (Reitt et al., 2007; Costa et al., 2011; Tramuta et al., 2011). Porém, os autores utilizaram o sequenciamento para a caracterização de *N. caninum*, já que seus objetivos eram avaliar as características genéticas de rDNAs amplificados entre os fetos.

Diversos métodos de PCR têm sido desenvolvidos, visando amplificar fragmentos da região ITS1 e Nc5, específicas para *N. caninum*, objetivando aumentar a sensibilidade e especificidade (Ghalimi et al., 2008; Cabral et al., 2009; Collantes-Fernández et al., 2002). Hughes et al. (2006) apontam que o uso da *nested* ou *semi-nested* PCR pode aumentar a sensibilidade e eficácia diagnóstica de *N. caninum* ou *T. gondii*, do que quando comparado ao uso da PCR simples.

Cabral et al. (2009), avaliando a técnica de *nested*-PCR para as regiões ITS1 do DNA ribossomal e Nc5 do DNA genômico, para diagnóstico de *N. caninum* em fetos bovinos abortados, obtiveram melhor resultado ao utilizarem primers da região Nc5 (20,95% de taxa de positividade), quando comparado aos

direcionados à região ITS1 (6,66% de casos positivos). Apesar disto, evidências sugerem cada vez mais que a região ITS1 permanece um marcador espécie-específico de grande valia para os membros da família Sarcocystidae (Schaes et al., 2002; Šlapeta et al., 2002; Tenter et al., 2002; Santos et al., 2011), já que apresenta um alto grau de variação entre as espécies do grupo (Homan et al., 1997; Dubey et al., 2002).

A região ITS1 é uma sequência altamente conservada (Payne and Ellis, 1996), com 100% de similaridade entre vários isolados de *Toxoplasma gondii* (Homan et al., 1997). No entanto, Gondim et al. (2004) verificaram pequenas diferenças entre as variantes de *N. caninum*, principalmente quando se compara o tipo NC-Bahia com os outros tipos. Os isolados no presente estudo apresentaram alta similaridade (98 e 99%) na sequência, quando comparados às cepas CN, SH, ZS e QH de *Toxoplasma gondii*, depositadas no GenBank (NCBI).

Al-Qassab et al. (2009), usando também o par de primers Tim3/Tim11 (descrito por Payne and Ellis, 1996) obtiveram amplificação de DNA de *Toxoplasma gondii* em filhotes caninos, ou seja, o primer se anela a regiões similares entre *N. caninum* e *T. gondii*. Assim, quando se utilizam estes primers, ou o par de primers utilizado no presente estudo, deve-se realizar sequenciamento genético da região amplificada, ou ainda uma *nested* ou *semi-nested* PCR, utilizando primers internos mais específicos para cada espécie,

como os pares NS1/SR1 (*N. caninum*) e TS3/SR1 (*T. gondii*), descritos por Payne and Ellis (1996).

Um dos animais do presente estudo (animal C) apresentou marcação imuno-histoquímica positiva anti-*T. gondii* e negativa anti-*N. caninum*. Porém, este mesmo animal foi negativo à análise molecular pela PCR convencional. Santos et al. (2011) apontam que, embora a PCR seja uma técnica bastante sensível e específica, a chance de encontrar DNA do parasita em pequenas quantidades (pequenos volumes) de tecido (extração usando kits comerciais) é menor, o que realmente poderia ter ocorrido, já que foi possível observar apenas um único cisto tecidual em todos os cortes histológicos de SNC do animal, sugerindo baixa carga parasitária.

A utilização da PCR, através da amplificação da região ITS1, se mostrou importante em detectar a presença de protozoários em tecidos de cães necropsiados com sintomatologia neuromuscular ou histórico de terapia/doença imunossupressora concomitante, ou naqueles com lesões histopatológicas sugestivas de infecção por *N. caninum* ou *T. gondii*. No entanto, os primers do presente estudo devem ser utilizados como sinalizadores da presença de material genético destes parasitos, já que tanto *N. caninum* quanto *T. gondii* podem ser diagnosticados, exigindo que técnicas como a *nested* ou *semi-nested* PCR com outros primers mais específicos, ou ainda o sequenciamento genético, devam ser utilizados para confirmar a espécie envolvida.



*Neospora caninum* parece não ser um agente etiológico importante causando lesões patológicas ou doença clínica em cães da região estudada, diferentemente de *T. gondii*. Toxoplasmose canina clínica raramente resulta de infecções primárias, sendo que a maioria dos cães que apresentam lesões causadas por *T. gondii* apresentam, simultaneamente, infecção pelo vírus da cinomose ou outra condição imunossupressora (Dubey et al., 2003), corroborando com os resultados observados no presente experimento.

### **Agradecimentos**

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de mestrado e à FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo auxílio financeiro.

### **5. Referências**

- Al-Qassab, S., Reichel, M.P., Su, C., Jenkins, D., Hall, C., Windsor, P.A., Dubey, J.P., Ellis, J., 2009. Isolation of *Toxoplasma gondii* from the brain of a dog in Australia and its biological and molecular characterization. *Vet. Parasitol.* 164, 335-339.
- Bandini, L.A., Neto, A.F.A., Pena, H.F.J., Cavalcante, G.T., Schares, G., Nishi, S.M., Gennari, S.M., 2011. Experimental infection of dogs (*Canis familiaris*) with sporulated oocysts of *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 176, 151-156.

Barber, J.S., Payne-Johnson, C.E., Trees, A.J., 1996. Distribution of *Neospora caninum* within the central nervous system and other tissues of six dogs with clinical neosporosis. *J. Small Anim. Pract.* 37(12), 568-547.

Barr, S.C., Gossett, K.A., Klei, T.R., 1991. Clinical, clinicopathologic, and parasitologic observations of trypanosomiasis in dogs infected with North American *Trypanosoma cruzi* isolates. *Am. J. Vet. Res.* 52, 954-960.

Basso, W., Venturini, M.C., Bacigalupe, D., Kienast, M., Unzaga, J.M., Larsen, A., Machuca, M., Venturini, L., 2005. Confirmed clinical *Neospora caninum* infection in a boxer puppy from Argentina. *Vet. Parasitol.* 131, 299-303.

Bjerkås, I., Mohn, S.F., Presthus, J., 1984. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and miositis in dogs. *Z. Parasitenkd.* 70, 271-274.

Cabral, A.D., Camargo, C.N., Galleti, N.T., Okuda, L.H., Pituco, E.M., Fava, C.D., 2009. Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histology, immunohistochemistry, and nested-PCR. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 18(4), 14-19.

Collantes-Fernández, E., Zaballos, A., Alvarez-García, G., Ortega-Mora, L.M., 2002. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40(4), 1194-1198.

Corbellini, L.G., Driemeier, D., Cruz, C.F., Gondim, L.F., Wald, V., 2002. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 103(3), 195-202.

Costa, G.H.N., Costa, A.J., Lopes, W.D.Z., Bresciani, K.D.S., Santos, T.R., Esper, C.R. Santana, A.E., 2011. *Toxoplasma gondii*: infection natural congenital in cattle and an experimental inoculation of gestating cows with oocysts. *Exp. Parasitol.* 127, 277-281.

Cringoli, G., Rinaldi, L., Capuano, F., Baldi, L., Veneziano, V., Capelli, G., 2002. Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dogs. *Vet. Parasitol.* 106(4), 307-313.

Dubey, J.P., 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.* 41, 1-16.

Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 67, 1-59.

Dubey, J.P., Schares, G., 2006. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet. Parasitol.* 140, 1-34.

Dubey, J.P., Schares, G., 2011. Neosporosis in animals – The last five years. *Vet. Parasitol.* 180, 90-108.

Dubey, J.P., Carpenter, J.L., Speer, C.A., Toper, M.J., Uggla, A., 1988. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192, 1269-1285.

Dubey, J.P., Dorrough, K.R., Jenkins, M.C., Lidell, S., Speer, C.A., Kwok, O.C.H., Shen, S.K., 1998. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. *Int. J. Parasitol.* 28, 1293-1304.

Dubey, J.P., Barr, B.C., Barta, J.R., Bjerås, I., Björkman, C., Blagburn, B.L., Bowman, D.D., Buxton, D., Ellis, J.T., Gottstein, B., Hemphill, A., Hill, D.E., Howe, D.K., Jenkins, M.C., Kobayashi, Y., Koudela, B., Marsh, A.E., Mattsson, J.G., McAllister, M.M., Modrý, D., Omata, Y., Sibley, L.D., Speer, C.A., Trees, A.J., Uggla, A., Upton, S.J., Williams, D.J.L., Lindsay, D.S., 2002. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int. J. Parasitol.* 32, 929-946.

Dubey, J.P., Ross, A.D., Fritz, D., 2003. Clinical *Toxoplasma gondii*, *Hammondia heydorni*, and *Sarcocystis* sp. infections in dogs. *Parasitologia* 45, 141-146.

Dubey, J.P., Sreekumar, C., Knickman, E., Miska, K.B., Vianna, M.C.B., Kwok, O.C.H., Hill, D.E., Jenkins, M.C., Lindsay, D.S., Greene, C.E., 2004. Biologic,

morphologic, and molecular characterization of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. *Int. J. Parasitol.* 34, 1157-1167.

Dubey, J.P., Chapman, J.L., Rosenthal, B.M., Mense, M., Schuler, R.L., 2006. Clinical *Sarcocystis neurona*, *Sarcocystis canis*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* infections in dogs. *Vet. Parasitol.* 137, 36-49.

Dubey, J.P., Vianna, M.C.B., Kwok, O.C.H., Hill, D.E., Miska, K.B., Tuo, W., Velmurugan, G.V., Conors, M., Jenkins, M.C., 2007. Neosporosis in Beagle dogs: clinical signs, diagnosis, treatment, isolation and genetic characterization of *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 149, 158-166.

Georgieva, D.A., Prelezov, P.N., Koinarski, T.S., 2006. *Neospora caninum* and neosporosis in animals – a review. *Bulg J. Vet. Med.* 9, 1-26.

Ghalmi, F., China, B., Kaidi, R., Daube, G., Losson, B., 2008. Detection of *Neospora caninum* in dogs using real time PCR systems. *Vet. Parasitol.* 155, 161-167.

Gondim, L.F.P., Pinheiro, A.M., Santos, P.O.M., Jesus, E.E.V., Ribeiro, M.B., Fernandes, H.S., Almeida, M.A.O., Freire, S.M., Meyer, M.B., McAllister, M.M., 2001. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. *Vet. Parasitol.* 101, 1-7.

Gondim, L.F.P., Laski, P., Gao, L., McAllister, M.M., 2004. Variation of the internal transcribed spacer 1 sequence within individual strains and among different strains of *Neospora caninum*. J. Parasitol. 90(1), 119-122.

Homan, W.L., Limper, L., Verlaan, M., Borst, A., Vercammen, M., van Knapen, F., 1997. Comparison of the internal transcribed spacer, ITS 1, from *Toxoplasma gondii* isolates and *Neospora caninum*. Parasitol. Res. 83, 285-289.

Hughes, J.M., Williams, R.H., Morley, E.K., Cook, D.A.N., Terry, R.S., Murphy, R.G., Smith, J.E., Hide, G., 2006. The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. Parasitol. 132, 29-36.

La Perle, K.M., Del Piero, F., Carr, R.F., Harris, C., Stromberg, P.C., 2001. Cutaneous neosporosis in two adult dogs on chronic immunosuppressive therapy. J. Vet. Diagn. Invest. 13(3), 252-255.

Lindsay, D.S., Dubey, J.P., 2000. Canine neosporosis. J. Vet. Parasitol. 14, 1-11.

Meseck, E.K., Njaa, B.L., Haley, N.J., Park, E.H., Barr, S.C., 2005. Use of a multiplex polymerase chain reaction to rapidly differentiate *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* in an adult dog with necrotizing myocarditis and myocardial infarct. J. Vet. Diagn. Invest. 17, 565-568.

Nishikawa, Y., Claveria, F.G., Fujisaki, K., Nagasawa, H., 2002. Studies on serological cross-reaction of *Neospora caninum* with *Toxoplasma gondii* and *Hammondia heydorni*. J. Vet. Med. Sci. 64 (2), 161-4.

Odin, M., Dubey, J.P., 1993. Sudden death associated with *Neospora caninum*-myocarditis in a dog. J. Am. Vet. Med. Assoc. 293, 831-833.

Park, C.H., Ikadai, H., Yoshida, E., Isomura, H., Inukai, H., Oyamada, T., 2007. Cutaneous Toxoplasmosis in a Female Japanese Cat. Vet. Pathol. 44, 683-687.

Payne, S., Ellis, J., 1996. Detection of *Neospora caninum* DNA by the polymerase chain reaction. Int. J. Parasitol. 26, 347-351.

Peters, M., Wagner, F., Schares, G., 2000. Canine neosporosis: clinical and pathological findings and first isolation of *Neospora caninum* in Germany. Parasitol. Res. 86, 1-7.

Reitt, K., Hilbe, M., Voegtlin, A., Corboz, L., Haessig, M., Pospischil, A., 2007. Aetiology of bovine abortion in Switzerland from 1986 to 1995 – a retrospective study with emphasis on detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* by PCR. J. Vet. Med. A 54, 15-22.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74(12), 5463-5467.

Santos, S.D., Andrade, M.P., Varaschin, M.S., Guimarães, A.M., Hirsch, C., 2011. *Neospora caninum* in bovine fetuses of Minas Gerais, Brazil: genetic characteristics of rDNA. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 20(4), 281-288.

Schares, G., Heydorn, A.O., Cüppers, A., Mehlhorn, H., Geue, L., Peters, M., Conraths, F.K., 2002. In contrast to dogs, red foxes (*Vulpes vulpes*) did not shed *Neospora caninum* upon feeding of intermediate host tissues. *Parasitol. Res.* 88, 44-52.

Silva, D.A., Lobato, J., Mineo, T.W., Mineo, J.R., 2007. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.* 143, 234-244.

Šlapeta, J.R., Koudela, B., Votypka, J., Modry, D., Horejs, R., Lukes, J., 2002. Coprodiagnosis of *Hammondia heydorni* in dogs by PCR based amplification of ITS 1 rRNA: differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*. *Vet. J.* 163, 147-154.

Tarantino, C., Rossi, G., Kramer, L.H., Perrucci, S., Cringoli, G., Macchioni, G., 2001. *Leishmania infantum* and *Neospora caninum* simultaneous skin infection in Young dog in Italy. *Vet. Parasitol.* 102, 77-83.



Tenter, A.M., Barta, J.R., Beveridge, I., Duszynski, D.W., Mehlhorn, H., Morrison, D.A., Thompson, R.C.A., Conrad, P.A., 2002. The conceptual basis for a new classification of the coccidia. *Int. J. Parasitol.* 32, 595-616.

Tramuta, C., Lacerenza, D., Zoppi, S., Goria, M., Dondo, A., Ferroglio, E., Nebbia, P., Rosati, S., 2011. Development of a set of multiplex standad polymerase chain reaction assays for the identification of infectious agents from aborted bovine clinical samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23(4), 657-666.

Varaschin, M.S., Hirsch, C., Wouters, F., Nakagaki, K.Y.R., Guimarães, A.M., Santos, D.S., Bezerra Jr., P.S., Costa, R.C., Peconick, A.P., Langohr, I.M., 2012. Congenital neosporosis in goats from the State of Minas Gerais, Brazil. *Korean J. Parasitol.* (in press).

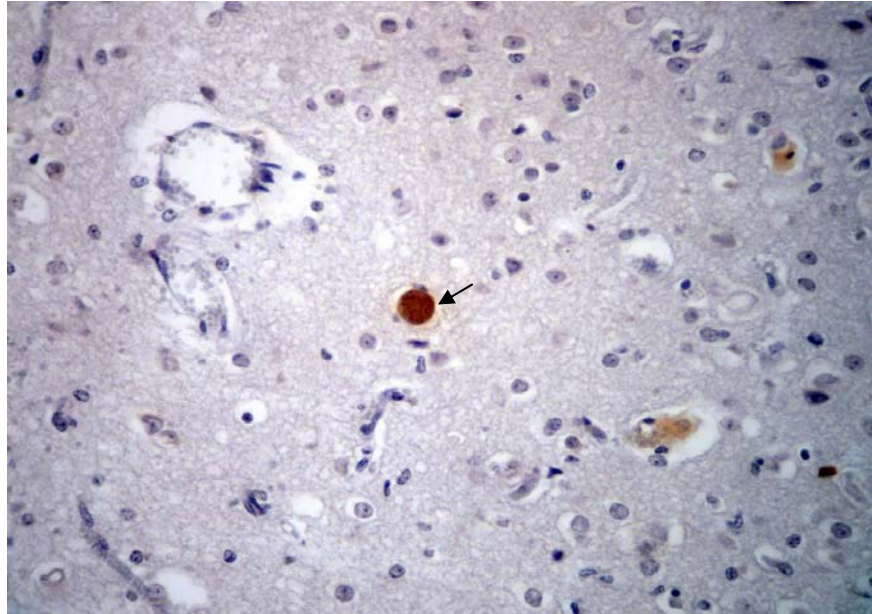


Figura 1 – Cérebro de caprino controle-positivo mostrando cisto de *Neospora caninum* (seta). Técnica biotina-estreptavidina-peroxidase. DAB. Obj.40x.

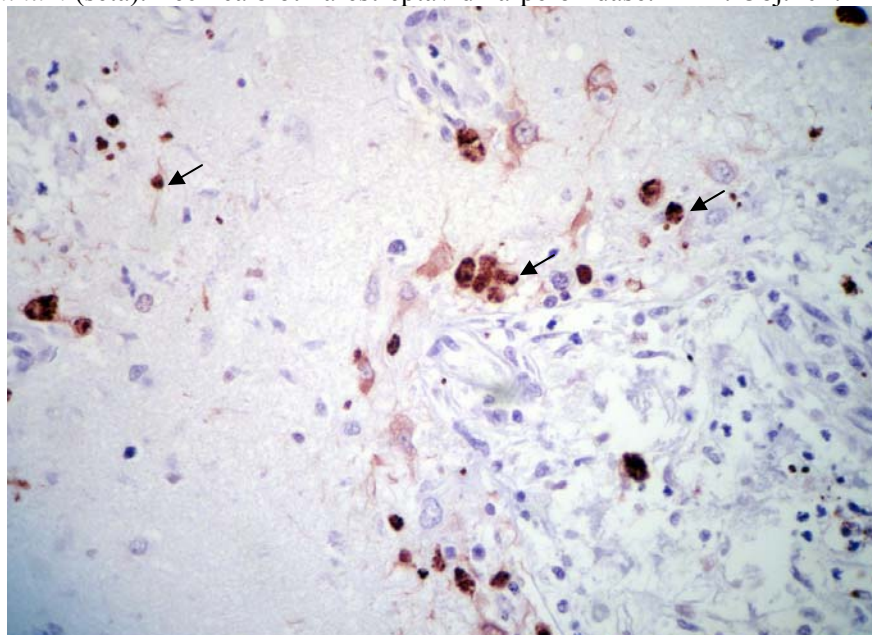


Figura 2 – Córtex cerebral de canino controle-positivo mostrando taquizoítos de *Toxoplasma gondii* marcados isolados ou em grupos (setas). Técnica biotina-estreptavidina-peroxidase. DAB. Obj.40x.

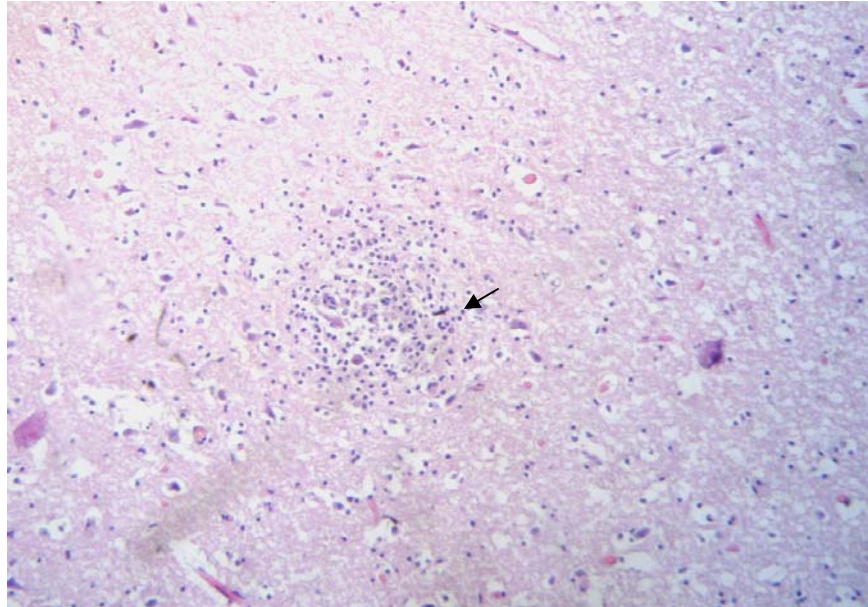


Figura 3 – Encéfalo (colículo rostral) de cão (animal C) evidenciando área de discreta gliose focal (seta). H.E. Obj.20x

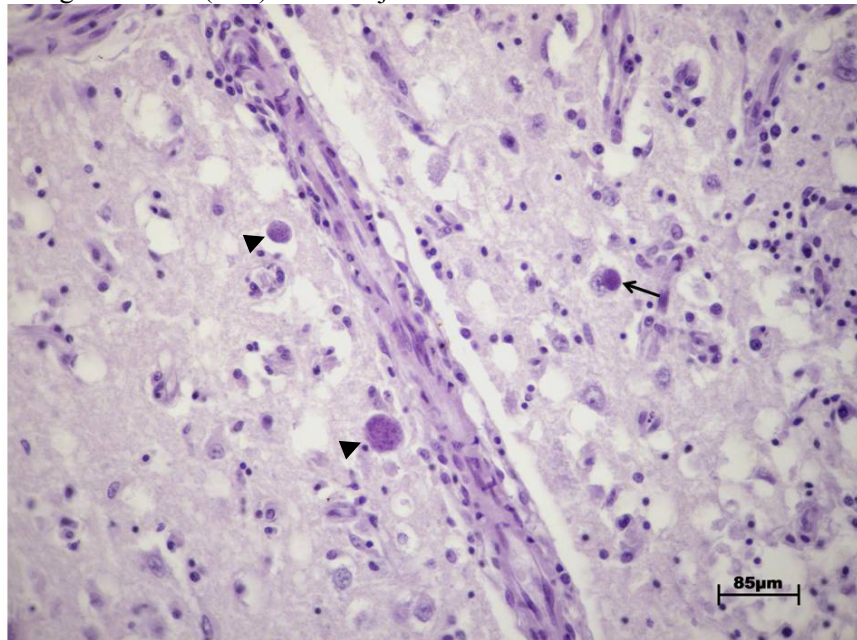


Figura 4 – Córtex cerebral de cão (animal D) evidenciando cistos basofílicos de protozoários dentro do citoplasma de um neurônio (seta) ou próximos de vasos sanguíneos (cabeças de seta) associados a células inflamatórias. H.E. Obj.40x.

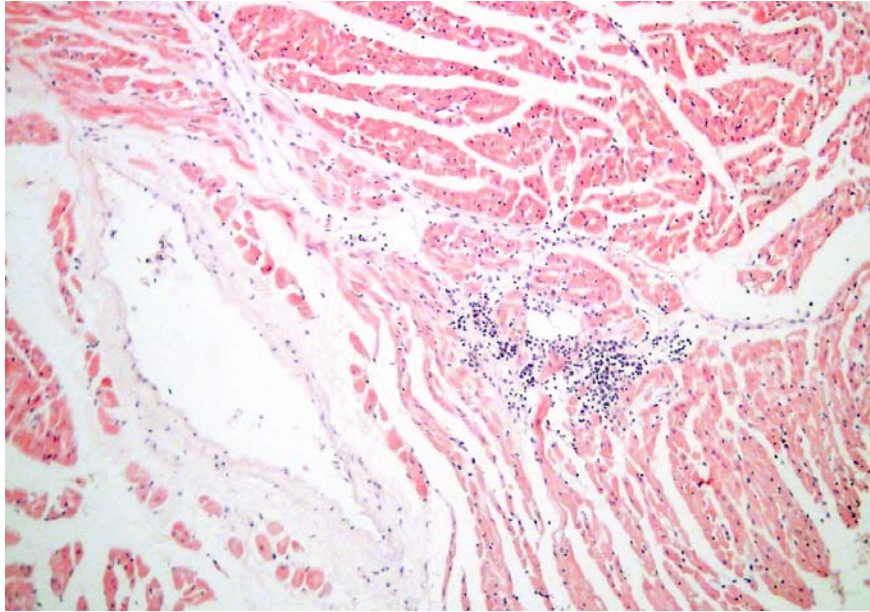


Figura 5 – Coração de cão (animal B) mostrando infiltrado inflamatório mononuclear moderado entre as fibras cardíacas. H.E. Obj.20x.

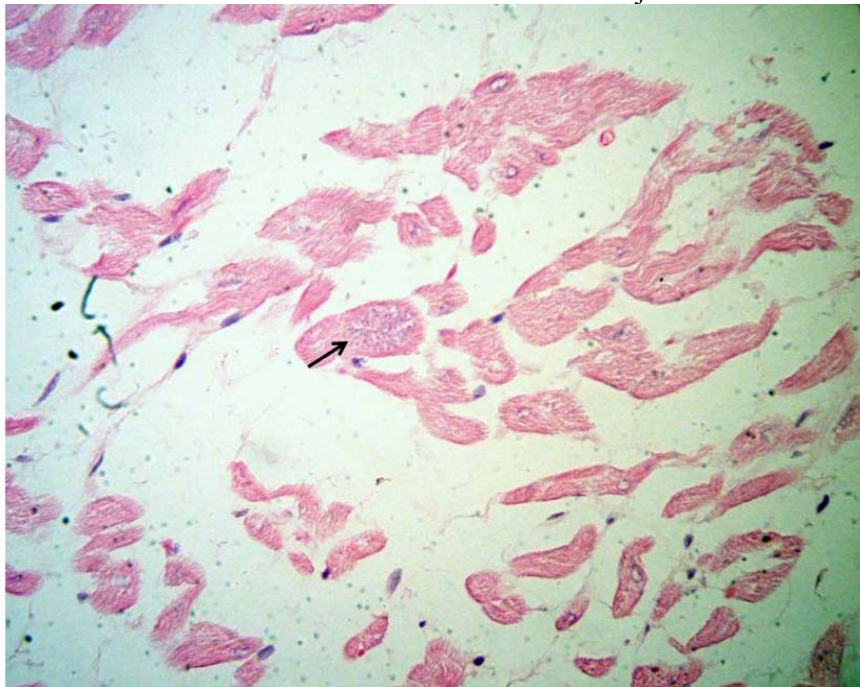


Figura 6 – Coração de cão (animal A) evidenciando a presença de grupo de taquizoítos dentro de uma fibra cardíaca (seta). H.E. Obj.40x.

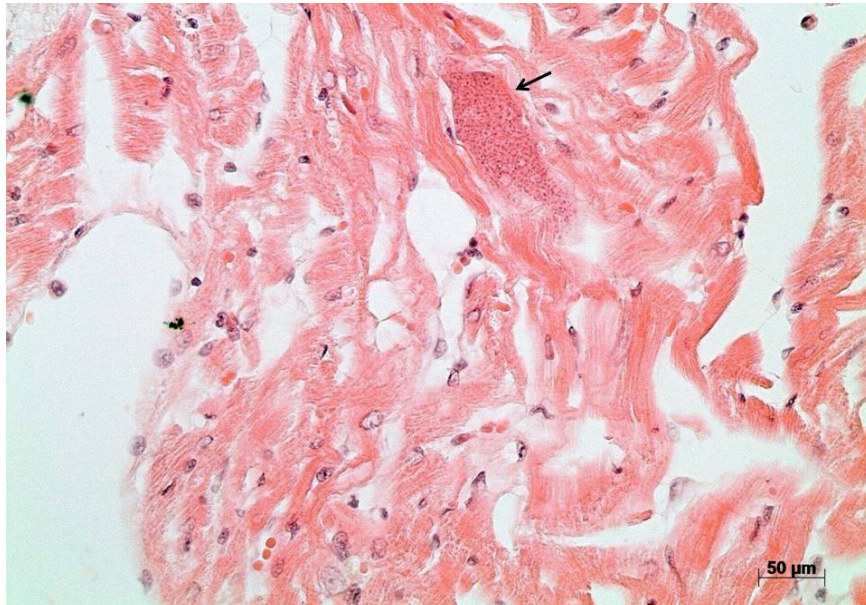


Figura 7 – Coração de cão (animal B) evidenciando a presença de taquizoítos delimitados dentro de fibra cardíaca (seta). H.E. Obj.40x.

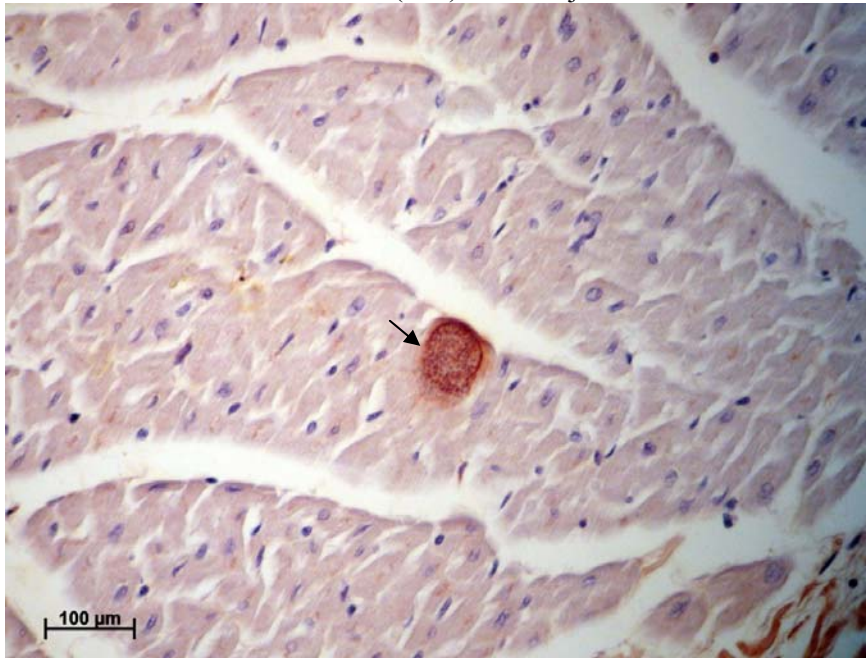


Figura 8 – Coração de cão (animal B) mostrando marcação imuno-histoquímica anti-*Toxoplasma gondii* positiva de taquizoítos (seta). Método biotina-estreptavidina-peroxidase. DAB. Obj.40x.

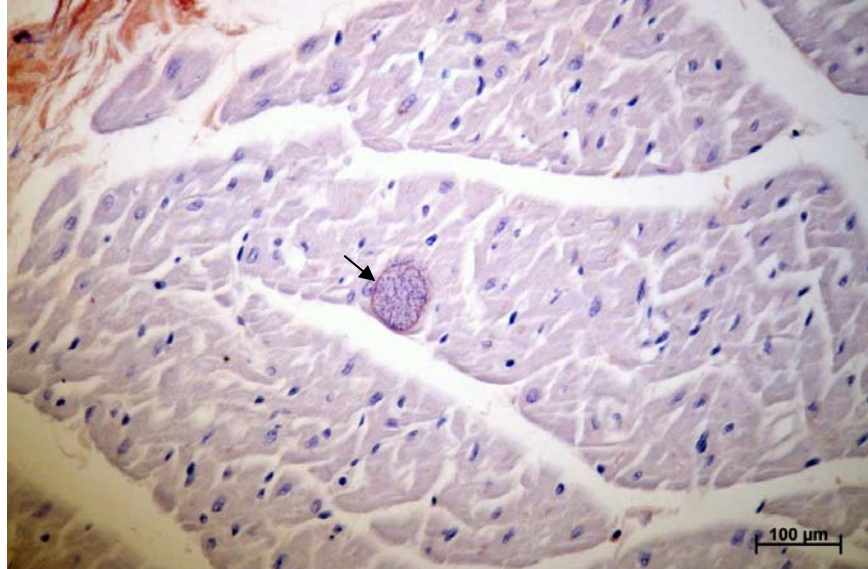


Figura 9 – Coração de cão (animal B) mostrando marcação imuno-histoquímica anti-*Neospora caninum* negativa, evidenciando somente marcação periférica (seta). Método biotina-estreptavidina-peroxidase. DAB. Obj.40x.

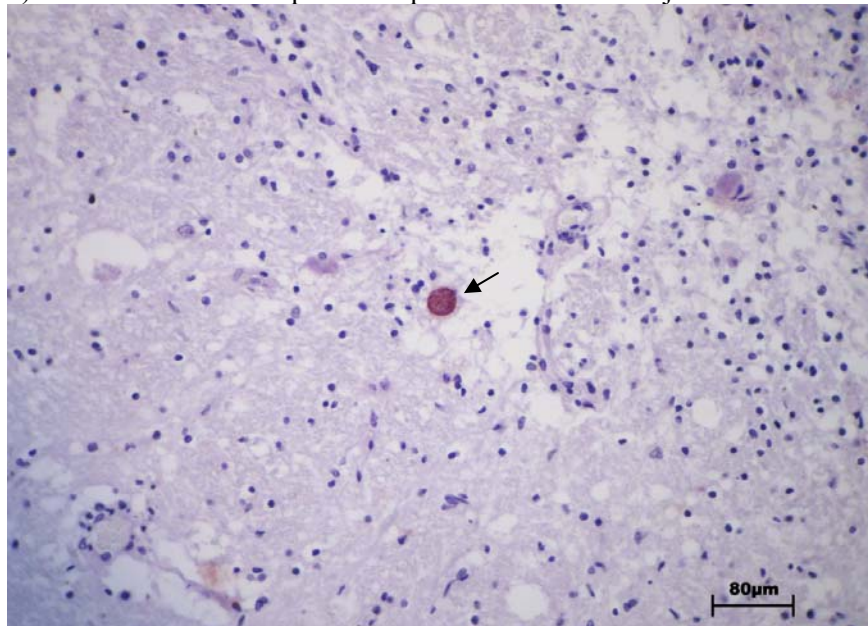


Figura 10 – Cérebro de cão (animal C) evidenciando marcação imuno-histoquímica anti-*Toxoplasma gondii* positiva de cisto tecidual (seta). Método biotina-estreptavidina-peroxidase. DAB. Obj.40x.

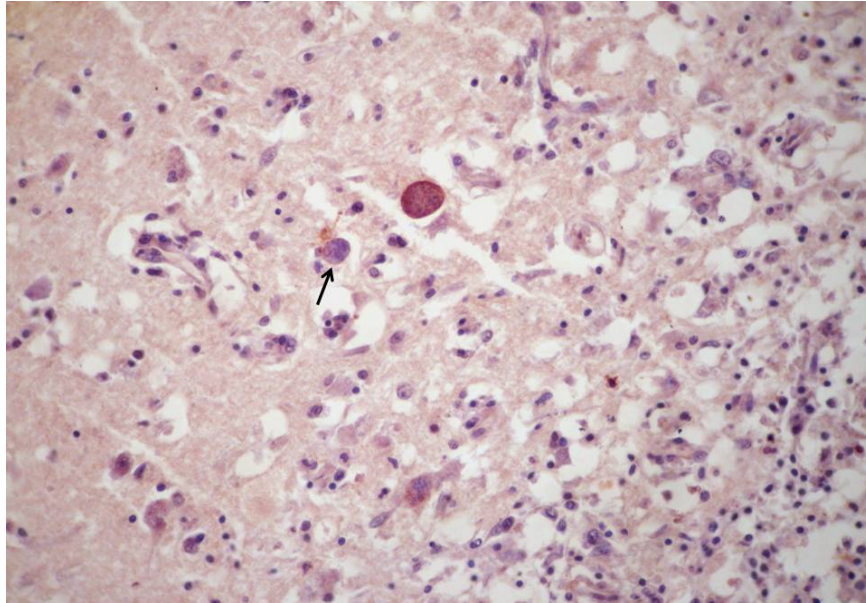


Figura 11 – Cérebro de cão (animal D) mostrando marcação imuno-histoquímica anti-*Neospora caninum* positiva de cisto tecidual. Note cisto sem marcação (seta). Método biotina-estreptavidina-peroxidase. DAB. Obj.40x.

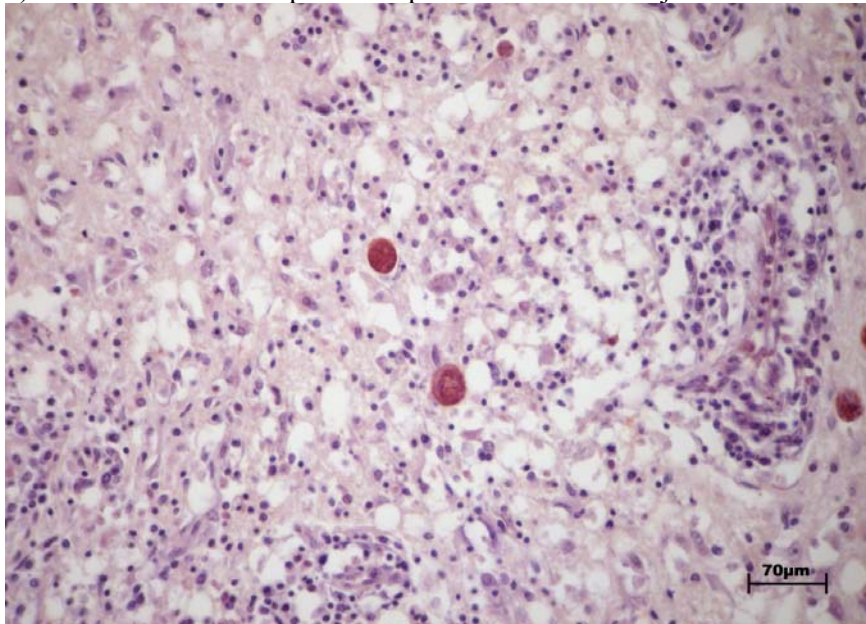


Figura 12 – Cérebro de cão (animal D) evidenciando marcação imuno-histoquímica anti-*Toxoplasma gondii* positiva de cistos teciduais. Método biotina-estreptavidina-peroxidase. DAB. Obj.40x.

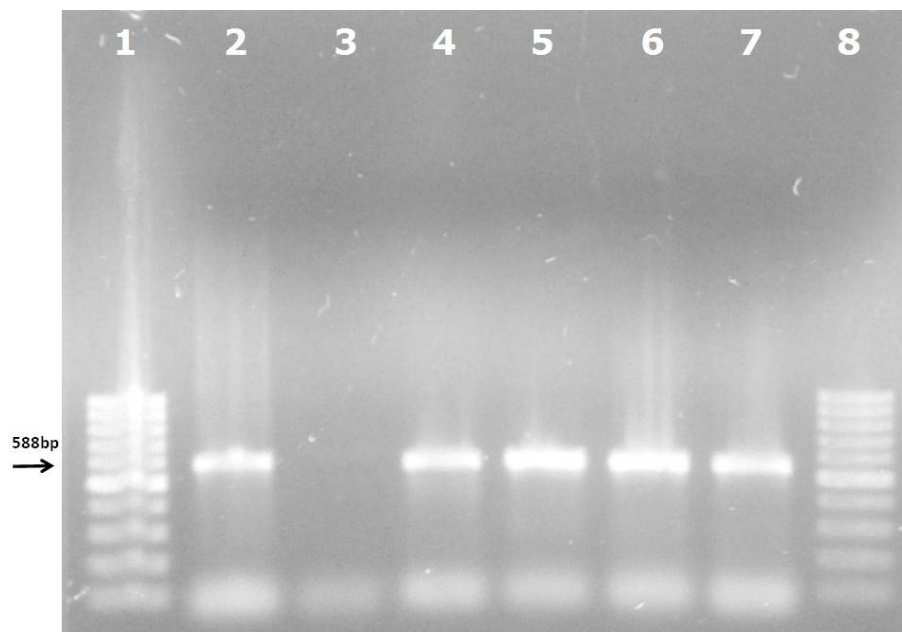


Figura 13 – Bandas de DNA visualizadas após eletroforese de material amplificado por PCR. Linhas: 1 e 8) marcador ladder 100bp; 2) controle positivo (588pb); 3) controle negativo; 4) cérebro animal B; 5) coração animal B; 6) cérebro animal D; 7) coração animal D. Gel agarose 1%. Brometo de etídeo.



<i>N. caninum</i>	<b>CTCCGGAAGGATCAFFC</b> CACAGTCCTTTATTCCTTTTCACCCCTCAACCTTTGAATCCCAA	60
<i>T. gondii</i> (RH)	<b>CTCCGGAAGGATCAFFC</b> CACAGTCCTTTATTCCTTTTCACCCCTCAACCTTTGAATCCCAA	60
<i>T. gondii</i> (ME49)	<b>CTCCGGAAGGATCAFFC</b> CACAGTCCTTTATTCCTTTTCACCCCTCAACCTTTGAATCCCAA	60
	* * * * *	
	<b>TS1</b> →	
<i>N. caninum</i>	ACAAAACATGAGCTTGTATCTCTCTCTCCGAGAGGGGTACATTCAGAAGCGGTGATAT	120
<i>T. gondii</i> (RH)	GCAAAACATGAGCTTGCATCTCTCTCCATTTGGAGAGATTTGCATTCAAGAAGCGGTGATAG	120
<i>T. gondii</i> (ME49)	GCAAAACATGAGCTTGCATCTCTCTCCATTTGGAGAGATTTGCATTCAAGAAGCGGTGATAG	120
	* * * * *	
<i>N. caninum</i>	ACTACTCCCTGTGAGTGTATCCCTTCTTCATGT-GGATATTTTGCACACTACTGTGATCA	180
<i>T. gondii</i> (RH)	-----TATCGAAAGGTATATTTGCCCTTCTTCATGTTGGATATCTCGCCCTGCT-----	180
<i>T. gondii</i> (ME49)	-----TATCGAAAGGTATATTTGCCCTTCTTCATGTTGGATATCTCGCCCTGCT-----	180
	* * * * *	
	<b>HS1</b> →	
<i>N. caninum</i>	GGCGTCTATTTGAACCCCTGATTAATGAAAGCTGTGCATATATCCGGGAGTGTACGGCGA	240
<i>T. gondii</i> (RH)	-----TCCAAATTTGGAAGCCAGTGCAGGTATCCGGGGTGCACAGCGA	240
<i>T. gondii</i> (ME49)	-----TCCAAATTTGGAAGCCAGTGCAGGTATCCGGGGTGCACAGCGA	240
	* * * * *	
<i>N. caninum</i>	AGGGACTCCGTCACTGGAAATTAATGTCTCTATTGGACTTTAATTCACAGGATTTCTT	300
<i>T. gondii</i> (RH)	AGGGGCTCAATTTCTGGAAATTCGTGTCTCTGTTGGATACTGATTTCCAGGATTTCTT	300
<i>T. gondii</i> (ME49)	AGGGGCTCAATTTCTGGAAATTCGTGTCTCTGTTGGATACTGATTTCCAGGATTTCTT	300
	* * * * *	
	<b>TS1</b>	
<i>N. caninum</i>	CAATGTGCATTCCTTTTTCACACCGGTTATTTTAAACCACAAATCTGGATAGCGTTGA	360
<i>T. gondii</i> (RH)	CAATGTGCATTCCTTTTTCACACCGGTTATTTTAAACCACAAATCTGGATAGCGTTGA	360
<i>T. gondii</i> (ME49)	CAATGTGCATTCCTTTTTCACACCGGTTATTTTAAACCACAAATCTGGATAGCGTTGA	360
	* * * * *	
<i>N. caninum</i>	GGGA-AGAGAAGATGGTCTCTTTCTGTATTTCTCTCTATTCGCTTTCAGATTACTACT	420
<i>T. gondii</i> (RH)	GAGAGATGAAAGATGGTATCTTTCTGCATCTCTCTCGATGTGCTTTCAGATTGCTTCTCT	420
<i>T. gondii</i> (ME49)	GAGAGATGAAAGATGGTATCTTTCTGCATCTCTCTCGATGTGCTTTCAGATTGCTTCTCT	420
	* * * * *	
<i>N. caninum</i>	AAAACTATAATGTTTTTCTAAATTTTCAGCAATGGATGCTTTGGCTCCGGCAACGATGA	480
<i>T. gondii</i> (RH)	AA--ACTATAATGTTATTTTAAATTTTCAGCAATGGATGCTTTGGCTCCGGCAACGATGA	480
<i>T. gondii</i> (ME49)	AA--ACTATAATGTTATTTTAAATTTTCAGCAATGGATGCTTTGGCTCCGGCAACGATGA	480
	* * * * *	
<i>N. caninum</i>	AGGACCCAGCGAACTCCGAAACCAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCATCAGATTT	540
<i>T. gondii</i> (RH)	AGGACCCAGCGAACTCC- AALCCCAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCATCAGATTT	540
<i>T. gondii</i> (ME49)	AGGACCCAGCGAACTCCGAAACCAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCATCAGATTT	540
	* * * * *	
<i>N. caninum</i>	CTGAACCCAAATGCCACCTTGGGGATATTCCTCTGGTACGCTGTTTCAGTGTCTTTGA	600
<i>T. gondii</i> (RH)	CTGAACCCAAATGCCACCTTGGGGATATTCCTCTGGTACGCTGTTTCAGTGTCTTTGA	600
<i>T. gondii</i> (ME49)	CTGAACCCAAATGCCACCTTGGGGATATTCCTCTGGTACGCTGTTTCAGTGTCTTTGA	600
	* * * * *	
<i>N. caninum</i>	AATCACAAATTTCTGCTTTT-AGGSTCGTTGCTTCGGTCTCACTGGAGCCGCTAAGAG	660
<i>T. gondii</i> (RH)	AATCACAAATTTCTGCTTTT-AGGSTCGTTGCTTCAGTTTGGCTGAAGCCCTTAGGAG	660
<i>T. gondii</i> (ME49)	AATCACAAATTTCTGCTTTT-AGGSTCGTTGCTTCAGTTTGGCTGAAGCCCTTAGGAG	660
	* * * * *	
<i>N. caninum</i>	CAGTATGATGGGTGTGATGAGTGTGAATACTCAATGTGATCTGAAATTAATGAACACAG	720
<i>T. gondii</i> (RH)	CAGTATGATGGGTGTGATGAGTGTGAATACTCAATGTGATCTGAAATTAATGAACACAG	720
<i>T. gondii</i> (ME49)	CAGTATGATGGGTGTGATGAGTGTGAATACTCAATGTGATCTGAAATTAATGAACACAG	720
	* * * * *	

Figura 14 – Sequência de alinhamento da região espaçadora transcrita (ITS1) de *Neospora caninum* (Registro L49389 GenBank) e *Toxoplasma gondii* (Registro L49390 GenBank). A homologia de nucleotídeos é mostrada por \*. As regiões de anelamento do primer Lav1 (retângulo superior) e do primer Tim11 (retângulo inferior) são exatamente iguais entre as duas espécies (Adaptado de Payne and Ellis, 1996).

Quadro 1 – Resultados histopatológicos, imuno-histoquímicos e moleculares dos cães necropsiados entre janeiro/2010 a dezembro/2011 na Universidade Federal de Lavras-MG, e que apresentaram estruturas parasitárias em cortes histológicos.

Cão	Lesões HE	Lesões estruturas parasitárias	IHQ <i>N. caninum</i>	IHQ <i>T. gondii</i>	PCR	Resultado sequenciamento nucleotídeos	Causa <i>Mortis</i>
A	Meningite não supurativa discreta; raros focos de gliose em córtex. Miocardite não supurativa multifocal discreta.	Raros Grupos de Taquizoítos (Coração)	-	-	-	-	IRC
B	Encefalite mononuclear discreta e focal (manguito linfoplasmocitário). Área focal de proliferação difusa de células da glia. Miocardite linfoplasmocítica multifocal moderada	Raros Grupos de taquizoítos (Coração)	-	+	+(coração e cérebro)	<i>T. gondii</i>	IRC
C	Áreas multifocais de gliose (forma de nódulos ou difusas) e encefalite difusa mononuclear leve. Miocardite linfoplasmocítica discreta.	Cisto Único (SNC)	-	+	-	-	IRC
D	Encefalite não supurativa multifocal acentuada com proliferação focal e difusa de células da glia; áreas de malácia, principalmente em córtex cerebral. Miocardite não supurativa multifocal discreta com área focal de fibrose	Diversos Taquizoítos e cistos (SNC)	+	+	+(coração e cérebro)	<i>T. gondii</i>	cinomose

HE: hematoxilina e eosina; IHQ: imuno-histoquímica; PCR: Reação em Cadeia da Polimerase (amplificação do produto de 588pb); SNC: sistema nervoso central; +: positivo; -: negativo; IRC: Insuficiência renal crônica.