

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E CLINICAS

ROSÂNGELA SOARES UZÊDA

**FATORES ASSOCIADOS À PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS IgG  
ANTI-*Neospora caninum* EM CAPRINOS LEITEIROS –  
RESULTADOS PRELIMINARES.**

SALVADOR  
2004

ROSÂNGELA SOARES UZÊDA

**FATORES ASSOCIADOS À PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS IgG  
ANTI-*Neospora caninum* EM CAPRINOS LEITEIROS –  
RESULTADOS PRELIMINARES.**

Monografia apresentada ao curso de  
graduação em Medicina Veterinária,  
Escola de Medicina Veterinária,  
Universidade Federal da Bahia, como  
requisito parcial para obtenção do grau  
de Médico Veterinário.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Hélio Vilela Barbosa Junior.

Salvador  
Semestre 1 /2004

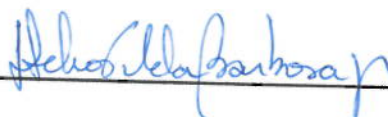
## TERMO DE APROVAÇÃO

**ROSÂNGELA SOARES UZÊDA**

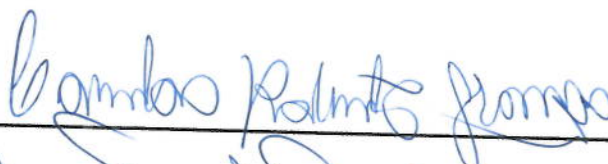
### FATORES ASSOCIADOS À PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS IgG ANTI-*Neospora caninum* EM CAPRINOS LEITEIROS – RESULTADOS PRELIMINARES.

Monografia aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:


Hélio Vilela Barbosa Junior:  
Presidente da Banca



Carlos Roberto Franke:



Luis Fernando Pita Gondim:



Apresentada em: 09 de dezembro de 2004.

*Ao meu pai, "Seu Zé", que está vendo a conclusão desta etapa em outro plano e por ter sempre priorizado minha educação.  
Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

*"Nosso maior desejo na vida é encontrar alguém que nos faça fazer o melhor que pudermos".*  
*Ralph Waldo Emerson.*

A Deus, por iluminar constantemente minha caminhada.

Aos meus pais, que sempre apoiaram minha vida acadêmica.

À Jennifer, pelo grande carinho expresso nestes oito anos de amizade.

Ao Professor Hélio, pela eterna orientação.

À Professora Ângela Ornelas por todos os direcionamentos.

Ao Professor Luis Fernando Pita Gondim, por toda a paciência e auxílio.

Às minhas grandes amigas Ana, Dam e Ritinha, que no momento mais difícil de minha vida, provaram o verdadeiro valor da amizade.

Ao meu sobrinho William, por trazer alegria para o meu coração.

Aos amigos do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses dos Animais: Alexandre, Érica e Virginia, por todo carinho e colaboração.

Às companheiras de curso e laboratório: Ana Karine, Ana Rosa, Amanditas, Taty e Suinha.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

*"A vida só pode ser compreendida olhando-se para trás; mas só pode ser vivida olhando-se para a frente."  
Soren Kierkegaard*

## RESUMO

A Neosporose é uma doença recentemente identificada como causadora de abortamentos na espécie caprina, e vários estudos têm sido realizados em outras espécies animais com o objetivo de conhecer os fatores de risco que podem levar à infecção pelo protozoário *Neospora caninum*. Objetivando a realização de um estudo epidemiológico transversal para conhecer a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em rebanhos de caprinos leiteiros e determinar as variáveis associadas a essa infecção, foram coletadas 249 amostras de sangue em oito rebanhos da região metropolitana de Salvador e um questionário epidemiológico foi aplicado em cada uma das propriedades. Do total, 29 animais (11,65%) de sete rebanhos positivos foram identificados pela técnica de Imunofluorescência Indireta. Foram considerados como fatores de risco: a presença de cães, mão de obra familiar, sistema de confinamento, presença de bovinos e ovinos, armazenamento inadequado de ração, riachos como fonte de água de bebida, instalações de chão batido, condições inadequadas de higiene e localização do capril a menos de 10 metros da casa do tratador ou proprietário. Enquanto que comprar animais de outras regiões foi fator de proteção à infecção por este protozoário. São necessários estudos mais aprofundados, assim como uma maior amostragem de rebanhos para validar os resultados encontrados para a população de caprinos do Estado da Bahia.

**Palavras-Chaves:** *Neospora caninum*, Caprinos, Risco.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ELISA - "Enzyme-linked immunosorbent assay" -Ensaio imunoenzimático

IFI - Imunofluorescência Indireta.

PBS -"Phosphate Buffered Saline" - Solução tampão fosfato.

PCR - "Polimerase Chain Reaction" – Reação de Polimerase em Cadeia.

VERO - Células renais do macaco verde africano.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
2.1 Classificação e isolamento do <i>Neospora caninum</i> .....	13
2.2 Distribuição da doença.....	14
2.3 Espécies acometidas.....	15
2.4 Vias de transmissão.....	16
2.5 Características clínicas.....	18
2.6 Métodos de diagnóstico.....	20
2.7 Neosporose em caprinos.....	22
2.8 Fatores que interferem na difusão e propagação da doença.....	27
2.8.1 Presença de cães.....	29
2.8.2 Presença de outros animais.....	32
2.8.3 Presença de canídeos selvagens.....	32
2.8.4 Fatores individuais.....	34
2.8.5 Fatores de manejo do rebanho.....	35
2.8.6 Alimentação dos animais.....	38
2.8.7 Renovação do rebanho.....	39
2.8.8 Soropositividade x Risco de aborto.....	40
2.8.9 Outros fatores.....	41
2.9 Impacto econômico da neosporose.....	42
2.10 Estratégias de controle.....	43
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	45
3.1 Animais.....	45
3.2 Questionário epidemiológico.....	45
3.3 Amostras de sangue.....	46
3.4 Análise sorológica.....	46
3.4.1 Antígeno de <i>N. caninum</i> .....	46
3.4.2 Reação de Imunofluorescência indireta (IFI).....	47
3.5 Análise estatística.....	46
<b>4. RESULTADOS</b> .....	48
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	49

<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>53</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>69</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>72</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O protozoário *Neospora caninum* foi descrito pela primeira vez na Noruega em 1984, como responsável por encefalite e miosite em cães (BJERKAS, MOHN e PRESTHUS, 1984). Em 1988 este coccídeo, foi isolado e classificado por Dubey *et al.* (1988a) e hoje a neosporose é reconhecida como importante causa de abortamentos e perdas neonatais em bovinos. (DUBEY e LINDSAY, 1996). Na espécie caprina há poucos estudos sobre a doença, sendo o primeiro caso descrito por Dubey, Hollis e Romand (1992), por análise histológica de um feto abortado de caprino. Neste mesmo ano, Barr *et al.* (1992) associaram abortamentos em caprinos com a infecção por *N. caninum*. No Brasil, CORBELLINI, COLODEL e DRIEMEIER (2001) relataram um caso de neosporose congênita em um caprino da raça Saanen. Na Bahia, Uzêda *et al.* (2001) encontraram a frequência de 15,10% de soropositividade em caprinos em amostras séricas, coletadas em 1995, de rebanhos do Estado da Bahia.

Estudos epidemiológicos vêm sendo realizados para determinar os fatores de risco que estão associados à infecção de bovinos pelo protozoário *N. caninum*, (HEMPHILL e GOTTSTEIN, 2000).

Sanderson, Gay e Baszler (2000) e Barling *et al.* (2001) realizaram estudos epidemiológicos para verificar a existência de fatores associados à infecção de bovinos de corte por *N. caninum*. Apesar de todos os relatos nesta espécie e das

informações disponíveis a respeito das grandes perdas econômicas na indústria de carne e leite, pouco é conhecido sobre os fatores que contribuem para a exposição dos bovinos ao *N. caninum*.

A presença do cão nas fazendas constitui o mais importante fator de risco para a ocorrência da infecção por *N. caninum* em bovinos. (BARTELS, WOUUDA e SCHUKKEN, 1999). Estudos na França e na Espanha também encontraram associação entre soropositividade para *N. caninum* em bovinos e a presença de cães nas propriedades (OULD-AMROUCHE, KLEIN e OSDOIT, 1999).

O Nordeste possui a maior população caprina do Brasil, equivalente a 93% do rebanho nacional e o Estado da Bahia é seu maior representante com 41% do rebanho (SIDRA, 2002), possuindo, portanto, quase a metade dos caprinos da região Nordeste. A frequência de 15,10% de caprinos soropositivos por *N. caninum* demonstrada por Uzêda *et al.* (2001) no Estado da Bahia mostra que a neosporose pode influenciar no desenvolvimento da caprinocultura, especialmente por transtornos reprodutivos como abortamento, animais natimortos, retardo no crescimento entre outros efeitos.

Esta monografia trata da revisão de literatura e do estudo epidemiológico transversal em rebanhos de caprinos leiteiros localizados próximos a Salvador e objetiva estabelecer associações entre a frequência de anticorpos IgG *anti-Neospora caninum* e variáveis relacionadas à biologia do parasito e ao manejo sanitário das propriedades que possam estar contribuindo para a sobrevivência e manutenção da infecção nos rebanhos caprinos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Classificação e isolamento do *Neospora caninum*.

No ano de 1984, Bjerkas, Mohn e Presthus realizaram um estudo com cães da raça Boxer que apresentaram sinais neurológicos. Testes sorológicos foram realizados objetivando detectar anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, contudo nenhuma reação positiva foi encontrada.

Dubey *et al.* (1988b) avaliaram tecidos de 23 cães dos Estados Unidos suspeitos de apresentarem toxoplasmose. Após análises histológicas e ultra-estruturais, foi observado que em algumas amostras havia um parasito bastante semelhante ao *T. gondii*, que apresentava diferenças antigênicas e estruturais. Esse novo coccídeo foi então classificado como *Neospora caninum*. Esses pesquisadores conseguiram isolar este protozoário em cultura celular utilizando fragmentos de tecido nervoso de filhotes caninos que apresentavam sinais neurológicos (DUBEY *et al.* 1988a).

Recentemente foi relatado que o *N. caninum* está mais relacionado ao parasito *Hammondia heydorni* do que ao *T. gondii* (MUGRIDGE *et al.* 1999). Algumas características como o hospedeiro definitivo, intermediários, ultraestrutura de oocistos e taquizoítos são similares entre os dois parasitos (McALLISTER *et al.*

1998). Desta forma torna-se fundamental considerar *H. heydorni* no diagnóstico diferencial do *N. caninum*.

No Brasil, o primeiro isolamento do protozoário foi relatado por Gondim *et al.* (2001) a partir da inoculação experimental de amostras de tecido cerebral de um cão da raça Colie, com sete anos de idade que apresentava sinais de incoordenação e paresia dos membros posteriores, em gerbis da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) (Fig. 1). À sorologia, o mesmo apresentou título de IgG de 1:1600 para *N. caninum*.

## 2.2 Distribuição da doença

A infecção por *N. caninum* tem sido relatada em vários países (ANDERSON, ANDRIANARIVO e CONRAD, 2000) destacando-se os Estados Unidos (ANDERSON *et al.* 1991), Canadá (CHI *et al.* 2002), Países Baixos (WOUDA, MOEN e SCHUKKEN, 1998), Itália (OTRANTO *et al.* 2003; ELENI *et al.* 2004), Alemanha (SCHARES *et al.* 2003), Japão (DUBEY e LINDSAY, 1996), Taiwan (OOI *et al.* 2000), Costa Rica (ROMERO *et al.* 2002), Uruguai (KASHIWAZAKI *et al.* 2004) e outros.

No Brasil, há relatos de soroprevalência deste protozoário no Estado da Bahia (GONDIM *et al.* 1999; UZÊDA *et al.* 2001; 2002b), São Paulo (FIGLIUOLO *et al.* 2004), Minas Gerais (MELO *et al.* 2001), Paraná (GUIMARÃES *et al.* 2004) e Rio Grande do Sul (CORBELLINI *et al.* 2000; CORBELLINI *et al.* 2002).

### 2.3 Espécies acometidas

O *N. caninum* já foi descrito em muitas espécies animais como bovinos (GONDIM *et al.* 1999; CORBELLINI *et al.* 2000; CORBELLINI *et al.* 2002), eqüinos (McDOLE e GAY, 2002; CIARAMELLA *et al.* 2004), caprinos (BARR *et al.* 1992; DUBEY, ACLAND e HAMIR, 1992), ovinos (BUXTON, 1998), cervídeos (DUBEY, HOLLIS E ROMAND, 1999; DUBEY, 2003), cães (DUBEY *et al.* 1988b; MACALISTER *et al.* 1998), lobos (VITALIANO *et al.* 2004), búfalos (FUJII *et al.* 2001), antílopes (PETERS *et al.* 2001), além de raposas, coiotes, camelos e felídeos (DUBEY, 2003).

Infecções experimentais foram descritas em camundongos, ratos e gerbis (DUBEY e LINDSAY 1996; GONDIM *et al.* 1999). Recentemente observou-se infecção natural por *N. caninum* em ratos (HUANG *et al.* 2004).

Barr *et al.* (1994) conseguiram infectar experimentalmente primatas fêmeas do gênero Rhesus com *N. caninum* e observar a transmissão vertical do parasito evidenciada por encefalite nos fetos.

Entretanto não há evidências de que o *N. caninum* possa infectar seres humanos, apesar de sua estreita relação com o *T. gondii*, responsável pela toxoplasmose humana (DUBEY, 2003).

A primeira evidência sorológica de infecção por *N. caninum* em humanos no Brasil foi relatada por Magalhães (2002) que avaliou, através das técnicas de IFI (Imunofluorescência Indireta) e Western blot, amostras sorológicas de 80 doadores sadios de banco de sangue, 160 gestantes e 80 pacientes portadores do HIV. Encontrou os seguintes resultados: 3,75; 4,3 e 15% de reações positivas para cada grupo citado. Houve reconhecimento das bandas antigênicas p35 kDa e p43 kDa por todas as amostras positivas segundo a IFI.

#### **2.4 Vias de transmissão**

Há relatos comprovando duas vias de transmissão para infecção por *N. caninum*: transplacentária (vertical) e a pós-natal (horizontal) (ANDERSON, ANDRIANARIVO e CONRAD, 2000).

A via transplacentária era a única conhecida antes do delineamento do ciclo de vida do *N. caninum* (DUBEY e LINDSAY, 1996). Esta via foi induzida experimentalmente em várias espécies animais como cães, ovinos (DUBEY e LINDSAY, 1996) e bovinos (DUBEY *et al.* 1992) e a infecção congênita ocorreu em todas essas espécies.

Há vários estudos que evidenciam a infecção vertical em bovinos. Trees *et al.* (1999) ressaltaram que, nesta espécie, a infecção transplacentária ocorreu em 95% dos casos de neosporose.



McAllister *et al.* (1998) realizaram estudos em quatro cães da raça Beagle, os quais foram alimentados com tecidos de camundongos previamente infectados com *N. caninum*. Três cães eliminaram oocistos que esporularam três dias após a eliminação. Estes oocistos foram inoculados em camundongos, nos quais foi confirmada a presença de *N. caninum* por meio das técnicas de imunistoquímica e PCR (Reação de polimerase em cadeia). Desta forma, esses pesquisadores conseguiram resolver o ciclo biológico do *N. caninum*, encontrando o cão como hospedeiro definitivo do protozoário. Este hospedeiro definitivo, ao eliminar oocistos no ambiente, pode provocar surtos de abortamentos nos rebanhos bovinos e caprinos se estes animais ingerirem alimento contaminado (Fig. 2).

Lindsay, Dubey e Duncan (1999) realizaram infecção experimental em dois cães, que foram alimentados com cistos de *N. caninum* isolados a partir de bovinos infectados. Estes pesquisadores também observaram a eliminação de oocistos pelos cães.

Gondim *et al.* (2004) realizaram um estudo de infecção experimental em quatro coiotes (*Canis latrans*). Estes animais foram alimentados com fragmentos de cérebro, medula, coração, diafragma, músculos e rins de bezerros previamente infectados com *N. caninum*. Cerca de dez dias após a infecção, os coiotes liberaram oocistos de *N. caninum* pelas fezes, confirmando a hipótese de que outros canídeos também funcionam como hospedeiros definitivos deste protozoário.

Trees *et al.* (1999) citaram que a permanência da transmissão vertical no rebanho pode estender a infecção para outras espécies animais. Se os cães se

alimentarem de carcaças de bovinos infectados, estes podem passar a eliminar oocistos contaminando as pastagens e a alimentação dos bovinos (DIJKSTRA *et al.* 2002).

Experimentalmente, já foi observado que o protozoário *N. caninum* possui capacidade infectante se for inoculado por via subcutânea, intramuscular, intraperitoneal ou oral (GONDIM *et al.* 2001).

## 2.5 Características clínicas

Como foi relatado anteriormente, até 1988, a infecção causada pelo *N. caninum* era frequentemente confundida com a provocada pelo *T. gondii*. Ao longo do tempo, estudos puderam confirmar que o *N. caninum* pode ser distinguido antígenicamente e estruturalmente do *T. gondii* (DUBEY *et al.* 1988a; DUBEY e LINDSAY, 1996).

Os cães jovens e congenitamente infectados podem apresentar os seguintes sinais: paresia uni ou bilateral com espasticidade ou flacidez que pode evoluir para uma paresia progressiva. Cães mais velhos podem desenvolver alterações do sistema nervoso central e polimiosite. Além disso, pode-se observar miocardite, pneumonia e dermatite (DUBEY e LINDSAY, 1996; GIRALDI, BRACARENSE e VIDOTTO, 1999).

As fêmeas infectadas podem ainda transmitir verticalmente o parasito e há relatos de morte fetal precoce, mumificação, reabsorção e nascimentos de cães fracos (DUBEY, 1999; GIRALDI, BRACARENSE e VIDOTTO, 1999; PAIXÃO e SANTOS, 2004).

Segundo Dubey e Lindsay (1996), o abortamento é o único sinal clínico observado em vacas infectadas por *N. caninum*. A doença pode atingir fêmeas de qualquer idade e estas podem abortar a partir do terceiro mês de gestação. Anderson, Andrianarivo e Conrad (2000) associaram surtos de abortamento entre o quarto e o sexto mês de gestação à infecção pelo parasito.

Em relação aos sinais comumente observados nos abortos destacam-se: mumificação, autólise, morte uterina e reabsorção. Há também a possibilidade de haver bezerros natimortos e nascidos fracos. Contudo já foi observado o nascimento de animais clinicamente normais, mas infectados cronicamente (BARR *et al.* 1993; DUBEY *et al.* 1996a; TREES *et al.* 1999; ANDERSON, ANDRIANARIVO e CONRAD, 2000).

Dubey (2003) descreve que em bezerros clinicamente doentes, os sinais neurológicos podem revelar ataxia, diminuição do reflexo patelar, perda da propriocepção, exoftalmia, assimetria ocular e hidrocefalia.

## 2.6 Métodos de diagnóstico

Semelhante à infecção por *T. gondii*, a infecção por *N. caninum* leva a um aumento da resposta humoral, que pode ser demonstrada por variados testes. Desta forma, a detecção de anticorpos num animal indica que houve exposição ao parasito (BJORKMAN e UGGLA, 1999).

Os testes sorológicos constituem uma ferramenta fundamental para o diagnóstico (DUBEY e LINDSAY, 1996) da neosporose. O primeiro teste sorológico utilizado para demonstrar anticorpos anti-*N. caninum* em cães foi a Imunofluorescência Indireta (IFI) (DUBEY *et al.* 1988a). Neste teste, taquizoítos de *N. caninum* são fixados em lâminas, que são incubadas com um soro teste e posteriormente com uma anti-imunoglobulina espécie-específica conjugada à fluoresceína (BJORKMAN e UGGLA 1999). O resultado é dado pela observação microscópica da fluorescência periférica total dos parasitos.

Sabe-se que o *N. caninum* compartilha alguns antígenos com o *T.gondii*, e alguns autores relatam a possibilidade de reações cruzadas na IFI (NISHIKAWA *et al.* 2002). Contudo estudos demonstraram que a IFI apresenta especificidade satisfatória (DUBEY e LINDSAY, 1996).

Dubey *et al.* (1996a) realizaram um levantamento da resposta sorológica de bovinos, ovinos, caprinos e suínos infectados experimentalmente com *N. caninum*, *T. gondii* e *Sarcocystis sp.* com o objetivo de verificar a existência de reações

cruzadas entre esses parasitos e comprovar a eficiência da IFI no diagnóstico da neosporose. Neste estudo não foram observadas reações cruzadas através deste teste.

Segundo Bjorkman e Uggla (1999) a IFI é utilizada como teste de referência para detecção de anticorpos anti-*N. caninum*.

Anderson, Andrianarivo e Conrad (2000) relataram que laboratórios costumam utilizar a técnica de IFI como padrão ouro na validação de testes sorológicos. Contudo estes autores reforçam que um cuidado especial deve ser tomado na análise de testes sorológicos, principalmente no diagnóstico de aborto. As técnicas sorológicas são importantes na avaliação do risco de exposição do rebanho à infecção por *N. caninum* e não na determinação da causa de aborto de um animal individualmente.

Vários tipos de ensaios de imunoadsorção enzimática (ELISA) citados por Bjorkman e Uggla (1999) foram desenvolvidos para determinar anticorpos anti-*N. caninum*.

Anderson, Andrianarivo e Conrad (2000) citaram que a técnica de imunistoquímica, que utiliza anticorpos anti-*N. caninum*, é um método efetivo de identificação dos cistos e taquizoitos do protozoário em amostras de tecido, principalmente o nervoso.

As técnicas de biologia molecular, como a PCR, estão sendo amplamente utilizadas nas pesquisas envolvendo o parasito *N. caninum* (LIDDELL, JENKINS e DUBEY, 1999; SAGER *et al.* 2001; SÖNDGEN *et al.* 2001; PEREIRA-BUENO *et al.* 2003; DUBEY, 2003).

## **2.7 Neosporose em caprinos**

Nos últimos anos a caprinocultura obteve grande crescimento no cenário nacional. O efetivo de caprinos no Brasil corresponde a 9 428 622 cabeças, sendo que apenas a região Nordeste detém cerca de 93% do total de animais (SIDRA, 2002). A criação de caprinos no Estado da Bahia representa 38% do efetivo do rebanho nacional, desta forma a caprinocultura é uma atividade de elevada importância econômica.

Segundo Oliveira (2004), uma grande parte da produção de caprinos no Nordeste é realizada em pequenas propriedades rurais, onde as condições de manejo não são adequadas, permitindo o desenvolvimento de muitas enfermidades.

Segundo Gouveia (2004), as doenças parasitárias constituem sério entrave no desenvolvimento da caprinocultura, por constituírem causas de perdas consideráveis em animais.

Num estudo desenvolvido por Gouveia *et al.* (2001) *apud* Gouveia (2004), para determinar as enfermidades e sinais clínicos observados em rebanhos de caprinos no Ceará, 76% das propriedades relataram o aborto como sinal mais freqüente.

Dentre as principais doenças que induzem abortamentos em caprinos, encontra-se a neosporose, causada pelo protozoário intracelular obrigatório *N. caninum* que é responsável por sérios prejuízos econômicos nos rebanhos (DUBEY e LINDSAY, 1996).

No ano de 1992, Dubey, Acland e Hamir (1992) necropsiaram um feto abortado de caprino oriundo de uma propriedade que havia tido problemas de abortos, natimortos e cabritos que nasciam fracos e morriam logo após duas semanas de vida, contudo as cabras não apresentavam nenhum sinal clínico da doença. A partir da análise histológica, lesões foram encontradas na placenta e no cérebro fetal e cistos de *N. caninum* foram identificados por todo o cérebro do animal.

Neste mesmo ano, Barr *et al.* (1992) examinaram dois fetos abortados de caprinos. Não identificaram anticorpos anti-*Brucella ovis*, vírus da Língua Azul, *Leptospira spp.* e *T. gondii*. Na imunistoquímica, houve reação positiva para *N. caninum*.

Lindsay *et al.* (1995) realizaram infecção experimental com taquizoítos de *N. caninum* em sete caprinos fêmeas em período de gestação. Duas cabras que foram

inoculadas no início da gestação apresentaram fetos que morreram, foram abortados ou reabsorvidos. Foram encontrados taquizoítos e lesões na análise destes fetos. Não foi observado aborto em cabras que foram inoculadas no meio da gestação, contudo uma delas gerou um feto natimorto que foi congenitamente infectado por *N. caninum*. As cabras que sofreram inoculação no fim da gestação não abortaram, entretanto, os cabritos vieram a óbito logo após o nascimento. Lesões ou parasitos não foram encontrados nestes animais, portanto a causa da morte pode não ser atribuída a neosporose.

Um feto abortado da raça Saanen foi analisado por Dubey *et al.* (1996b). Este feto foi necropsiado e lesões características, assim como taquizoítos e cistos de *N. caninum* foram encontrados nos tecidos. Nove meses depois da submissão do feto, amostras de 81 caprinos da mesma propriedade foram testados utilizando IFI. Seis animais apresentaram anticorpos IgG anti-*N. caninum* com títulos que variaram de 1:100 a 1:800. Estes animais foram avaliados também quanto à presença de anticorpos anti-*T. gondii* e apenas um animal reagiu positivamente com título de 1:25.

Dubey *et al.* (1996a) relataram um estudo onde foi realizada infecção experimental de taquizoítos de *N. caninum* em caprinos e foi observado aumento do título de anticorpos por meio da técnica de IFI a partir de duas semanas após a inoculação. Os títulos variaram de < 1:50 a 1:3200.

Osawa *et al.* (1998) padronizaram um ELISA para detectar anticorpos específicos para *N. caninum* em amostras séricas de caprinos infectados



experimentalmente. Realizaram infecção experimental de algumas cabras com *T. gondii* e avaliaram sorologicamente estes animais com o mesmo ELISA e não encontraram reações positivas, evidenciando a inexistência de reações cruzadas.

No ano de 1998, England *et al.* realizaram um estudo epidemiológico para determinar as possíveis causas de perdas fetais em rebanhos caprinos. Foram testadas 200 amostras sorológicas pela técnica de IFI e nenhuma foi considerada positiva.

Ooi *et al.* (2000) realizaram teste sorológico por meio da técnica de IFI em 24 caprinos, dos quais oito apresentaram histórico de aborto e natimortos e não encontraram reação positiva em nenhum dos animais.

No ano de 2001, Corbellini, Colodel e Driemeier identificaram um caso de neosporose congênita num caprino da raça Saanen, oriundo do Estado do Rio Grande do Sul. Logo ao nascer este cabrito apresentava incapacidade de mamar, dificuldade de levantar-se, ataxia e opistótono. Os sinais neurológicos ficaram mais evidenciados após três dias de nascimento, quando foi sacrificado. À análise histológica foram encontradas lesões características para *N. caninum*, contudo taquizoítos não foram identificados.

Eleni *et al.* (2004) detectaram num feto abortado de caprino da Itália material genético de *N. caninum* através da técnica de PCR.

Figliuolo *et al.* (2004) demonstraram que de 394 caprinos oriundos de fazendas localizadas no Estado de São Paulo, 25 animais (6,4%) apresentaram reação positiva no teste IFI. Animais sororreagentes foram encontrados em 42% das propriedades selecionadas para o estudo. Estes pesquisadores observaram títulos de anticorpos anti-*N. caninum* variando de 1:50 a 1:12 800, sendo que o título de 1:800 foi o mais encontrado.

Em estudo desenvolvido por Naguleswaran *et al.* (2004) na Sri Lanka, 486 amostras séricas de caprinos sem histórico de aborto foram examinadas por meio das técnicas de ELISA, padronizada por estes pesquisadores para sorodiagnóstico de neosporose caprina, Western blot e IFI. Apenas três amostras (0,7%) reagiram positivamente.

Uzêda *et al.* (2001) realizaram um levantamento sorológico em rebanhos de caprinos leiteiros do Estado da Bahia. De um total de 384 amostras, 58 (15%) reagiram positivamente por meio da técnica de IFI.

Das amostras utilizadas por Uzêda *et al.* (2001), 373 foram avaliadas quanto a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e 61 (16%) reagiram positivamente (UZÊDA, ALMEIDA e SOUZA, 2002b). Soropositividade para os dois parasitos foi evidenciada em apenas 17 animais o que demonstrou uma ampla distribuição dos coccídeos nos rebanhos analisados (UZÊDA *et al.* 2002a).

## 2.8 Fatores que interferem na difusão e propagação da doença.

Com a observação de que os postulados de Koch não se adequavam às explicações causais da maioria das doenças infecciosas atuais, ou seja, que o acontecimento mórbido não estava apenas relacionado à presença do agente etiológico e sim que vários fatores contribuíam para a sua ocorrência, incorporou-se a concepção multi-causal na determinação das doenças. (VIGILÂNCIA..., 2004)

Assim a análise multi-causal identificou diferentes níveis de probabilidade de adoecer. A probabilidade de ocorrência de uma doença chamou-se risco. (VIGILÂNCIA..., 2004)

Segundo Rouquayrol e Almeida (1999), fator de risco é definido como o elemento associado ao risco (ou a probabilidade de desenvolver a doença).

Para haver o desenvolvimento de uma doença, a simples presença do patógeno pode não ser suficiente e sim um conjunto de fatores diretamente envolvidos no processo (VIGILÂNCIA..., 2004).

A maioria dos estudos epidemiológicos envolvendo a neosporose é realizada na espécie bovina, desta forma é de fundamental importância entender a doença nesta espécie e utilizar esses trabalhos como modelo para entender a neosporose caprina.

Estudos epidemiológicos vêm sendo realizados para determinar as possíveis variáveis que estão associadas ao aumento da prevalência da neosporose em bovinos (HEMPHILL e GOTTSTEIN 2000).

Otranto *et al.* (2003) ressaltaram que a avaliação dos fatores de risco para a ocorrência da neosporose é bastante útil para que medidas de prevenção sejam tomadas a fim de evitar a infecção dos animais e conseqüentemente, minimizar as perdas econômicas que estão relacionadas com a doença.

Sanderson, Gay e Baszler (2000) realizaram um levantamento da prevalência e dos fatores de risco presentes em 55 rebanhos de bovinos de corte oriundos de cinco estados norte-americanos. Do total de 2585 animais, 607 reagiram positivamente num teste de ELISA de inibição competitiva para *N. caninum* determinando 24% de positividade no rebanho.

Barling *et al.* (2001) realizaram um estudo em 760 bezerros de corte nos EUA, 99 (13%) reagiram positivamente segundo o teste de aglutinação indireta. Estes pesquisadores também tentaram determinar os fatores de manejo que estavam associados a esta prevalência.

Um estudo realizado por Otranto *et al.* (2003) em 111 rebanhos (1140 animais) de bovinos de corte e de leite da Itália demonstrou soropositividade para *N. caninum* em 49 rebanhos (44,1%). Neste trabalho, os autores avaliaram as possíveis variáveis relacionadas à infecção dos bovinos por *N. caninum*.

No Brasil, Melo *et al.* (2001) determinaram as freqüências de infecção por *N. caninum* em rebanhos de bovinos produtores de leite do tipo A/B e C do Estado de Minas Gerais e determinaram os possíveis fatores (tipo de produção de leite, faixa etária, tipo de alimentação dos rebanhos e forma de reposição dos animais) associados a esta infecção. No total 18 rebanhos foram avaliados e 18,66% (109/584) das amostras apresentaram reações positivas para *N. caninum*.

Guimarães *et al.* (2004) relataram 14,3% (89/623) de prevalência de anticorpos IgG anti-*N. caninum* em 23 propriedades de bovinos leiteiros do Estado do Paraná. Neste estudo, 134 cães também foram testados para *N. caninum* e foi encontrada prevalência de 21,6%.

Dentre alguns fatores de risco citados por diversos autores destacam-se:

### **2.8.1 Presença de cães**

Antes do ciclo biológico deste protozoário ser elucidado, já havia estudos epidemiológicos para determinar o papel do cão na infecção dos animais por *N. caninum*. Sabe-se que o cão representa um dos hospedeiros definitivos deste protozoário (McALLISTER *et al.* 1998) e que a presença desta espécie constitui um importante fator de risco para a infecção por *N. caninum*.

A sugestão de que a presença de cães nos rebanhos bovinos desempenha um importante papel na transmissão da neosporose foi, pela primeira vez, reportada em estudos que encontraram associação entre a soroprevalência e a presença de cães (PARÉ *et al.* 1998; OULD-AMROUCHE, KLEIN e OSDOIT, 1999; ANDERSON, ANDRIANARIVO e CONRAD, 2000).

Um experimento realizado por Gondim, Gao e McAllister (2002) demonstrou que um cão, após consumir tecidos de bezerros infectados experimentalmente com *N. caninum*, pode eliminar cerca de 160.000 oocistos em média, quantidade suficiente para infectar mais que 500 bovinos.

No estudo realizado por Bartels, Wouda e Schukken (1999) foi encontrada uma associação entre a presença de cães (OR=5,1) e soroprevalência para *N. caninum*. De um total de 16 propriedades controles, oito, que não possuíam cães, não obtiveram soroprevalência para *N. caninum*. As oito restantes obtiveram positivities que variaram de 4,8 a 37,5%. Foi observada, uma fraca, mas significativa correlação entre o número de cães presentes nas fazendas controles e soroprevalência para *N. caninum*.

Otranto *et al.* (2003) determinaram em seu estudo que propriedades que possuíam dois ou mais cães apresentaram prevalências mais altas que aquelas que possuíam no máximo um cão. A análise estatística não revelou diferença entre propriedades que possuíam um cão daquelas que não possuíam nenhum cão. Este fato foi explicado pela observação de que, nas propriedades que havia apenas um

cão, este permanecia preso por mais tempo que nas propriedades que possuíam mais animais, isto diminuía o acesso dos cães à alimentação dos bovinos.

Wouda, Moen e Schukken (1998) e Guimarães *et al.* (2004) detectaram uma associação positiva entre as soroprevalências de bovinos e cães o que indica uma relação entre as infecções por *N. caninum* em ambas as espécies.

Barling *et al.* (2001), demonstraram que o uso de cães de trabalho (OR=0,54) tinha uma fraca associação com os níveis de positividade. Os autores sugeriram que a presença deste cão de trabalho pode prevenir a aproximação de outros canídeos silvestres.

Dijkstra *et al.* (2002) desenvolveram um estudo para obter mais informações a respeito das rotas naturais de transmissão pós-natal do *N. caninum* entre cães e bovinos. Neste estudo, 12 propriedades com evidências de infecção pós-natal por *N. caninum* foram comparadas com 21 propriedades, onde não havia evidência da infecção. O consumo de placenta, descargas uterinas e leite (ou colostro) oriundos de vacas, pelos cães, foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) em propriedades com evidência de infecção pós-natal.

Neste trabalho, observou-se que os cães defecavam nos locais destinados a alimentação dos bovinos, no local de estocagem de silagem de gramíneas e de milho em 92, 75, e 50% das propriedades com evidência de infecção pós-natal contrastando com 24, 19 e 10% das propriedades controle, respectivamente. Este estudo comprovou que os cães são provavelmente infectados por fluidos fetais ou

restos de placenta de bovinos infectados e podem contaminar o alimento destinado a esta espécie com oocistos. Desta forma, o grau de liberdade que os cães têm de alimentarem-se de restos de placenta e descargas uterinas, assim como terem acesso aos locais de alimentação dos bovinos podem determinar o grau de infecção do rebanho.

A primeira indicação de que cães pertencentes à propriedades vizinhas representam um fator de risco foi demonstrada por Schares *et al.* (2003). Estes pesquisadores ressaltaram que um rebanho de bovinos pode se tornar mais exposto à infecção em áreas cuja densidade de cães é maior.

A presença de cães domésticos e cães selvagens foi notada em 74% e 47% de 19 propriedades de caprinos selecionadas para estudo por Figliuolo *et al.* (2004). Porém a análise estatística deste estudo não demonstrou associação entre a presença de cães domésticos ( $P=0,341$ ) e selvagens ( $P=0,342$ ).

### **2.8.2 Presença de outros animais**

A presença de outros animais, como aves domésticas ( $OR=10,4$ ), também foi considerada fator de risco associado aos abortamentos causados pelo *N. caninum* em bovinos (BARTELS, WOUUDA e SCHUKKEN, 1999). Especula-se que essas aves sejam vetores mecânicos dos oocistos deste protozoário, facilitando a infecção dos hospedeiros intermediário e definitivo.



McGuire *et al.* (1999) realizaram infecção experimental com taquizoítos de *N. caninum* em pombos (*Columbia livia*) e determinaram que essa espécie pode servir como hospedeiro intermediário do *N. caninum*.

Ould-Amrouche, Klein e Osdoit (1999) ressaltaram que a presença de patos e coelhos está associada à infecção por *N. caninum* em bovinos.

Otranto *et al.* (2003) observaram também uma interação entre o número de cães (OR=5,7), presença de aves domésticas (OR=1,9) e aumento da soroprevalência nos bovinos.

### **2.8.3 Presença de canídeos selvagens**

Um estudo conduzido no Texas sugere que a abundância de canídeos selvagens, como raposas cinzentas (*Urocyon cinereoargenteus*) e coiotes (*Canis latrans*), foi associada com a soroprevalência em bovinos (BARLING *et al.* 2000).

Cañón-Franco *et al.* (2004) investigaram a presença de anticorpos IgG anti-*N. caninum* em canídeos selvagens do Brasil e encontraram as seguintes positivities: 42% (5/12) para *Lycalopez gymnocercus*, 27% (4/15) para *Cedocyon thous* e nenhuma reação para *Dusicyon vetulus*. Este estudo sugere a exposição destes animais ao protozoário e que pesquisas mais aprofundadas são necessárias para verificar o papel destes animais no ciclo biológico do *N. caninum*.

#### 2.8.4 Fatores individuais

Romero *et al.* (2002) realizaram um estudo para determinar os fatores que estavam associados com o estado sorológico para *N. caninum* em rebanhos da Costa Rica e encontraram correlações positivas entre raça (OR=1,9), idade (OR=1,7), número de parições (OR=1) e envio de fetos abortados para diagnóstico laboratorial (OR=1,9).

Otranto *et al.* (2003) relataram maiores prevalências para *N. caninum* em vacas que estavam no segundo (13,6%) e terceiro (12,8%) quartos de gestação. Estes fatores interagiram significativamente com o manejo de pastagem, o que demonstra uma possível associação entre transmissão vertical e horizontal nos rebanhos estudados.

No estudo de Guimarães *et al.* (2004), a soroprevalência encontrada para *N. caninum*, foi maior entre bovinos mais velhos (> 24 meses, OR=3,1), mostrando que possivelmente a transmissão horizontal seja a via de infecção mais importante nestas propriedades.

Idade e tempo desde a última parição não foram significativamente correlacionados com a soroprevalência para *N. caninum* (OTRANTO *et al.* 2003).

A faixa etária da vaca, número de lactações e história de aborto, geralmente não influencia no grau de infecção congênita, mas há relatos indicando que quando

há persistência da infecção em rebanhos bovinos, a transmissão vertical é mais eficiente em animais mais jovens que adultos (DUBEY, 2003).

Não houve relação estatística entre positividade do teste e idade no estudo de Sanderson, Gay e Baszler (2000).

Melo *et al.* (2001) não observaram diferença estatística entre as faixas etárias estudadas e soropositividades dos bovinos.

Sanderson, Gay e Baszler (2000) não encontraram associação entre tempo de gestação dos bovinos e nível sorológico dos mesmos.

Nos estudos conduzidos por Jensen *et al.* (1999) e Ould-Amrouche, Klein e Osdoit (1999) não foi encontrada correlação entre raça dos bovinos e presença de aborto associado ao *N. caninum*.

#### **2.8.5 Fatores de manejo do rebanho**

Otranto *et al.* (2003) relataram que ambos os sistemas, intensivo e extensivo, funcionaram como fatores de risco. Este fato pode ser explicado pela possibilidade de exposição dos bovinos a oocistos de *N. caninum*. No sistema intensivo, a alta densidade populacional, aliada às condições de higiene desfavoráveis, manejo e acesso dos cães às instalações dos animais podem favorecer a infecção horizontal.

No caso do sistema extensivo, as grandes áreas que os bovinos têm acesso também poderiam estar contaminadas com oocistos proveniente das fezes de cães infectados ou até mesmo pastagem contaminada com restos de abortos oriundos de vacas infectadas.

No estudo de Romero *et al.* (2002) não foi observada associação entre soroprevalência e fatores ambientais e de manejo do rebanho.

Sanderson, Gay e Baszler (2000) verificaram associação entre a densidade animal e soroprevalência nos rebanhos bovinos estudados, sugerindo o importante papel dos fatores de manejo e ambientais, na transmissão horizontal.

Bartels, Wouda e Schukken (1999) ressaltaram que variáveis como "contato com bovinos de outros rebanhos" e "uso de pastagens comuns" (OR= 8,8) também foram consideradas como fatores de risco.

Alta densidade animal (OR=2,3;  $P < 0,01$ ) apresentou associação positiva com a presença de anticorpos anti- *N. caninum* em bezerros (BARLING *et al.* 2001).

O uso de currais de parição para vacas doentes e alta prevalência de retenção de placenta (OR=34,4) foram consideradas no estudo de Bartels, Wouda e Schukken (1999), variáveis de risco, que foram explicadas pelos autores pela possibilidade da placenta e efusões uterinas serem fontes de infecção de taquizoítos de *N. caninum* em função da concentração de material infeccioso no local.

Segundo Dubey e Lindsay (1996), tanto bovinos destinados à produção de carne quanto os de leite podem ser acometidos pela neosporose. Anderson, Andrianarivo e Conrad (2000) citaram que há mais estudos atribuindo números consideráveis de abortamentos em bovinos leiteiros.

Melo *et al.* (2001) compararam a soropositividade para *N. caninum* em bovinos produtores de leite tipo A/B e C. Constataram uma forte diferença estatística entre os tipos produtivos, sendo que foram observadas maiores soropositividades em produtores do tipo A/B. Os autores sugerem que a grande pressão produtiva e estresse exercidos sobre os animais tipo A/B podem ter possibilitado uma imunodepressão e conseqüente recrudescência da infecção em função da reativação de formas latentes do parasito localizadas em cistos teciduais de animais positivos.

Aguiar *et al.* (2004) desenvolveram um levantamento sorológico em 2109 vacas oriundas de 86 propriedades do Estado de Roraima e verificaram a existência de fatores de risco associados ao aumento da soroprevalência. Os autores relataram 220 (10%) vacas reagentes e apenas as variáveis, tamanho da fazenda (> que 110 hectares,  $P=0,0049$ ) e número maior que 25 vacas no rebanho ( $P=0,0003$ ) obtiveram diferença significativa.

### 2.8.6 Alimentação dos animais

A alimentação com silagem de milho contaminada com fungos foi considerada como fator de risco (OR=6,6) em função da possível produção de micotoxinas. A ingestão destas toxinas pode levar a imunodepressão dos animais, o que favorece a reativação do parasito que permanece em sua forma latente de bradizoíto dentro dos cistos teciduais dos animais infectados (BARTELS, WOUUDA e SCHUKKEN, 1999).

Melo *et al.* (2001) relataram que os bovinos produtores de leite tipo A/B e C de seu estudo eram alimentados em algumas épocas do ano com silagem, principalmente de milho. Os autores sugerem que a possibilidade de contaminação desta silagem por fungos poderia ter causado uma imunodepressão nos animais produtores de leite A/B, justificando a alta prevalência neste tipo leiteiro.

No estudo realizado por Bartels, Wouda e Schukken (2001), o uso de fardo de feno na alimentação dos bovinos (OR=3) representou um importante fator de risco relacionado à ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum*. Os autores sugerem que o aumento da densidade animal próximo aos cochos (comedouros) pode proporcionar um ambiente adequado para a infecção se as condições de higiene não forem adequadas e se há possibilidade de acesso de cães a esses locais. Os autores citaram ainda que em uma dessas propriedades, os bovinos costumavam parir próximo ao local de armazenamento de feno, sendo encontrado resto de aborto e placentas próximos a essas áreas.

Nas propriedades onde Guimarães *et al.* (2004) realizaram uma avaliação de fatores que aumentam a possibilidade de infecção de bovinos por *N. caninum*, a alimentação com silagem (OR=0,6) e concentrado produzido na própria fazenda (OR=0,47), constituíram um fator protetor e este achado pode estar relacionado com o tipo de estocagem e manejo destes alimentos nestas propriedades, os quais não permitiam o acesso de cães.

#### **2.8.8 Renovação do rebanho**

Barling *et al.* (2001) determinaram em seu estudo que propriedades que realizaram a renovação do rebanho com animais do próprio estabelecimento apresentaram risco 17 vezes maior de ocorrência de animais sororreagentes, sugerindo a transmissão vertical.

Otranto *et al.* (2003) relataram que propriedades que costumavam renovar seus rebanhos com animais da própria fazenda, apresentaram maiores soroprevalências (OR=18,2) que propriedades que adquiriam bovinos de outras regiões para substituição de animais descartados. Esta observação demonstra o importante papel da infecção vertical na manutenção da doença nos rebanhos que está relacionada com a procedência das matrizes.

Sanderson, Gay e Baszler (2000) não encontraram associação entre a origem dos bovinos e nível sorológico dos bovinos.