

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

Pesquisa de *Neospora caninum* em fetos bovinos abortados utilizando análises histológicas (HE), imunistoquímica (IHQ) e *nested* PCR.

ALINE DINIZ CABRAL

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Animal
Orientador(a): Dra. Claudia Del Fava

São Paulo

2008

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Núcleo de Informação e Documentação - Biblioteca

Instituto Biológico

Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo

Cabral, Aline Diniz

Pesquisa de *Neospora caninum* em fetos bovinos abortados utilizando análises histológicas (HE), imunoistoquímica (IHQ) e *nested* PCR / Aline Diniz Cabral. –São Paulo, 2009.

Dissertação (Mestrado) Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Sanidade Animal.

Linha de pesquisa: Patologia Animal

Orientadora: Cláudia Del Fava

Versão do título para o inglês: Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histological analysis (HE), immunohistochemistry (IHC) and nested PCR.

1. *Neospora caninum* 2. Fetos bovinos 3. Aborto 4. Imunoistoquímica 5. *Nested* PCR I. Del Fava, Cláudia II. Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação III. Título



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
Pós-Graduação
Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo - SP
pg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do candidato: Aline Diniz Cabral

Título: Pesquisa de Neospora caninum em fetos bovinos abortados utilizando análises histológicas (HE), imunohistoquímica (IHQ) e *nested* PCR.

Orientador(a): Dra. Claudia Del Fava

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Animal

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

Prof. (a) Dr.(a):

Instituição:

Assinatura:

Prof. (a) Dr.(a):

Instituição:

Assinatura:

Prof. (a) Dr.(a):

Instituição:

Dedico este trabalho a Deus que me sustentou, ao meu esposo Ronaldo pela força e companheirismo e aos meus pais David e Dagmar que sempre me apoiaram e incentivaram.

Agradecimentos

A Deus pela fidelidade e pelo cuidado.

Ao meu esposo Ronaldo pela amizade, paciência, amor, compreensão e incentivo.

À minha mãe que é o meu exemplo de vida e ao meu pai pelo imenso carinho, preocupação e cuidado.

À Dra. Claudia Del Fava pela orientação, estímulo, carinho, paciência e confiança. Foi quem me acolheu e ensinou a crescer cientificamente. Agradeço à disponibilidade e amizade conferida durante esses anos de convivência.

Aos meus irmãos, cunhada e sobrinhas pelo apoio.

À minha família (tios, avós e primos) por torcer pela minha vitória sempre.

Aos colegas de pós-graduação pela paciência, incentivo, compreensão e amizade.

À Dra. Eliana Roxo, Dra. Josete, Dra. Vera Cecília, Dra. Lucia Baldassi e Dr. Portugal por sempre instigarem o meu crescimento científico, pelos oportunos e ricos conselhos, pelos preciosos ensinamentos e por acreditarem e torcerem por mim.

Aos funcionários, técnicos, pesquisadores e amigos do Laboratório de Vírus de Bovídeos que me ajudaram, apoiaram e me incentivaram durante a realização do trabalho experimental, em especial a Nara, Clarice, Líria e Dra. Edviges Maristela Pituco.

À equipe do Laboratório de Anatomia Patológica: Dra. Claudia, Marianna, Luis, Michele e Jeovânia pelo companheirismo, amizade, incentivo, ajuda, compreensão, risadas e choros.

Aos meus amigos do coração (Mari, Mi, Je, Si, Cleris, Cris e Luis) que sempre estiveram ao meu lado me ouvindo e ajudando sempre.

À Dra. Sara e Ana do ICB/USP por ceder o laboratório e nos treinar na técnica de IHQ.

Ao Dr. Luis Pita Gondim (UFBA) que gentilmente nos cedeu cortes de cérebro de cão positivos para *Neospora caninum*.

Ao Dr. Milton McAllister que gentilmente nos cedeu o anticorpo primário policlonal anti-*N. caninum* e o bloco de parafina usado para controle da reação de IHQ.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto (processo n. 06/55700-3) e pela concessão da bolsa de capacitação técnica nível III (processo n. 06/55701-0).

A todos que torceram pela minha vitória.

*“Esperei com paciência no Senhor, e Ele se
inclinou para mim, e ouviu o meu
clamor.”(Salmos 40:1)*

“E desejamos que cada um de vós mostre o mesmo zelo até o fim, para completa certeza da esperança; para que não vos torneis indolentes, mas sejais imitadores dos que pela fé e paciência herdaram as promessas.”(Hebreus 6:11-12)

RESUMO

CABRAL, A. D. PESQUISA DE *NEOSPORA CANINUM* EM FETOS BOVINOS ABORTADOS UTILIZANDO ANÁLISES HISTOLÓGICAS (HE), IMUNOISTOQUÍMICA (IHQ) E *NESTED* PCR. 2008. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

Neospora caninum é um protozoário causador de abortamento e natimortalidade em rebanhos bovinos, gerando prejuízos econômicos devido às perdas diretas da concepção e à interferência na fertilidade. O objetivo deste trabalho foi pesquisar a frequência de ocorrência do *N. caninum* em fetos bovinos abortados mediante o emprego do exame histopatológico (hematoxilina-eosina), imunistoquímica (IHQ) e *nested* PCR, utilizando *primers* direcionados à região do gene Nc5 do DNA genômico (PLUS) e do DNA ribossomal ITS1 (JB). Foi avaliada uma amostragem de conveniência, composta por 105 casos de abortamento bovino provenientes de diferentes rebanhos de 13 Estados Brasileiros, que foram encaminhados ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico para diagnóstico diferencial de causas infecciosas de abortamento, no período de janeiro de 2006 à maio de 2008. Do total de amostras fetais 71,4% (75/105) apresentaram lesões histológicas sugestivas de abortamento infeccioso, caracterizadas predominantemente por infiltrado inflamatório mononuclear no sistema nervoso central (SNC), coração, pulmão, fígado, rim e placenta. No SNC de fetos positivos pela IHQ ou *nested* PCR a principal lesão encontrada foi necrose multifocal com infiltrado mononuclear. A IHQ detectou 8,57% (9/105) de positividade no total de amostras, sendo observada maior positividade no SNC, placenta e coração. A *nested* PCR JB detectou 6,66% (7/105) casos positivos, enquanto que a *nested* PCR PLUS detectou maior índice de positividade (20,95%) (22/105) e as maiores taxas de infecção foram detectadas no SNC, placenta e *pool* de fígado/coração. Houve baixo grau de concordância entre as três técnicas pelo índice *kappa*. A taxa de positividade para qualquer uma das técnicas (IHQ, *nested* PCR PLUS e *nested* PCR JB) foi de 24,26% (26/105), devendo ser consideradas conjuntamente pelo fato de possuírem características distintas e serem, portanto, complementares. Nos materiais em que foi informada a idade, apesar de não haver correlação estatística entre abortamento e faixa etária (Teste Exato de Fisher $\alpha=5\%$), observou-se que houve uma maior frequência de ocorrência no terço médio da gestação (26,92%). A maioria dos casos de abortamento foi originária do Estado de São Paulo – 62,85% (66/105), que obteve o maior índice de

positividade – 12,38% (13/105), tendo sido encontradas amostras positivas em Alagoas 0,95% (1/105), Goiás 3,81% (4/105), Minas Gerais 2,86% (3/105), Mato Grosso do Sul 1,90% (2/105), Paraná 0,95% (1/105) e Rio de Janeiro 1,90% (2/105), demonstrando a difusão do agente nos rebanhos Brasileiros. Não foram detectados casos positivos nos Estados da Bahia, Ceará, Mato Grosso, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Rondônia. Conclui-se que a *nested* PCR é um teste útil no diagnóstico da infecção por *N. caninum*, podendo ser utilizada nos fetos que não apresentarem condições favoráveis para a análise histológica (autólise, mumificação e/ou congelamento), sendo importante a associação das técnicas como a *nested* PCR e IHQ ao histopatológico, por serem complementares.

Palavras-chave: *Neospora caninum*, aborto, imunoistoquímica, *nested* PCR, bovino.

ABSTRACT

CABRAL, A. D. DIAGNOSIS OF *NEOSPORA CANINUM* IN BOVINE FETUSES BY HISTOLOGICAL ANALYSIS (HE), IMMUNOHISTOCHEMISTRY (IHC) AND NESTED PCR. 2008. Dissertation (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

Neospora caninum is a protozoan that causes abortion and stillbirth in cattle, and leads to economic losses due to interference in conception and infertility. The objective of this study was to investigate the frequency of occurrence of *N. caninum* in aborted bovine fetuses by histological examination (hematoxylin-eosin staining – HE), immunohistochemistry (IHC) and nested PCR, using primers targeted to the region of Nc5 gene (PLUS) and the ribosomal DNA ITS1 (JB). It was assessed a convenience sampling of 105 cases of bovine abortion from different herds of 13 Brazilian States, which were referred to the Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico for differential diagnosis of infectious causes of abortion in the period of January 2006 to May 2008. A rate of 71.4% (75/105) fetal samples showed histological lesions suggestive of infectious abortion, characterized predominantly by mononuclear inflammatory infiltrate in the central nervous system (CNS), heart, lung, liver, kidney and placenta. In the CNS of fetuses positive by IHC or nested PCR, the primary lesion was multifocal necrosis with mononuclear infiltrate. The IHC detected 8.57% (9/105) of positive samples, mainly observed in the CNS, placenta and heart. The nested PCR JB detected 6.66% (7/105) positive cases, while the nested PCR PLUS detected the highest positivity rate (20.95%) (22/105) mainly in the CNS, placenta and in the pool liver/heart. There was little agreement among the techniques by the Kappa statistics. The positivity rate for anyone of the techniques (IHC, nested PCR and nested PCR PLUS JB) was 24.26% (26/105) and have to be considered together because they possess distinct characteristics and are therefore complementary. Although there was no statistical correlation between abortion and age (Fisher's exact test $\alpha = 5\%$), it was observed that there was a greater frequency of abortion in the middle third of pregnancy (26.92 %). Most cases of abortion were from the State of São Paulo - 62.85% (66/105), where occurred the highest rate of positivity - 12.38% (13/105), and positive samples were also found in Alagoas 0.95% (1/105), Goiás 3.81% (4/105), Minas Gerais 2.86% (3/105), Mato Grosso do Sul 1.90% (2/105), Paraná 0.95% (1/105) and Rio de Janeiro 1.90% (2/105), showing the spread of the agent in Brazilian herds. No positive cases were detected in the states of Bahia, Ceará, Mato Grosso, Pernambuco, Rio Grande do Norte and Rondônia. The nested PCR is a useful tool in the diagnosis of infection by *N. caninum*, and it can be used on samples that do not show

favorable conditions for histological analysis (autolysis, mummification and/or freezing). It is important to associate techniques such as nested PCR and IHC to histopathology.

Key words: *Neospora caninum*, abortion, immunohistochemistry, nested PCR, bovine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Feto bovino abortado. Coração (A e B). Em A observa-se epicardite não-supurativa (HE, obj. 40). Em B observa-se miocardite não-supurativa focal (HE, obj 40)
- Figura 2 - Feto bovino abortado. SNC. Em A, observa-se encefalite não-supurativa com pequenos focos de células inflamatórias mononucleares e células da glia (HE, obj 40). Em B, observa-se encefalite necrosante não-supurativa focal (HE, obj 40)
- Figura 3 - Coração de feto de uma cabra inoculada com *N. caninum* utilizado como controle positivo da reação de IHQ. Em A observa-se a presença de taquizoítos (IHQ, obj. 40x), em B visualiza-se com maior detalhe os taquizoítos (obj 100x)
- Figura 4 - Presença de taquizoítos no neurópilo do SNC de feto bovino abortado visualizado pela IHQ e positivo na *nested* PCR PLUS (amostra 11) (IHQ, A: obj 40x e B: obj 100x)
- Figura 5 - Presença de taquizoítos no neurópilo do SNC de feto bovino abortado visualizado pela IHQ (amostra 01) (IHQ, A: obj 40x e B: obj 100x)
- Figura 6 - *Nested* PCR PLUS de amostras de abortamento bovino. Amostras negativas: canaletas 1 e 3. Amostras positivas: canaleta 2 (amostra 11-cérebro), canaleta 4 (amostra 64-coração+fígado) canaleta 5 (amostra 96-cérebro), canaleta 6 (amostra 97-coração+fígado), controle positivo (POS) e controle negativo (Br) da reação
- Figura 7 - *Nested* PCR JB de amostras de abortamento bovino. Amostras negativas: canaletas 1, 2, 3 e 4. Amostras positivas: canaleta 5 (amostra 96-cérebro), canaleta 6 (amostra 97-coração+fígado), controle positivo (POS) e controle negativo (Br) da reação

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Achados histopatológicos dos casos de aborto bovino que continham lesões compatíveis com infecção por *N. caninum*, reproduzido de Corbellini et al. (2000)
- Quadro 2 - Protocolo de desidratação, diafanização e embebição por parafina de SNC, órgãos fetais e placenta de fetos bovinos abortados, modificado de PROPHET (1995)
- Quadro 3 - Protocolo de desparafinização, hidratação, coloração, desidratação e diafanização dos cortes de tecido de SNC, órgãos fetais e placenta de fetos bovinos abortados, modificado de ALLEN (1995)
- Quadro 4 - Descrição dos *primers* utilizados nas diferentes reações de *nested* PCR para *N. caninum*
- Quadro 5 - Primeira amplificação para *N. caninum* descrita por HUGHES et al. (2006) e alterações feitas após padronização no LVB.....
- Quadro 6 - Segunda amplificação para *N. caninum* descrita por HUGHES et al. (2006) e alterações feitas após padronização no LVB.....
- Quadro 7 - Primeira amplificação para *N. caninum* descrita por BARRAT et al. (2008) e alterações feitas após padronização no LVB.....
- Quadro 8 - Segunda amplificação para *N. caninum* descrita por BARRAT et al. (2008) e alterações feitas após padronização no LVB.....
- Quadro 9 - Margens de valores para classificar o grau de concordância do índice *kappa*.....

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Alterações histológicas mais freqüentes em amostras encaminhadas ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Animal do Instituto Biológico, analisadas pelo método de HE
- Tabela 2 - Ocorrência de *N. caninum* em SNC e órgãos de fetos bovinos abortados, positivos à IHQ, com e sem lesões histopatológicas pela HE
- Tabela 3 - Freqüência de positividade para *N. caninum* observada em órgãos e placenta pelo teste de *Nested* PCR (PLUS e JB) realizadas em amostras de abortamento bovino
- Tabela 4 - Positividade das amostras totais de abortamento infeccioso, para cada técnica, individualmente (IHQ, *nested* PCR PLUS e *nested* PCR JB)
- Tabela 5 - Índice *kappa* para verificar a concordância entre a *nested* PCR PLUS e IHQ realizadas para o diagnóstico de *N. caninum* em amostras de abortamento bovino
- Tabela 6 - Índice *kappa* para verificar a concordância entre a *nested* PCR JB e IHQ realizadas para o diagnóstico de *N. caninum* em amostras de abortamento bovino
- Tabela 7 - Índice *kappa* para verificar a concordância entre a *nested* PCR PLUS e *nested* PCR JB realizadas para o diagnóstico de *N. caninum* em amostras de abortamento bovino
- Tabela 8 - Concordância expressa pelo índice *kappa* entre testes diagnósticos de *N. caninum* em amostras de abortamento bovino
- Tabela 9 - Taxa de infecção fetal pelo *N. caninum* representada pela positividade em pelo menos uma das técnicas diagnósticas nas amostras encaminhadas no período de janeiro de 2006 a maio de 2008
- Tabela 10- Faixas etárias dos fetos abortados, informadas na ficha de encaminhamento dos materiais fetais e positividade a qualquer um dos testes diagnósticos (IHQ e *nested* PCR PLUS e *nested* PCR JB)
- Tabela 11- Origem das amostras de abortamento quanto aos Estados associadas com a positividade ao *N. caninum* em pelo menos uma das técnicas diagnósticas (IHQ, *nested* PCR PLUS e *nested* PCR JB), considerando as amostras encaminhadas e as amostras positivas, em relação ao total geral

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BoHV-1	Herpesvírus Bovino Tipo 1
BoHV-4	Herpesvírus Bovino Tipo 4
BVDV	vírus da diarreia viral bovina
DAB	diaminobenzidina
DMSO	dimetilsulfoxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
ELISA	ensaio imunoenzimático
EUA	Estados Unidos da América
g	grama
<i>g</i>	gravidade terrestre
HCL	ácido clorídrico
HE	coloração de Hematoxilina-eosina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IB	imunoblotting
IBR	rinotraqueíte infecciosa bovina
IC	intervalo de confiança
IgG	imunoglobulina G
IFI	imunofluorescência indireta
IFN- γ	interferon-gama
IHQ	imunoistoquímica
IL	interleucina
ITS	espaçador interno transcrito
MEM	meio mínimo essencial
MN	células inflamatórias mononucleares
μ g	micrograma
μ L	microlitro
mL	mililitro
μ m	micrômetro
mM	milimolar
MgCl ₂	cloreto de magnésio
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
pb	pares de base

PCR	reação da polimerase em cadeia
pH	potencial hidrogeniônico
q.s.p.	quantidade suficiente para
QC	quantitativa-competitiva
RNA	ácido ribonucléico
SNC	Sistema Nervoso Central
TAE	solução de Tris, Ácido Acético Glacial e EDTA
TGF β	fator de crescimento tumoral beta
TNF- α	fator de necrose tumoral-alfa
V/cm	volts por centímetro
%	porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	graus <i>Celsius</i>
+	sinal matemático de mais ou indicação de intensidade/positividade (tabelas)
<	menor
>	maior
=	igual
α	alfa
μ	micro
®	marca registrada
∞	infinito

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. INTRODUÇÃO

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características do *Neospora caninum*

2.2. Epidemiologia dos fetos bovinos abortados e bovinos adultos

2.3. Epidemiologia no Brasil

2.5. Patogenia

2.6. Sinais clínicos

2.7. Lesões macroscópicas e microscópicas

2.8. Resposta Imune

2.9. Diagnóstico

2.9.2. Diagnóstico laboratorial

2.9.3. Diagnóstico diferencial

2.10. Prevenção e Controle

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras

3.2. Histotécnica

3.3. Técnica de IHQ

3.4. Cultivo e Manutenção da cepa padrão de *N. caninum*

3.5. Preparo das amostras de órgãos fetais, SNC e anexos fetais para PCR

3.6. Reação da Polimerase em Cadeia

3.7. Análise estatística

4. RESULTADOS

4.1. Achados microscópicos

4.2. Achados imunoistoquímicos e PCR

5. DISCUSSÃO

6. CONCLUSÕES

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. ANEXOS

1. INTRODUÇÃO

O abortamento é definido como a eliminação do feto prematuramente e representa um sério problema em rebanhos bovinos de todo o mundo devido ao significativo impacto econômico que estas perdas ocasionam (CORBELLINI, 2001). A gama de enfermidades e agentes patogênicos envolvidos em abortamentos é muito grande e, desta forma, a dificuldade de identificação da etiologia responsável e conseqüentemente sua prevenção e controle se tornam cada vez mais difíceis, não só pelo custo, mas porque outros agentes ou anticorpos contra estes podem estar ao mesmo tempo presentes na amostra, dificultando a interpretação dos resultados.

A obtenção do sucesso no diagnóstico de aborto depende do envio de fetos e placenta, a realização de necropsia, incluindo coleta adequada de materiais e a execução de exames histopatológicos, microbiológicos, imunoistoquímicos, sorológicos e micológicos (KIRKBRIDE, 1990). Estudos baseados em diagnósticos etiológicos realizados em fetos bovinos abortados revelaram que a maioria dos casos com causa determinada deve-se a agentes infecciosos (ANDERSON et al., 1990; KIRKBRIDE, 1992).

Neospora caninum (*N. caninum*), um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, primeiramente detectado em cães na Noruega (BJERKÅS; MOHN; PRESTHUS, 1984), descrito e nomeado em 1988 por Dubey et al. (1988), foi identificado como o agente causador de abortamento em bovinos (ANDERSON et al., 1991), impulsionando o desenvolvimento dos primeiros estudos sobre a neosporose nesta espécie. A infecção pelo *N. caninum* é reconhecida como uma importante causa de abortamento em rebanhos leiteiros em todo o mundo (THILSTEAD; DUBEY, 1989; DUBEY; LINDSAY, 1996).

No Brasil há poucos relatos de diagnóstico de infecção por *N. caninum* em fetos bovinos abortados (GONDIM et al., 1999; CORBELLINI et al., 2000). Os dados de referências do *N. caninum* ou das lesões originadas em fetos bovinos abortados são achados esporádicos, sendo necessários mais estudos epidemiológicos que permitam conhecer a prevalência, os fatores de risco associados e a importância real, tanto econômica como sanitária da neosporose (DUBEY, 1999a,b; JENKINS et al., 2002).

Não há estudos estimando as reais perdas da indústria leiteira bovina sobre os danos agregados a neosporose (DUBEY, 2003). Custos indiretos incluem ajuda profissional, descarte de animais e diminuição na produção de leite (THURMOND; HIETALA, 1997; HERNANDEZ; RISCO; DONOVAN, 2001).

Objetivou-se pesquisar a presença de *N. caninum* por meio da técnica de imunohistoquímica (IHQ) e dois protocolos de *nested* PCR, bem como as lesões causadas por este parasita pela histologia convencional (H.E.) nos diversos tecidos e anexos de fetos bovinos abortados. Os objetivos específicos foram:

- Caracterizar as lesões sugestivas de abortamento infeccioso pela histopatologia (HE) nos diversos tecidos fetais
- Verificar a frequência de ocorrência de *N. caninum* utilizando a IHQ, *nested* PCR PLUS e *nested* PCR JB
- Caracterizar os achados histopatológicos dos fetos com resultados positivos para *N. caninum* na IHQ, *nested* PCR PLUS e *nested* PLUS JB.
- Correlacionar os resultados diagnósticos entre as três provas, IHQ, *nested* PCR PLUS e *nested* PCR JB.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características do *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; ELLIS et al., 1994). Os integrantes da família Sarcocystidae se caracterizam por terem ciclos biológicos heteróxeos, ou seja, formam cistos em hospedeiros intermediários de diferentes espécies de herbívoros e possuem como hospedeiros definitivos diferentes espécies de carnívoros, que eliminam oocistos nas fezes, que esporularão no meio ambiente, produzindo em seu interior dois esporocistos com quatro esporozoítos. Cabe destacar quatro espécies estreitamente relacionadas: *N. caninum*, *T. gondii*, *H. hammondi* e *H. heydorni*, cujos oocistos têm um tamanho similar, porém apresentam importantes diferenças biológicas e estruturais que justificam a existência do gênero *Neospora* (DUBEY et al., 2002a; DUBEY et al., 2002b).

Do ponto de vista biológico, são notáveis as diferenças quanto à composição antigênica, o ciclo biológico e as manifestações clínicas da infecção causada pelos integrantes da família Sarcocystidae. O emprego de provas diagnósticas sorológicas específicas tem permitido diferenciar o *N. caninum* de outras espécies graças à sua diferente composição antigênica. Quanto às manifestações clínicas, a paralisia do quarto posterior que apresentam os animais congenitamente infectados por *N. caninum* é um sintoma que não tem sido observado em outras espécies nas quais foi diagnosticada infecção por *T. gondii* e até o momento se desconhece a relevância clínica de *H. hammondi* e *H. heydorni* (DUBEY et al., 2002b).

Destacam-se também as diferenças ultra-estruturais existentes entre os cistos teciduais e os taquizoítos destas espécies. Os cistos teciduais de *N. caninum* apresentam uma parede cística mais grossa que os de *T. gondii* e *H. heydorni* (SPEER et al., 1999). A presença, localização e o número de determinadas organelas no citoplasma dos taquizoítos também diferem nos três gêneros mencionados (SPEER; DUBEY 1989; DUBEY et al., 2002b). Além disso, uma grande variedade de estudos sobre diversidade genética existente entre os gêneros da subfamília toxoplasmatinae tem corroborado para que *N. caninum*, *T. gondii* e *H. heydorni* sejam considerados espécies diferentes (ELLIS et al., 1999, MUGRIDGE et al., 1999; MUGRIDGE et al., 2000; MONTEIRO, 2006).

Com relação ao ciclo biológico, até 1998 se conhecia apenas algumas espécies hospedeiras no ciclo biológico do *N. caninum* e a única via de transmissão demonstrada era a transplacentária. Os estudos experimentais de McAllister et al. (1998) foram definitivos no conhecimento da biologia deste parasita, pois demonstraram o papel do cão como hospedeiro definitivo e, conseqüentemente, o modo de transmissão horizontal. Mais recentemente, observou-se que o coiote (*Canis latrans*) também pode eliminar oocistos nas fezes, demonstrando ser também hospedeiro definitivo do *N. caninum* (GONDIM et al., 2004a). Os hospedeiros intermediários são os bovinos, bubalinos, ovinos e outras espécies (WEISS et al., 1999; DUBEY, 1999 a e b, DUBEY, 2003). Este protozoário é agente causador de aborto e, conseqüentemente, de perdas reprodutivas em bovinos de todo o mundo (DUBEY, 2003).

Os três estágios reconhecidos do parasita são taquizoítos, bradizoítos e oocistos (DUBEY, 1999a; LINDSAY; DUBEY, 2000). Os taquizoítos e cistos teciduais são os estágios intracelulares encontrados nos hospedeiros intermediários. Os taquizoítos dividem-se rapidamente em várias células do hospedeiro, ocasionando áreas de necrose e disseminando a infecção aos órgãos durante a fase de infecção aguda, tendo predileção pelo sistema retículo-endotelial (macrófagos e linfócitos) (GENNARI; SOUZA, 2002; MÜLLER et al., 2002). Os bradizoítos (contidos nos cistos teciduais) dividem-se lentamente e são encontrados no sistema nervoso central (SNC), nervos periféricos e retina, músculo esquelético e cardíaco, podendo persistir durante anos sem manifestações clínicas significativas no hospedeiro (DUBEY; LINDSAY, 1996; DUBEY, 1999a; MÜLLER et al., 2002).

N. caninum é um parasita intracelular obrigatório. Os taquizoítos penetram na célula hospedeira mediante invasão ativa em menos de cinco minutos, localizando-se no interior de um vacúolo parasitóforo no citoplasma. O fenômeno de invasão celular tem sido amplamente estudado em cultivos celulares e leva a um reconhecimento prévio e adesão à célula hospedeira. No interior do vacúolo parasitóforo os taquizoítos se multiplicam mediante endodiogenia e uma célula pode albergar mais de 100 taquizoítos. Após a ruptura celular, os taquizoítos saem para o meio extracelular e em poucas horas iniciam os mecanismos de adesão e invasão de novas células (HEMPHILL et al., 1996). A destruição celular e a enfermidade dependem da habilidade do taquizoíto em penetrar e multiplicar-se na célula hospedeira e da habilidade do hospedeiro em inibir a multiplicação do parasita.

O cão ingere os cistos teciduais desenvolvendo os oocistos (forma infectante) pela reprodução sexuada do protozoário nas células do epitélio intestinal. Os oocistos são eliminados pelas fezes na forma não esporulada, transformando-se em oocistos esporulados em 48 horas após a saída do trato intestinal, contaminando as pastagens, alimentos e água consumidos pelos hospedeiros intermediários (GENNARI; SOUZA, 2002).

Os mecanismos implicados na conversão do taquizoítio em bradizoítio, e, portanto, na passagem da fase de infecção aguda para crônica não têm sido esclarecidos e é objeto de estudo na atualidade (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003).

A transmissão horizontal para o hospedeiro intermediário ocorre pela ingestão de produtos de abortamento e de oocistos presentes nos alimentos e na água. Os fetos podem ingerir taquizoítos pelo fluido amniótico e bezerros recém-nascidos pelo colostro, especialmente nas primeiras quatro horas de vida (DUBEY; SHARMA, 2003; MOORE et al., 2003; ROMERO; FRANKENA, 2003; HOBSON et al., 2005).

A transmissão vertical (transplacentária) é a principal forma de disseminação de *N. caninum* em rebanhos bovinos leiteiros, mantendo a infecção por várias gerações (BJÖRKMAN et al., 1996). Esse tipo de transmissão ocorre pela passagem de taquizoítos presentes no sangue pela placenta infectando o feto, que pode morrer no útero e ser reabsorvido, mumificado ou autolisado. Pode ocorrer o nascimento de animais cronicamente infectados e clinicamente normais, ou com distúrbios neurológicos, além de outras disfunções como fraqueza, dificuldade de ganho de peso e crescimento (DUBEY, 1999a).

Vacas soropositivas têm 95,2% de probabilidade de transmissão vertical do *N. caninum* (DAVISON; GREINER; TREES, 1999c). O abortamento é a principal evidência clínica observada nas vacas infectadas e pode ocorrer a partir do terceiro mês de gestação, sendo a grande maioria entre o quinto e sexto mês. As conseqüências para o feto variam de acordo com a imunidade da fêmea (primoinfecção ou reinfecção) e o período gestacional em que se encontra (PARÉ; THURMOND; HIETALA, 1997; STENLUND et al., 1999).

Estudos realizados no Canadá e Austrália mostraram que a transferência de embriões de fêmeas infectadas para receptoras soronegativas pode ser uma maneira eficaz e segura de prevenir a transmissão transplacentária do agente (CAMPERO et al., 2003).

Não há evidências que a infecção por *N. caninum* é zoonótica (DUBEY, 2003), porém relatos da soropositividade em humanos não permitem descartar a possibilidade de que a infecção por este parasita afete o homem (NAM; KANG; CHOI, 1998; TRANAS et al., 1999).

Lobato et al. (2006) investigaram a presença de anticorpos para *N. caninum* e *T. gondii* em 256 amostras de soro divididas em quatro grupos: 61 amostras de pacientes HIV positivos, 50 amostras de pacientes com distúrbios neurológicos, 91 amostras de recém-nascidos e 54 amostras a partir de indivíduos saudáveis. Os soros foram avaliados por IFI, ELISA e *immunoblotting* (IB). A pesquisa de IgG anti-*N. caninum* foi predominantemente detectada em pacientes infectados pelo HIV (38%) e pacientes com desordens neurológicas (18%), enquanto que recém-nascidos e indivíduos saudáveis mostraram menores taxas de soropositividade (5% e 6%, respectivamente). A soropositividade para *N. caninum* foi significativa quando associada com a soropositividade ao *T. gondii* em pacientes infectados

pelo HIV e pacientes com distúrbios neurológicos. A soropositividade para *N. caninum* foi confirmada pelo IB, com soros positivos reconhecendo o antígeno 29-kDa de *N. caninum*. Os resultados deste estudo indicaram a presença de infecção ou exposição em seres humanos por *N. caninum*, especialmente em pacientes infectados pelo HIV ou pacientes com distúrbios neurológicos, que poderia ter infecções oportunistas e concomitantes com *T. gondii*.

2.2. Epidemiologia da neosporose em fetos bovinos abortados e bovinos adultos

N. caninum tem sido identificado tanto em gado leiteiro como de corte em países dos cinco continentes em casos de aborto endêmico, esporádico e em surtos epidêmicos. A neosporose é considerada uma das causas principais de aborto e a taxa da infecção observada em fetos bovinos enviados para diagnóstico e/ou utilizados em estudos epidemiológicos em distintos países é muito variável, mas tem sido observada de forma geral maior prevalência nas propriedades com problemas prévios de abortamento (HENTRICH et al., 1997; PARÉ; THURMOND; HIETALA 1997; DAVISON; OTTER; TREES, 1999b). Sager et al. (2001) observaram uma elevada correlação entre a presença de anticorpos na mãe e a presença do parasita nos fetos.

São relativamente numerosos os estudos de soroprevalência da infecção por *N. caninum* no gado adulto. A respeito dos vários tipos de técnicas diagnósticas utilizadas (IFI, ELISA), em geral observam-se diferenças importantes entre as taxas de soropositividade obtidas em diversos países, em rebanhos de aptidão de leite e de corte e em animais com e sem antecedente de abortamento (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003).

2.3. Epidemiologia da neosporose no Brasil

O primeiro caso de isolamento do *N. caninum* em feto bovino abortado no Brasil foi realizado por Gondim et al. (1999).

Okuda et al. (2001) analisaram amostras de cinco fetos bovinos abortados (quatro cérebros e um coração), provenientes dos Estados de Minas Gerais e São Paulo, isolando o agente em células da linhagem VERO nas quatro amostras de cérebro.

O primeiro inquérito sorológico para *N. caninum*, no Brasil foi relatado por Brautigam; Hietala e Glass (1996) em bovinos criados no Mato Grosso do Sul e São Paulo. Posteriormente, Gondim e Sartor (1997), em São Paulo, estudaram a soroprevalência em vacas leiteiras.

Quanto aos estudos epidemiológicos realizados por diagnóstico anatomopatológico da neosporose no Brasil, a presença de lesões sugestivas pela técnica de coloração com

Hematoxilina e Eosina (HE) e confirmação do antígeno parasitário pela imunistoquímica (IHQ) foram detectadas por Corbellini et al. (2000), Santos (2000), Corbellini et al. (2001), Corbellini et al. (2002) e Pescador (2005).

Corbellini et al. (2000) examinaram histologicamente 30 fetos abortados no Estado do Rio Grande do Sul pela técnica de coloração com HE. Observaram que seis amostras apresentaram lesões histológicas compatíveis com as causadas por protozoário, sendo que destas, três foram confirmadas pela IHQ como *N. caninum*.

Santos (2000) ao examinar fetos e bezerros natimortos provenientes do Estado do Paraná verificou pela técnica de HE que 22,5% (9/40) possuíam lesões histopatológicas sugestivas de neosporose, sendo confirmados pela IHQ como positivos para *N. caninum*.

Em Santa Catarina, durante um surto de aborto causado pelo *N. caninum*, dois fetos que foram submetidos ao exame histopatológico revelaram a presença de lesões inflamatórias não supurativas de severidade variável, presente em diversos órgãos. Um dos fetos apresentou ainda, severa pneumonia intersticial multifocal, com inúmeros focos de necrose e extensos infiltrados inflamatórios. Ambos foram positivos pela IHQ (CORBELLINI et al., 2001).

Corbellini et al. (2002) examinaram 46 fetos abortados provenientes do Rio Grande do Sul, sendo que 22 deles apresentaram na avaliação histopatológica inflamação não supurativa principalmente no cérebro e coração. No cérebro as lesões consistiam primariamente de infiltrados de células inflamatórias mononucleares com ocasional foco de necrose. Pela técnica de IHQ houve uma positividade de 39,13% (18/46) para *N. caninum*.

Paula (2003) observou em 32 fetos bovinos oriundos de abortos espontâneos, que haviam sido encaminhados ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), para diagnóstico de *N. caninum*, dez positivos à hemi-nested PCR, perfazendo uma frequência de ocorrência de 31,25%. As amostras positivas foram detectadas em São Paulo (7/23), Alagoas (1/2) e Minas Gerais (1/3).

Pescador (2005) pesquisou o *N. caninum* por técnicas histológicas em 237 fetos bovinos abortados provenientes de diversas localidades do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, enviados ao Setor de Patologia Veterinária da UFRGS no período de junho de 1999 a maio de 2004. A maior parte dos fetos 55,2% (37/67) com resultado positivo na IHQ apresentou lesões no cérebro (encefalite multifocal), sendo altamente sugestivo de infecção por *N. caninum*, indicando que o cérebro é o melhor órgão para a realização do teste de IHQ.

2.4. Patogenia

Uma vez no organismo, os taquizoítos podem infectar as células de quase todos os tecidos do animal, mas possuem um maior tropismo pelas células do SNC, células musculares esqueléticas e cardíacas e células endoteliais, ocasionando a destruição das mesmas com a formação de focos de necrose, que constituem a principal lesão desta enfermidade (BARR et al., 1991a; ANDERSON et al., 1991; WOUDA et al., 1996).

As conseqüências da infecção em uma fêmea gestante podem ser a reabsorção embrionária, o abortamento do feto ou o nascimento de bezerros congenitamente infectados com ou sem sintomatologia, os quais podem transmitir a infecção à descendência se forem mantidos no rebanho como animal de reposição (BUXTON; McALLISTER.; DUBEY, 2002).

A infecção do feto pode ocorrer como conseqüência da reativação de uma infecção persistente (crônica) da fêmea gestante, ou quando esta ingerir oocistos esporulados. Este último suposto confere uma possível explicação para alguns surtos de abortos por *Neospora* descritos por diversos autores (McALLISTER et al., 1996). A infecção no feto vem precedida por uma parasitemia na mãe, com uma posterior invasão das células no útero pelo parasita e um possível dano à placenta, se bem que só uma minoria dos fetos infectados sucumbe a uma infecção letal. Os fatores que podem conduzir ao desenvolvimento da enfermidade são diversos: o momento da gestação em que se tem a parasitemia (GONZÁLEZ et al., 1999), na maioria dos casos diretamente relacionada com o momento da recrudescência de uma infecção maternal persistente (BUXTON et al., 1998); à quantidade e duração da parasitemia, à capacidade do feto em desenvolver uma resposta imune, às características do achado de *N. caninum* e à eficácia da resposta imune maternal (INNES et al., 2002).

O *N. caninum* invade as células do útero bovino, se multiplica e causa a destruição focal das porções materna e fetal da placenta, desencadeando uma resposta inflamatória que se estende à membrana corioalantóidea entre os cotilédones (BARR et al., 1994; OTTER et al., 1995). A placenta possui um papel essencial no equilíbrio imunológico. Durante a gestação há uma série de mecanismos complexos que permitem que a mãe gestante não rejeite o feto, entretanto isso pode favorecer a colonização de certos microorganismos como é o caso de *N. caninum*. Na placenta predomina a presença de citocinas benéficas como a interleucina (IL) -10 e o fator de crescimento tumoral (TGF) - β , enquanto que as citocinas com um efeito potencialmente prejudicial, como a IL-2, IL-12, o IFN- γ e o TNF- α , estão restringidas (ENTRICAN, 2002). Buxton; McAllister e Dubey (2002) também sugerem que a presença do TNF- α poderia ter um papel determinante no fracasso da gestação.

A patogenia da infecção por *N. caninum* nos machos é um aspecto importante, sendo necessários estudos sobre a possível eliminação do parasita via sêmen, sua

persistência no aparelho reprodutor masculino e possível transmissão venérea (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003). Recentemente, utilizando a PCR em tempo real foi possível detectar e quantificar DNA de *N. caninum* em sêmen de bovinos destinados à reprodução (ORTEGA-MORA et al., 2003; CAETANO-DA-SILVA et al., 2004).

Nem sempre a infecção por *N. caninum* é suficiente para produzir o aborto. Outros fatores como mudanças de manejo, infecções concomitantes e alterações no estado imunitário desempenham um importante papel predisponente (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003).

Simultaneamente ao dano e à resposta inflamatória na placenta materna e fetal, o parasita entra na corrente sanguínea do feto e invade diversos tecidos como coração, fígado, músculo esquelético e pulmão, mostrando predileção pelo SNC e ao redor de capilares, onde o parasita se localiza e multiplica nas fases iniciais (BUXTON et al., 1998).

Os fetos abortados, freqüentemente autolisados, não apresentam lesões macroscópicas características e não há retenção de placenta. Em determinadas circunstâncias pode ocorrer mumificação do feto (achado clínico característico nos surtos de abortamento por neosporose) que é abortado ou retido até o final da gestação (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003).

Os resultados observados tanto em infecções naturais (BARR et al., 1991b) quanto experimentais (BARR et al., 1994; WILLIAMS et al., 2000) têm demonstrado que a transmissão do parasita no início da gestação é menos provável, mas se ocorrer, pode causar a morte do produto, seguida de uma posterior reabsorção devido à imaturidade do seu sistema imune. Com o avançar da gestação, a possibilidade de transmissão aumenta, e portanto, o risco de aborto, porque no terço médio o sistema imunológico começa a reconhecer e a responder frente aos microorganismos (OSBURN, 1988). A infecção ao final da gestação tem como resultado o nascimento de bezerros congenitamente infectados, mas clinicamente são, uma vez que o feto é capaz de desenvolver uma defesa competente frente ao patógeno (GONZÁLEZ et al., 1999). A patogenia do aborto por *N. caninum* também está estreitamente relacionada com a resposta imune celular desenvolvida pela fêmea gestante, que é notavelmente mais eficaz no início da gestação do que no segundo terço (INNES et al., 2002).

A infecção congênita no útero tem como resultado, na maioria dos casos, o nascimento de bezerros infectados clinicamente são. Nestes animais assintomáticos, a infecção intra-uterina induz em fetos imunocompetentes a produção de títulos elevados de anticorpos específicos pré-colostrais, os quais podem chegar a serem superiores aos títulos de anticorpos das mães. Até 95% dos bezerros infectados congenitamente podem nascer clinicamente normais, os quais são soropositivos e podem transmitir a infecção a sua descendência (DAVISON; FRENCH; TREES, 1999a). Apesar da infecção subclínica ser a forma mais freqüente da neosporose congênita, também têm sido descritos casos de

bezerros infectados congenitamente que apresentaram sintomatologia nervosa, como consequência da presença de cistos tissulares no SNC (DUBEY; LINDSAY, 1996; SANTOS et al., 2006).

2.5. Sinais clínicos

Nos bovinos adultos, o aborto é o principal sinal clínico observado nas fêmeas gestantes infectadas, sendo que a maior parte do rebanho adulto é capaz de controlar a infecção e permanecer clinicamente normal, apesar de estar persistentemente infectado. Pode ocorrer tanto em novilhas como em vacas e se desconhece a existência de relação entre a idade dos animais e sua receptividade à infecção. Cerca de cinco a seis por cento dos animais abortam na gestação seguinte ou em outras posteriores (ANDERSON et al., 1995; WOUDA; MOEN; SCHUKKEN, 1998) e haverá transmissão repetida e freqüente de vacas infectadas à descendência.

Nos rebanhos infectados por *N. caninum*, os abortos podem ocorrer em qualquer época do ano e apresentam-se de forma esporádica, endêmica ou surtos epidêmicos (DUBEY, 2003).

A infecção fetal pode ocorrer em qualquer época da gestação, mas as consequências para o feto são mais graves no início desta, podendo ocasionar a morte do embrião ou do feto no útero e sua reabsorção. Geralmente, o aborto ocorre entre o terceiro e nono mês da gestação, sendo mais freqüente em torno do quarto ao sétimo mês (ANDERSON et al., 1995; MOEN; WOUDA; DE GEE, 1996; CAMPERO et al., 1998; SAGER et al., 2001).

A infecção do feto nem sempre provoca sua morte, ocorre o nascimento de bezerros infectados congenitamente e ocasionalmente com sintomatologia nervosa (DUBEY; LINDSAY, 1996). Os primeiros sinais clínicos aparecem, freqüentemente, no quarto ao quinto dia após o parto e persistem até duas semanas. A casuística é reduzida e estes animais podem apresentar problemas neuromusculares muito variáveis, desde ligeira incoordenação até paralisia completa, debilidade e dificuldade para se levantarem. Os membros anteriores e/ou posteriores ficam flexionados ou hiperextendidos e o exame neurológico revela ataxia, diminuição do reflexo patelar e perda de coordenação (BARR et al., 1991b; BARR et al., 1993). Em alguns casos ocorre exoftalmia, posição assimétrica dos olhos e outras deformações associadas com a lesão das células nervosas embrionárias (BRYAN et al., 1994).

A grande variabilidade do quadro clínico observada nos animais com neosporose congênita está relacionada, provavelmente, com a idade e o desenvolvimento do sistema

imune do feto no momento da infecção e com a distribuição das lesões no SNC (DUBEY, 2003).

2.6. Lesões macroscópicas e microscópicas

As lesões localizam-se principalmente no feto abortado e na placenta. Os animais adultos, mesmo que infectados, não manifestam alterações lesionais evidentes. Os fetos podem estar totalmente autolisados ou mumificados, sendo esta última forma relativamente comum nos abortos causados por este parasita. Em certos casos se observa unicamente o esqueleto ósseo, tendo em vista que o restante dos tecidos pode ser reabsorvido no útero, ou o feto é eliminado com a placenta (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003).

As alterações macroscópicas são raras e apresentam-se na musculatura, tanto esquelética como cardíaca, em forma de pequenas áreas esbranquiçadas que aprofundam à secção de corte. O estudo histopatológico dos fetos abortados é um método auxiliar no diagnóstico. As lesões são de natureza inflamatória e degenerativa (focos de necrose), podendo aparecer em qualquer órgão ou tecido fetal, mas pela freqüência de aparecimento destacam-se o SNC, o coração, o músculo esquelético e o fígado. Em outros órgãos como o rim, o pulmão, o pâncreas ou as glândulas adrenais também têm sido encontradas lesões associadas a esta parasitose (BARR et al., 1991b; ROGERS et al., 1993).

No SNC, o parasita invade de forma ativa neurônios e astrócitos, provocando transtornos neuromusculares graves pela destruição das células nervosas, incluindo nervos craniais e espinhais e afetam a transmissão do impulso nervoso (MAYHEW et al., 1991; DUBEY; DE LAHUNTA, 1993). A lesão mais característica é uma encefalomielite não supurada e de distribuição multifocal, que se caracteriza pela presença de um ou vários focos de necrose com infiltrado inflamatório formado por macrófagos, linfócitos e plasmócitos, proliferação da microglia e dos astrócitos, podendo apresentar hemorragias ou áreas de mineralização (BOULTON et al., 1995). Ocasionalmente tem sido observada a formação, ao redor dos cistos tissulares, de granulomas e bradizoítos em degeneração, indicando que alguns cistos se romperam e causaram reação inflamatória pelo hospedeiro (DUBEY; HARTLEY; LINDSAY, 1990; MAYHEW et al., 1991). Esporadicamente podem ser visualizados manguitos perivasculares mononucleares ao redor destas lesões.

No coração, a alteração típica é uma miocardite que pode variar desde focal a difusa e está constituída por macrófagos, linfócitos e plasmócitos em menor número localizados entre as fibras musculares, que podem mostrar sinais de degeneração com necrose e posterior calcificação (WOUDA et al., 1996).

Nos demais órgãos, ainda que sejam susceptíveis às lesões, estas aparecem com menor freqüência. O fígado apresenta uma hepatite não supurada, caracterizada por uma

necrose dos hepatócitos, associada a um infiltrado de macrófagos e linfócitos distribuídos de forma difusa, sendo mais intenso nos espaços porta (BARR et al., 1993; WOUDA et al., 1996, WOUDA et al., 1997). Também podem ser detectados infiltrados inflamatórios semelhantes aos descritos em outros órgãos como pulmão (focais ou difusos), rim (localizados preferentemente na cortical), pâncreas ou glândula adrenal. Nos gânglios linfáticos observa-se uma hiperplasia reativa, com presença de folículos linfóides proeminentes (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003).

N. caninum pode ser detectado quase exclusivamente nas lesões do SNC, com menor frequência no coração e raramente nos demais órgãos afetados. Em muitas ocasiões, são necessárias secções seriadas do tecido para manifestar o agente com presença de lesões evidentes. Podem ser identificados escassos taquizoítos associados às áreas de necrose do SNC, dificilmente identificáveis sem a utilização da IHQ. O parasita pode localizar-se tanto no neurópilo como no interior do citoplasma dos neurônios. Ocasionalmente, os taquizoítos se localizam associados aos infiltrados inflamatórios e às áreas de gliose presentes no encéfalo, ou formando grupos, sem parede que os delimite, em áreas onde não existem lesões. Os cistos tissulares de *N. caninum* são menos frequentes e aparecem no tecido nervoso não associado às lesões, podendo ser observado em áreas de infiltrado inflamatório. Peters et al. (2001) têm detectado cistos no tecido muscular esquelético de animais com infecção natural pela técnica de IHQ, utilizando anticorpos específicos frente a *N. caninum*.

Ainda que a infecção subclínica pareça ser bastante comum, até o momento são poucos os casos clínicos de neosporose em bezerros nascidos vivos de mães infectadas. As principais lesões se localizam no SNC, onde macroscopicamente podem ser observadas áreas de malácia, com ou sem hemorragia, semelhantes às descritas nos fetos abortados. Estas lesões se localizam sobretudo na medula espinhal, que também pode apresentar malformações (BARR et al., 1991b; BRYAN et al., 1994). Microscopicamente, observa-se uma encefalomielite não supurada, com necrose moderada e presença de macrófagos e células de Gitter, linfócitos, células plasmáticas e, ocasionalmente, eosinófilos. Também são observados freqüentemente manguitos perivasculares, focos de gliose, vacuolização do neurópilo e a degeneração walleriana dos axônios com presença de esferóides. Estes fenômenos de tipo degenerativo e inflamatório podem localizar-se também nas porções extra-medulares dos nervos espinhais. Diferentes partes da musculatura estriada esquelética podem apresentar atrofia associada às deformações das extremidades, como conseqüência das alterações nervosas. Nestes bezerros não é difícil observar taquizoítos e cistos parasitários nos tecidos, tanto no encéfalo como na medula espinhal, associados às áreas lesionadas ou não. A quantidade de parasitas ou a presença de uma ou outra forma variam de um animal a outro nos casos descritos (BARR et al., 1991b; BRYAN et al., 1994).

2.7. Resposta imune

O *N. caninum* desencadeia resposta imune humoral e celular. A pesquisa de anticorpos é importante ferramenta em estudos soropidemiológicos para detectar causas de abortamento em matrizes e no diagnóstico de infecção fetal (DUBEY, 2003).

Os estudos epidemiológicos realizados por McALLISTER et al. (2000) em rebanhos de gado bovino têm demonstrado que as vacas persistentemente infectadas têm uma menor probabilidade de abortar que as vacas primoinfectadas. Por outro lado, estudos adicionais evidenciam que o risco de abortos associados à infecção por *N. caninum* é mais elevado na primeira gestação que nas posteriores (THURMOND; HIETALA, 1997). Estas observações sugerem que o gado poderia desenvolver uma imunidade protetora frente ao aborto, mas a eficácia dessa imunidade adquirida parece ser insuficiente para prevenir a transmissão vertical (INNES et al., 2002).

2.8. Diagnóstico

O diagnóstico definitivo do abortamento por *N. caninum* é feito pela demonstração do parasita nos tecidos de fetos abortados (IHQ, PCR), quase sempre dificultada devido à autólise (CHAHAN et al., 2003). Por este motivo, vários métodos sorológicos podem ser complementares e realizados tanto com o soro da mãe como do feto: imunofluorescência indireta (IFI), ensaios imunoenzimáticos (ELISA), *Imunoblotting* (IB) e aglutinação direta, usando taquizoítos intactos ou antígenos de taquizoítos (JENKINS et al., 2002).

O diagnóstico etiológico do aborto no gado bovino é complexo e laborioso e somente se consegue determinar sua origem em menos de 50% dos casos remetidos aos laboratórios especializados. A valorização adequada dos dados da anamnese e a investigação epidemiológica, assim como os dados obtidos no exame clínico e lesional dos animais afetados (fêmeas que abortam e seus fetos) deve ser levado em conta, bem como ser realizado o diagnóstico laboratorial para confirmar a etiologia do aborto, tendo em vista outras possíveis causas infecciosas ou não (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003; DEL FAVA; PITUCO; GENOVEZ, 2007).

2.8.1. Diagnóstico laboratorial

Nos fetos abortados, o diagnóstico é feito utilizando técnicas que permitam a detecção de lesões, o isolamento e identificação do parasita, a detecção de ácidos nucléicos em tecidos e a demonstração de anticorpos anti-*Neospora* no soro e efusões. Deve ser remetido ao laboratório o feto completo com a placenta e uma amostra de soro materno. Se isso não for possível, deve ser enviada pelo menos a cabeça do feto, tendo em vista que o parasita (taquizoítos e/ou cistos) e as lesões mais características produzidas nos fetos abortados se localizam preferentemente no cérebro, inclusive no caso de fetos mumificados ou em alto grau de autólise (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003).

Em animais adultos, o diagnóstico laboratorial é realizado pela detecção de anticorpos específicos no soro ou no colostro e leite de vacas infectadas (OOI et al., 2000).

A. Técnicas histológicas

Em muitos casos, o diagnóstico da enfermidade tem sido baseado na detecção do parasita ou nas lesões causadas por este nos tecidos fetais mediante técnicas histológicas convencionais (coloração de cortes histológicos com hematoxilina e eosina) e IHQ utilizando anticorpos específicos anti-*N. caninum*. O parasita se localiza com maior frequência na placenta, no cérebro e coração dos fetos abortados que em outros órgãos, sendo principalmente detectado no início da gestação. Os cistos tissulares são observados em maior número nos bezerros natimortos ou em animais neonatos com sintomatologia e sacrificados antes dos sete dias de vida (DUBEY; LINDSAY, 1996).

A.1. Histologia convencional

A identificação do *N. caninum* em estudo histológico convencional (coloração por hematoxilina/eosina) é muito difícil devido a sua similaridade morfológica com *T. gondii* e *Sarcocystis* spp. e que, geralmente, o número de parasitas (taquizoítos e/ou cistos) presentes nas amostras é escasso e são difíceis de encontrar nos cortes histológicos. A observação de lesões histológicas degenerativas e inflamatórias ("lesões compatíveis"), típicas das infecções por protozoários, localizadas no cérebro e coração permitem emitir um diagnóstico presuntivo de aborto por protozoários (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003).

No Brasil, Corbellini et al. (2000) descreveram as lesões histológicas encontradas nos diversos órgãos avaliados (Quadro 1).

Quadro 1 – Achados histopatológicos dos casos de aborto bovino que continham lesões compatíveis com infecção por *N. caninum*, reproduzido de Corbellini et al. (2000).

Caso	Ano	Período (meses)	Órgãos examinados	Lesões encontradas
1	1995	ND ¹	Coração, pulmão, fígado, rim.	Miocardite não supurativa com extensos infiltrados subendocárdicos e áreas de necrose com alguns polimorfonucleares.
2	1996	7,5	Cérebro	Focos inflamatórios multifocais compostos por células mononucleares.
3	1997	ND	Cérebro	Focos inflamatórios multifocais compostos por células mononucleares com necrose central em algumas áreas.
4	1998	6	Cérebro, coração, pulmão, fígado, rim.	Cérebro contendo vários focos inflamatórios multifocais compostos por células mononucleares com necrose central em algumas áreas; miocardite não supurativa acentuada com necrose, calcificação e grupos de taquizoítos; pulmão apresentando discreto infiltrado de células mononucleares intersticial; rim com infiltrados inflamatórios não supurativo intersticial.
5	1998	ND	Coração	Miocardite não supurativa moderada.
6	1999	5	Cérebro, coração, pulmão, fígado.	Cérebro com focos inflamatórios multifocais compostos por células mononucleares com necrose central em algumas áreas; miocardite não supurativa; pulmão com focos de necrose e infiltrados de células mononucleares intersticial; fígado com áreas de necrose focal.

ND¹: Não determinado.

Corbellini et al. (2002) avaliaram 46 fetos bovinos (Rio Grande do Sul, Brasil) no período de julho de 1999 a dezembro de 2000, sendo que 22 (47,8%) apresentavam lesões características de protozoários. Achados de miocardite não supurativa caracterizada por infiltrados linfocitários no miocárdio e/ou epicárdio foram observados em 20 dos 22 fetos com encefalite. Infiltrado de células mononucleares foram observados na musculatura estriada (16/22), pulmão (15/22), fígado (12/20) e rim (7/20).

Wouda et al. (1997), em 80 fetos abortados, detectaram o parasita em cérebro (71 casos = 89%), coração (11 casos = 14%) e fígado (21 casos = 26%), pela IHQ. Segundo Dubey e Lindsay (1996) não há dados sobre a localização preferencial do *N. caninum* no cérebro, portanto, para exame histológico qualquer parte ou fragmento deste pode ser examinado.

Barr et al. (1990), analisaram histologicamente 82 fetos e observaram encefalite e miocardite em 100%, adrenalite em 80%, miosite em 72%, nefrite em 66%, hepatite em 62%, placentite em 53% e pneumonia em 44%.

A.2. Imunoistoquímica

A técnica de IHQ, que utiliza anticorpos anti-*N. caninum* vem sendo empregada desde 1989 como um método efetivo para identificar *N. caninum* (cistos teciduais e taquizoítos) em tecidos fetais e estabelecer um diagnóstico definitivo (LINDSAY; DUBEY, 1989; ÁLVAREZ-GARCIA, 2003). A técnica apresenta melhor desempenho quando é realizado um estudo histopatológico prévio, onde são selecionados fragmentos de SNC com lesões sugestivas de neosporose, ainda que os parasitas possam ser encontrados no pulmão, rim e musculatura esquelética. O estado de autólise de alguns fetos pode diminuir a eficácia do diagnóstico (ANDERSON; BARR; CONRAD, 1994).

Estudos histopatológicos feitos em 188 fetos abortados e/ou placentas demonstraram lesões compatíveis com causa infecciosa em 155 amostras. Em 43 dos 155 fetos e/ou placentas havia lesões microscópicas de meningoencefalite multifocal necrótica não supurativa, epicardite, miocardite, hepatite, miosite e placentite. A IHQ detectou *N. caninum* em 29 fetos dentre os 43 (67,4%) com lesões histopatológicas compatíveis com a infecção pelo parasita (MOORE et al., 2002).

Pescador (2005), em 237 fetos examinados pela técnica histológica de hematoxilina/eosina, observou num total de 72 fetos lesões histológicas sugestivas de protozoário, caracterizadas pela presença de miosite não supurativa (66/70), miocardite não supurativa (53/69), pneumonia intersticial mononuclear com focos de necrose (48/68) e encefalite não supurativa multifocal (45/67). O cérebro apresentava consistência líquida em 61,1% dos fetos, dificultando a obtenção de tecido para as análises. Dos fetos que apresentaram lesões histopatológicas sugestivas de infecção por protozoário, a IHQ revelou a presença de taquizoítos e raros cistos de *N. caninum* no cérebro 55,2% (37/67), fígado 9% (6/66), rim 9% (6/66), músculo esquelético 4,2% (3/70), pulmão 4,4% (3/68) e coração 4,3% (3/69). A maior parte dos fetos com resultado positivo na IHQ apresentou lesões no cérebro, indicando que este tipo de lesão é altamente sugestivo de infecção por *N. caninum*, fazendo deste tecido o melhor órgão para a realização do teste de IHQ. A presença de consistência líquida do cérebro tornou difícil a observação de lesões histológicas compatíveis com

infecção por *N. caninum*. Na grande maioria dos casos, o músculo esquelético, coração e pulmão foram os órgãos que mais apresentaram lesões histológicas inflamatórias sugestivas de protozoário. Entretanto, quando estes órgãos foram submetidos ao teste de IHQ obtiveram resultado negativo, indicando diagnóstico falso-negativo e comprovando, assim, a necessidade do emprego da IHQ no SNC como exame confirmatório da Neosporose, aumentando o sucesso do diagnóstico definitivo.

B. Isolamento e inoculação em animais de laboratórios

O diagnóstico de Neosporose pelo isolamento do parasita, a partir de amostras de tecidos com suspeita de infecção, pode ser realizado por meio da utilização de cultivos celulares (células Vero, Marc, monócitos bovinos) e/ou inoculação em animais sensíveis, imunossuprimidos ou não, a identificação do parasita pode ser confirmada por imunofluorescência direta (IFD) e ou PCR (SILVA, 2004). Estas técnicas são utilizadas para a obtenção de cepas, estudos de patogenia e diagnóstico de infecção.

C. Detecção de ácidos nucleicos

Por causa da baixa sensibilidade da IHQ, alguns pesquisadores têm aplicado a PCR para amplificar seqüências de *N. caninum* a partir de DNA de tecidos fetais frescos, congelados e emblocados em parafina. Testes utilizados para este propósito incluem PCR padrão, PCR semi-quantitativo, *nested* PCR em tubo único ou PCR seguida por hibridização por sonda (JENKINS et al., 2002)

Uma melhora substancial no desempenho diagnóstico da PCR foi conseguida pelo desenho de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) apropriados para a amplificação de seqüências genômicas *N. caninum* específicas pela PCR. Yamage, Flechtner e Gottstein (1996) baseando-se em fragmentos de DNA-*Neospora*, com cinco *primers* positivos (Np1, Np3, Np5, Np7, Np21) e quatro *primers* negativos (Np2, Np4, Np6, Np8), fizeram 19 combinações entre eles. Os pares Np21/Np6, Np21/Np4 e Np7/Np6 geraram bandas únicas específicas, entretanto o par Np21/Np6 foi capaz de amplificar um fragmento DNA-*Neospora* a partir de um único taquizoíto presente em dois miligramas de cérebro bovino.

Muller et al. (1996) otimizaram uma PCR ao incluírem um imunoteste de hidridização de DNA disponível comercialmente (Genetik DEIA kit) na análise dos produtos amplificados. A região Nc5 foi selecionada como alvo da seqüência para amplificação de DNA. Após a amplificação de fragmentos de DNA pela PCR, utilizando o par de *primers* Np21/Np6, uma sonda *Neospora*-específica biotinizada foi acrescentada a uma placa de 96 poços sensibilizada com streptavidina. Os produtos amplificados foram colocados na placa e após nova desnaturação e hibridização acrescentou-se anticorpos monoclonais de camundongo

contra dupla fita e conjugado anti-imunoglobulina de camundongo. Os produtos foram detectados pela sua atividade de ligação a esses anticorpos.

Ho et al. (1996), baseando-se na seqüência gênica da sub-unidade nuclear rRNA, região altamente conservada nos coccídeos apicomplexos, desenharam o par de *primers* COC-1 e COC-2 utilizados na PCR para a detecção de *N. caninum* em amostras de sangue e fluidos amnióticos de bovinos e primatas não humanos. Para se distinguir os produtos da PCR de *N. caninum* de outros coccídeos, uma sonda DNA-*Neospora* específica foi utilizada para hibridizar os produtos da PCR do *N. caninum* por meio do *Southern Blot*, com detecção por quimioluminescência.

Gottstein et al. (1998), examinaram pela PCR descrita por Muller et al. (1996), 83 cérebros de fetos bovinos abortados e detectaram DNA-*Neospora* em 29% deles. Dezoito dos 24 fetos positivos exibiram achados histopatológicos compatíveis com a neosporose e seis foram soropositivos pela RIFI e/ou ELISA. Em contraste ao diagnóstico pela PCR, o cultivo em células ou pela IHQ não detectou a presença do parasita.

Magnino et al. (1998), examinaram por um protocolo de PCR modificado de Ho et al. (1996), 28 amostras de tecidos coletados de fetos bovinos abortados, provenientes de propriedades na Itália. Doze fetos amplificaram fragmentos de DNA do tamanho esperado.

Liddell; Jenkins e Dubey (1999) padronizaram uma PCR quantitativa-competitiva (QC-PCR) para mensurar níveis de *N. caninum* em tecidos de animais infectados. Uma molécula foi sintetizada para atuar como competidora com a seqüência genômica *Neospora*-específica Nc5 pelos componentes da PCR. Quantidades conhecidas do competidor foram acrescentadas a cada reação, permitindo deste modo a mensuração da quantidade de produtos PCR alvo em comparação com a quantidade de produtos amplificados a partir de quantidades pré-definidas.

Ugglia et al. (1998) detectaram DNA-*N. caninum* em cérebros de dois bezerros inoculados experimentalmente com taquizoítos de *N. caninum* usando uma técnica de PCR descrita por Holmdahl e Mattsson (1996). Esses animais, apesar de soropositivos pelo *iscom*-ELISA cinco semanas pós-inoculação, não apresentaram lesões à necropsia. Os parasitas não foram detectados por isolamento em cultivo celular e pela IHQ, demonstrando a sensibilidade da PCR em relação à estes diagnósticos.

De Marez et al. (1999) obtiveram resultado semelhante quando inocularam sete bezerros com oocistos de *N. caninum*. Todos os animais foram positivos pela PCR, entretanto lesões compatíveis às de *N. caninum* por HE não foram visualizadas nos tecidos de alguns animais e tampouco a IHQ detectou o parasita.

Baszler et al. (1999) examinaram 61 fetos bovinos abortados por meio de técnicas histopatológicas (HE e IHQ) e PCR em materiais submetidos a diferentes métodos de conservação para o diagnóstico do *N. caninum*. A IHQ foi considerada a prova de referência.

A PCR detectou o DNA em seis de oito fetos que possuíam lesões compatíveis à neosporose pela HE, mas que foram considerados negativos pela IHQ. Em tecidos emblocados em parafina, a PCR detectou DNA-*N. caninum* em 13 dos 13 fetos positivos (100%) e em um dos 16 negativos (6%) à IHQ. Em tecidos frescos ou congelados, a PCR detectou o DNA do parasita em 10 dos 13 fetos verdadeiramente positivos (77%) e nenhum dos 11 negativos (0%) à IHQ. Os resultados indicaram que a PCR apresentou maior sensibilidade quando comparada com a histopatologia e IHQ.

A PCR também tem sido utilizada para confirmar o isolamento de *N. caninum* a partir de animais infectados naturalmente (KIM et al., 2000; SAWADA et al., 2000). Uma PCR utilizando a sequência DNA genômica Nc5 mais uma molécula competidora sintetizada contendo parte desta seqüência foi empregada para detectar oocistos de *N. caninum* isolados a partir de fezes caninas e para quantificar o número de oocistos isolados (HILL et al., 2001).

Collantes-Fernández et al. (2002) padronizaram uma PCR em tempo real para quantificar a presença do *N. caninum* em fetos bovinos abortados e em camundongos infectados experimentalmente. O limiar de detecção de 0,1 parasita por reação foi determinado. A quantificação pela PCR da carga parasitária em diferentes tecidos do hospedeiro é de grande interesse na investigação da doença e na avaliação de futuras vacinas ou drogas terapêuticas para o controle da infecção pelo *N. caninum*.

Paula (2003) detectou *N. caninum* em fetos bovinos abortados pela técnica da *hemi-nested* PCR. Foram utilizados 32 fetos, sendo que 13 deles vieram acompanhados com soro materno colhido no período pós-aborto. Dos 13 soros das vacas que abortaram somente quatro apresentaram-se positivos e com altos títulos à Imunofluorescência Indireta (IFI \geq 1:25). Dos 32 fetos testados, dez foram positivos à *hemi-nested* PCR, perfazendo uma freqüência de ocorrência de 31,25%.

Vianna (2004), com o objetivo de determinar a ocorrência da transmissão vertical de *Neospora caninum* examinou fetos de 518 novilhas prenhes abatidas em um frigorífico localizado na região de Presidente Prudente/SP. A pesquisa de anticorpos maternos e fetais foi realizada pelo ELISA e a pesquisa do DNA do parasita foi realizado nas vísceras fetais pela PCR. Dentre as novilhas testadas, 103 (19,88%) possuíam anticorpos contra *N. caninum*, enquanto que, para os fetos correspondentes, 38 (7,34%) foram sororreagentes e 65 (12,55%) soronegativos. As 415 novilhas restantes (80,11%), tanto mãe quanto feto não apresentaram anticorpos anti-*Neospora caninum*. A detecção de anticorpos fetais ocorreu a partir do quarto mês de gestação. A técnica da reação da PCR convencional não foi sensível o suficiente para detectar o DNA do parasita nos fetos e mães soropositivos. Com este fato, comprovou-se a necessidade da utilização da *nested* PCR para aumentar a sensibilidade da prova.

A técnica de *nested* PCR também se mostrou muito eficiente em uma pesquisa realizada no México no Estado de Aguascalientes (MEDINA et al., 2006), onde 44 amostras de cérebro de fetos abortados de bovinos leiteiros foram analisadas e comparadas com a histopatologia. A técnica histopatológica considerou apenas 20 (45%) amostras positivas por ocorrência de lesões sugestivas, enquanto que a *nested* PCR considerou positivas 35 (80%) amostras.

D. Detecção de anticorpos

A crescente importância da infecção por *N. caninum* nas diferentes espécies domésticas e selvagens tem conduzido ao desenvolvimento de diversas provas indiretas que utilizam extratos antigênicos e antígenos de taquizoítos de *N. caninum* para detecção de anticorpos (ATKINSON et al., 2000b). A infecção em adultos apresenta-se de forma crônica originando uma resposta imune humoral que pode ser detectada mediante diversas provas que também são utilizadas em fetos autolisados (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003).

Desde a primeira descrição do parasita por Dubey et al. (1988) têm sido empregadas com êxito diferentes provas na detecção de anticorpos específicos de *N. caninum*, o que tem permitido melhorar o diagnóstico, o conhecimento da biologia e a epidemiologia da infecção. A primeira prova que foi utilizada no diagnóstico da infecção foi a IFI e desde então têm sido desenvolvidas numerosas provas de ELISA baseadas em diferentes preparações antigênicas, bem como a aglutinação direta e *western blot* (BJÖRKMAN; UGGLA, 1999; ATKINSON et al., 2000).

As técnicas indiretas apresentam uma elevada sensibilidade e especificidade. Permitem o diagnóstico da infecção *in vivo* nos animais e o estudo da importância dos hospedeiros no ciclo biológico do parasita ou na epidemiologia da infecção (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003).

A limitação do sorodiagnóstico do *Neospora* reside nas discrepâncias existentes entre os protocolos utilizados por diferentes laboratórios, nas propriedades das técnicas empregadas e nas oscilações dos níveis de anticorpos específicos produzidos nos animais infectados (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003).

2.8.2. Diagnóstico diferencial

Entre os agentes de etiologia viral a serem contemplados no diagnóstico diferencial devem ser incluídos a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) e a diarreia viral bovina (BVD). Na IBR, o diagnóstico do feto se confirma mediante a observação de lesões necróticas em diversos órgãos abdominais (especialmente o fígado), isolamento ou identificação do agente etiológico (IFD, IHQ, PCR e microscopia eletrônica). No diagnóstico do aborto pelo vírus da BVD, a confirmação da infecção fetal (detecção do vírus nos tecidos fetais e anticorpos no soro) deve ser completada com a demonstração de lesões macroscópicas e microscópicas (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003).

Entre os agentes de etiologia bacteriana, a *Brucella abortus* deve ser considerada a principal causa de aborto, especialmente em algumas regiões brasileiras e em rebanhos submetidos a determinados tipos de manejo, onde se observa abortamento tardio e retenção de placenta. Em todos os casos deve realizar-se diagnóstico direto, como cultivo específico ou PCR a partir do conteúdo abomasal ou órgãos do feto. Em regiões onde a brucelose tem diminuído sua incidência, a leptospirose é outra enfermidade bacteriana importante. O sorodiagnóstico materno e fetal é de interesse, assim como o isolamento do agente etiológico a partir da urina fetal e a IFI com anticorpos policlonais do rim fetal. A listeriose, assim como os processos originados por outros agentes bacterianos causadores de aborto esporádico devem ser considerados. O aborto micótico causa uma porcentagem importante dos abortos em algumas regiões da Espanha (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003).

Na regiões onde se mantém a monta natural (fazendas de cria extensiva de gado) é necessário incluir o diagnóstico do *Tritrichomonas foetus* e *Campylobacter foetus* var. *venerealis*. Em ambos os casos, o quadro típico é a repetição de cio devida à mortalidade embrionária e fetal prematura. Em aproximadamente 10% das vacas com tricomonose se desenvolve piometra. No caso de aborto, a investigação se realiza mediante o cultivo do agente etiológico a partir do conteúdo abomasal fetal e dos fluidos placentários (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003).

Por último, no diagnóstico diferencial do aborto devem ser consideradas as causas não infecciosas de origem alimentar, iatrogênica, tóxica e genética, ainda que sua demonstração seja mais complicada (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003).

2.9. Prevenção e Controle

A neosporose se apresenta como causa de aborto e seu controle deve objetivar a redução da prevalência da infecção nas explorações com surtos de abortamento, para prevenir sua propagação aos demais suscetíveis evitando tanto a transmissão horizontal como a vertical (ÁLVAREZ-GARCIA, 2003).

As medidas de prevenção e controle da neosporose muitas vezes podem tornar-se economicamente inviáveis ou pouco práticas. Entre elas incluem-se a remoção de fetos abortados, placentas e bezerros mortos no pasto, minimizar a contaminação fecal de água e alimentos pelas fezes de cães e outros canídeos, evitar a introdução de bovinos infectados no rebanho e descarte dos infectados (DUBEY, 2003; INNES et al., 2002). Em rebanhos bovinos com alta soroprevalência, em que o descarte de todos os animais infectados é inviável, sugere-se a reposição paulatina destas por novilhas e matrizes não reagentes, sendo este um critério a ser adotado como seleção para reprodução (WOUDA, 2000).

Também tem sido destacada a importância da sorologia do neonato no diagnóstico da transmissão vertical, sendo que todos os bezerros de vacas infectadas que não se infectaram congenitamente não apresentam anticorpos antes de mamarem o colostro. Deste modo, pode-se eliminar somente a descendência soropositiva congenitamente infectada (THURMOND; ANDERSON; BLANCHARD, 1995).

A transferência de embriões previne a transmissão transplacentária de uma vaca soropositiva para os seus bezerros, se for utilizada uma receptora não infectada (GENNARI; SOUZA, 2002; LANDMANN et al., 2002).

Fármacos que previnem a transmissão do parasita da mãe para o feto bovino são ainda desconhecidos, entretanto pesquisas estão sendo realizadas (DUBEY, 2003).

Até o presente momento, não há uma demonstração concreta que vacinas produzidas com antígenos inativados previnam o aborto e a transmissão vertical em bovinos por *N. caninum* (INNES et al., 2002). Resultados encorajadores têm sido obtidos em camundongos vacinados com parasitas mortos e seus produtos (INNES et al., 2001). Um trabalho realizado na Costa Rica, empregando o uso de vacinas com antígenos mortos de *N. caninum* demonstraram uma redução de 46,2% das taxas de aborto em rebanhos com alta incidência de abortamento (ROMERO; PÉREZ; FRANKENA, 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Biológico (CETEA-IB) e registrado no Protocolo nº 025/07 atendendo aos princípios éticos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (ANEXO 5).

Órgãos e anexos de fetos bovinos abortados ou fetos inteiros, provenientes de diversas fazendas de diferentes Estados Brasileiros foram encaminhados ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico para diagnóstico diferencial de causas de abortamento, no período de janeiro de 2006 a maio de 2008.

Quando a necropsia fetal foi realizada no Laboratório de Anatomia Patológica/ Instituto Biológico, seguiu-se um protocolo para coleta de fragmentos de órgãos (timo, pulmão, coração, fígado, baço, rim e cérebro), fluídos das cavidades torácica e abdominal e conteúdo abomasal. Alguns fetos estavam congelados e outros em estado avançado de autólise. No caso de fetos não necropsiados pela equipe do Instituto Biológico, nem sempre o protocolo de coleta foi seguido e por este motivo não foram encaminhados todos os materiais preconizados, em alguns casos os órgãos estavam congelados e/ou em autólise.

Os órgãos e anexos fetais foram alíquotados e encaminhados para a pesquisa de agentes virais, bacterianos, parasitários e histopatologia, o líquido tóraco-abdominal para pesquisa de anticorpos e o conteúdo abomasal para isolamento bacteriano.

Os tecidos para pesquisa do *N. caninum* foram examinados por meio de técnicas histológicas (coloração hematoxilina/eosina e IHQ) e dois protocolos de *nested* PCR.

3.2. Histotécnica

A. Desidratação, diafanização e emblocagem em parafina dos tecidos

Após a fixação dos tecidos em formalina 10% tamponada, os materiais foram cortados em fragmentos menores. Quando o SNC estava autolizado foi impossível cortá-lo devido ao grau de liquefação e este material foi depositado em cassetes histológicos. Os materiais cortados permaneceram *overnight* em formol 10% tamponado.

Os órgãos foram submetidos a um protocolo de soluções de álcool etílico em concentrações crescentes para desidratação, diafanização pelo xilol e embebição em

parafina (Quadro 2), modificado de PROPHET (1995). Por fim, os órgãos foram colocados em parafina líquida *overnight* e mantidos em estufa 60°C, emblocados em parafina e devidamente identificados.

Quadro 2 – Protocolo de desidratação, diafanização e embebição por parafina de SNC, órgãos fetais e placenta de fetos bovinos abortados, modificado de PROPHET (1995).

Reagente	Tempo (SNC)	Tempo (Órgãos e placenta)
1. Álcool 70% I	1 hora	½ hora
2. Álcool 70% II	1 hora	½ hora
3. Álcool 80% I	1 hora	½ hora
4. Álcool 80% II	1 hora	½ hora
5. Álcool 95% I	2 horas	½ hora
6. Álcool 95% II	<i>overnight</i>	½ hora
7. Álcool absoluto I	2 horas	1 hora
8. Álcool absoluto II	2 horas	1 hora
9. Xilol I	1 hora	1 hora
10. Xilol II	1 hora	1 hora
11. Xilol III	1 hora	1 hora
12. Parafina líquida em estufa 60°C	<i>overnight</i>	<i>overnight</i>

B. Preparo das lâminas histológicas para coloração por H.E.

O tecido emblocado em parafina foi cortado em micrótomo (5 µm de espessura), estendido em banho-maria (60°C) e colocado em lâmina de vidro tratada previamente com albumina, para facilitar a adesão do corte histológico na lâmina. Em seguida, a lâmina foi colocada em estufa 60°C *overnight* e submetida a um protocolo de desparafinização (xilol), hidratação em álcoois e água, coloração pela hematoxilina e eosina, desidratação em álcoois e diafanização em xilol modificado de ALLEN (1995) (Quadro 3).

Para a montagem da lâmina e lamínula foi empregada a resina sintética (ENTELLAN – MERCK). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (ZEISS). A formulação dos corantes Hematoxilina-Eosina pode ser encontrada no ANEXO 1.

Quadro 3 – Protocolo de desparafinização, hidratação, coloração, desidratação e diafanização dos cortes de tecido de SNC, órgãos fetais e placenta de fetos bovinos abortados, modificado de ALLEN (1995).

REAGENTE	TEMPO
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos
Álcool absoluto	2 minutos
Álcool 95%	2 minutos
Álcool 80%	2 minutos
Álcool 70%	1 minuto
Água corrente	Imergir rapidamente
Hematoxilina	30 segundos
Água corrente	Lavar 15 minutos em água corrente
Eosina	2 minutos
Água corrente	Imergir rapidamente
Álcool 70%	Imergir rapidamente
Álcool 80%	1 minuto
Álcool 90%	1 minuto
Álcool absoluto I	5 minutos
Álcool absoluto II	5 minutos
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos

3.3. Técnica de IHQ

As lâminas foram lavadas com detergente líquido (Extran), enxaguadas abundantemente em água corrente e água destilada e mergulhadas em álcool etílico absoluto. Após a secagem das lâminas em estufa 37°C (*overnight*) foram imersas em solução de Ácido Clorídrico 0,1N por 20 minutos, lavadas três vezes em água destilada e foram transferidas em solução de Ácido Acético Glacial 25% em álcool etílico absoluto por 20 minutos. Após a secagem em estufa 37°C as lâminas foram silanizadas pela imersão em solução de 3,3-aminopropyltriethoxysilane - APTS (SIGMA catálogo A3548) 2% em acetona por 2 minutos, passando rapidamente em água destilada e secas em estufa 37°C (*overnight*), tornando-se prontas pra serem utilizadas.

Um bloco de parafina contendo um fragmento de coração de feto caprino inoculado com *N. caninum* (controle positivo) e o anticorpo primário policlonal anti-*N. caninum* foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Milton McAllister, do Departamento de Patobiologia da Escola de Medicina Veterinária da Universidade de Illinois, EUA. Esse mesmo fragmento de coração foi usado como controle negativo quando se suprimiu o anticorpo primário.

O fragmento de coração emblocado em parafina, que serviu de controle positivo para IHQ foi produzido pela inoculação intravenosa da cepa *NC-Illinois* de *N. caninum* em uma cabra prena. A infecção experimental causou doença e óbito neste indivíduo. O exame histológico revelou multiplicação de *N. caninum* no tecido fetal, incluindo o coração. Este órgão foi fixado em formalina 10% tamponada e vários fragmentos foram processados para emblocagem em parafina.

O antissoro de *N. caninum* foi produzido pela inoculação de 500.000 taquizoítos vivos da cepa *NC-beef* na região subcutânea de coelho da raça Neozelandesa Branca. O coelho não demonstrou quaisquer sintomas de enfermidade. Após 34 dias, outros 1.000.000 taquizoítos foram inoculados por via subcutânea e após 22 dias o coelho foi anestesiado, o sangue removido por punção cardíaca, o soro resultante foi aliqotado e liofilizado.

No momento do uso, o soro liofilizado foi diluído em 1 mL de água ultra-pura, aliqotado em eppendorfs e congelado em freezer – 80°C. Para a avaliação da melhor titulação do soro anti-*N. caninum* a ser utilizada na prova de IHQ, este foi descongelado e diluído em PBS nas concentrações 1:1000, 1:2.000, 1:5.000 e 1:10.000. A diluição que apresentou melhor reação foi 1:2.000 sendo utilizada na reação de IHQ.

Para a técnica de IHQ foi seguido um protocolo modificado de Pescador 2005. Os tecidos emblocados em parafina foram cortados em micrótomo com espessura de 5 µm e fixados em lâminas de vidro, previamente tratadas com APTS. As lâminas foram colocadas em estufa por 1 hora em temperatura entre 55 e 60°C. Subseqüentemente, os cortes foram diafanizados em dois banhos de xilol de 10 minutos cada, posteriormente hidratados em

concentrações decrescentes de álcool etílico, na qual passaram uma vez em álcool absoluto (cinco minutos), uma vez em álcool 95% (cinco minutos), uma vez em álcool 80% (três minutos), uma vez em álcool 70% (2 minutos) e uma vez em água destilada (2 minutos).

Realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena por incubação do material em solução a 3% de peróxido de hidrogênio 30 vol., álcool metílico e PBS, durante 20 minutos, em temperatura ambiente (18 a 22°C). Posteriormente, a lâmina foi lavada em solução PBS 0,01M (pH 7,2) por cinco minutos, com três repetições.

A recuperação antigênica foi realizada por meio da irradiação em forno microondas de uso doméstico (800 watts) durante 10 minutos. Durante essa etapa, as lâminas ficaram submersas em 100 mL de tampão citrato pH 6.0 (ANEXO 2) e logo após o esfriamento do material por 20 minutos foram realizados três lavagens de cinco minutos cada em PBS, sob agitação (ANEXO 2). Para redução da inespecificidade da reação foi colocada nas lâminas uma solução de leite em pó desnatado a 10% em PBS por 30 minutos.

Após esta etapa foi utilizado o anticorpo primário anti-*Neospora caninum* diluído a 1:2000 e incubado por 30 minutos em câmara úmida à temperatura de 37°C. Na seqüência realizaram-se três lavagens com PBS (cinco minutos cada, sob agitação) e as lâminas foram incubadas por 30 minutos com anticorpo secundário biotilado e streptavidina conjugada com peroxidase a uma diluição de 1:200 (VECTOR-PK-6101-VECTASTAIN® ELITE ABC KIT - *Rabbit IgG*), em câmara úmida à temperatura de 37°C, com mais três lavagens de cinco minutos cada, em PBS, sob agitação.

Em seguida os cortes foram incubados por 30 minutos em câmara úmida com o Kit ABC a uma diluição de 1:200 (VECTOR-PK-6101-VECTASTAIN® ELITE ABC KIT) finalizando-se o processo com mais três lavagens de cinco minutos cada em PBS, sob agitação.

Para a visualização e revelação da reação utilizou-se o cromógeno DAB (Data Sheet – Liquid DAB Substrate Pack, Concentrated – BIOGENEX) por 5-10 minutos, conforme a instrução do fabricante. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada. Prosseguiu-se com a contracoloração em Hematoxilina por 10 segundos, lavagem em água corrente e desidratação. Esta última etapa consistiu em uma passagem em álcool etílico 70% (1 minuto), álcool etílico 80% (1 minuto), álcool etílico 95% (1 minuto), álcool etílico absoluto I e II (cinco minutos cada), xilol I e II (cinco minutos cada). As lâminas foram cobertas com resina sintética (ENTELLAN – MERCK) e lamínulas histológicas.

3.4. Cultivo e Manutenção da cepa padrão de *N. caninum*

Como controle positivo da PCR foi utilizada a cepa padrão NC-1 de *N. caninum* mantida no Laboratório de Vírus de Bovídeos (LVB).

O cultivo e manutenção dos taquizoítos de *Neospora caninum* foi em células VERO CCL-81 mantidas em meio de cultura Mínimo Essencial de Eagle (MEM) acrescido de soro fetal bovino 10% e incubadas a 37°C em garrafas de 25 cm³. Os taquizoítos de *N. caninum* foram mantidos por passagens contínuas em cultura de células VERO CCL-81, no Laboratório de Vírus de Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo.

Realizou-se a inoculação de *N. caninum* em uma monocamada pré-formada de células VERO e os repiques sucessivos foram realizados quando 80% ou mais da monocamada estava rompida. Com o auxílio de um raspador de células, o restante da monocamada celular foi liberado da garrafa e todo o seu conteúdo, aproximadamente 8,0 mL foi homogeneizado com uma agulha de calibre 27G, para o rompimento das células que ainda abrigavam taquizoítos. Meio mililitro desse material foi inoculado em uma nova garrafa de células pré-formada e acrescidos de 7,5 mL de meio MEM contendo 1% de antibiótico (ANEXO 3). O restante foi congelado em nitrogênio líquido (20% soro eqüino e 10% de DMSO-dimetilsulfóxido) utilizado para controle positivo da PCR.

3.5. Preparo das amostras de órgãos e anexos fetais para PCR

Em cabine de fluxo laminar, foram pesadas amostras individuais de cérebro (2 g), placenta (2 g), pool de fígado e coração (2 g no total) e pool de órgãos – baço, rim, pulmão, fígado, coração (2 g no total). Cada amostra foi macerada em gral com auxílio de pistilo e adição de areia estéril com 8 mL de Meio Mínimo Essencial (Eagle -MEM – CULTILAB), sem soro fetal bovino, com 1% de mistura de antibióticos. Cada macerado foi colocado em tubo de ensaio e acrescidos 2 mL de clorofórmio, agitado em vórtex e posteriormente, centrifugado durante 10 min a 1.500 x g. Após o término da centrifugação do material, o sobrenadante foi armazenado em freezer a -20°C até a realização do teste de PCR.

3.6. Reação da Polimerase em Cadeia

A extração de DNA foi realizada com Kit comercial (*Wizard Genomic DNA Purification Kit* - PROMEGA), segundo instruções do fabricante. Em seguida adicionou-se ao sedimento 100 µL de solução de hidratação de DNA, que foi aquecido por 1 hora a 64°C. As amostras foram mantidas em freezer a -20°C até a realização da *nested* PCR.

Foram utilizados dois *primers* para a detecção do *N. caninum* por *nested* PCR (PLUS) - segundo HUGHES et al. (2006) baseado na seqüência Nc5 do DNA genômico – e

nested PCR (JB) segundo BARRATT et al. (2008), baseado na seqüência ITS1 do DNA ribossomal (Quadro 4).

Quadro 4 - Descrição dos *primers* utilizados nas diferentes reações de *nested* PCR para *N. caninum*.

AUTOR	Região	NOME (orientação)	SEQUENCIA	Produto
HUGHES et al. (2006) (<i>nested</i> PCR PLUS)	gene Nc5	NP21 PLUS (<i>forward</i>)	5' GGGTGTGCGTCCAATCCTGTAAC 3'	337pb
		NP6 PLUS (<i>reverse</i>)	5' CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT 3'	
		NP6 (<i>forward</i>)	5' CAGTCAACCTACGTGTTAT 3'	227pb
		NP7 (<i>reverse</i>)	5' GGGTGAACCGAGGGAGTTG 3'	
BARRATT et al. (2008) (<i>nested</i> PCR JB)	gene do DNA	JB1 (<i>forward</i>)	5' AGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG 3'	500pb
		JB2 (<i>reverse</i>)	5' GAGCCAAGACATCCATTGC 3'	
	ribossomal ITS1	SF1 (<i>forward</i>)	5' CCCTGTGAGTTGTATCGCCTTC 3'	250pb
		SF2 (<i>reverse</i>)	5' TCTCTTCCCTCAAACGCTATCC 3'	

A. Amplificação de DNA de *N. caninum*

- Utilizando *primers* e condições descritas por HUGHES et al. (2006) e alterações feitas após padronização no LVB

Para o mix da PCR foram utilizados 5 µL do DNA da amostra num volume total de 20 µL de tampão do kit comercial PCR Master Mix™ Promega (M7502) e 0,2 µM de cada *primer*.

As amplificações descritas por HUGHES et al. (2006) e alterações feitas após padronização no LVB podem ser visualizadas nos quadros 5 e 6.

Quadro 5: Primeira amplificação para *N. caninum* descrita por HUGHES et al. (2006) e alterações feitas após padronização no LVB.

1ª Amplificação	HUGHES et al. (2006)		Modificada	
	Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo	Temperatura (°C)
1 ciclo	95	05 min	95	05 min
40 ciclos	94	40 seg	94	01 min
	63	40 seg	60	01 min
	72	01 min e 10 seg	72	01 min
1 ciclo	72	10 min	72	10 min
Hold	4	infinito	4	∞

Quadro 6: Segunda amplificação para *N. caninum* descrita por HUGHES et al. (2006) e alterações feitas após padronização no LVB.

2ª Amplificação	HUGHES et al. (2006)		Modificado	
	Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo	Temperatura (°C)
1 ciclo	95	05 min	95	05 min
40 ciclos	94	40 seg	94	01 min
	56	40 seg	60	01 min
	72	01 min e 10 seg	72	01 min
1 ciclo	72	10 min	72	10 min
Hold	4	∞	4	∞

- Utilizando *primers* e condições descritas por BARRATT et al. (2008) e alterações feitas após padronização no LVB.

As reações foram compostas de 5 µL do DNA da amostra num volume total de 20 µL de tampão do kit comercial PCR Master Mix™ PROMEGA (M7502) e 0,5 µM de cada *primer*.

As amplificações descritas por HUGHES et al. (2006) e alterações feitas após padronização no LVB podem ser visualizadas nos quadros 7 e 8.

Quadro 7: Primeira amplificação para *N. caninum* descrita por BARRAT et al. (2008) e alterações feitas após padronização no LVB.

BARRATT et al. (2008)			Modificado		
Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo	Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
25 ciclos	95	05 min	1 ciclo	95	05 min
	94	01 min	25 ciclos	94	01 min
	57	01 min		57	01 min
	72	01 min		72	01 min
1 ciclo	72	5 min	1 ciclo	72	05 min
Hold	4	∞	Hold	4	∞

Quadro 8: Segunda amplificação para *N. caninum* descrita por BARRAT et al. (2008) e alterações feitas após padronização no LVB.

BARRATT et al. (2008)			Modificado		
Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo	Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
30 ciclos	95	05 min	1 ciclo	95	05 min
	94	01 min	25 ciclos	94	01 min
	60	01 min		60	01 min
	72	01 min		72	01 min
1 ciclo	72	05 min	1 ciclo	72	05 min
Hold	4	∞	Hold	4	∞

B. Eletroforese em gel de agarose

O produto de cada amplificação foi aplicado em gel de agarose a 2%, preparado em tampão TAE 1X (LGC®) e submetido à eletroforese com uma voltagem constante de 100 V por 1 hora. Também foram incluídos a cada eletroforese os controles positivo (contendo DNA do taquizoíto) e negativo (água ultra-pura). A presença de *amplicons* foi evidenciada após coloração com brometo de etídio (5µg/mL) e visualização em luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos de DNA foi comparado com um padrão de peso molecular de 100 pb (DNA *ladder* de 100 pb – FERMENTAS®).

O limiar de detecção da PCR foi de 10 taquizoítos/mL.

3.7. Análise estatística

A concordância entre as provas diagnósticas de IHQ, *nested* PCR PLUS e *nested* PCR JB foi calculada pelo índice *kappa*, com nível de confiança de 95% utilizando o programa estatístico WIN Episcopo versão 2.0 (2004). O grau de concordância das margens dos valores do índice *kappa* podem ser consultados no quadro 9.

Quadro 9 – Margens de valores para classificar o grau de concordância do índice *kappa*.

<i>Kappa</i>	Grau de concordância
< 0	Ausente
0 - 0,2	Insignificante
0,2 - 0,4	Baixo
0,4 - 0,6	Moderado
0,6 - 0,8	Bom
0,8 - 1	Muito bom

4. RESULTADOS

Entre janeiro de 2006 a maio de 2008, 105 casos de abortamento de diversas regiões brasileiras (Anexo 4) foram encaminhados ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Animal – Instituto Biológico/SP para diagnóstico diferencial. Nem sempre foram encaminhados todos os órgãos e anexos fetais.

As evidências macroscópicas mais comuns observadas nas amostras foram graus variados de autólise, caracterizados pela embebição hemoglobínica nos órgãos e enfisema cadavérico. Alguns fetos mumificados também foram analisados. A presença de líquido nas cavidades torácica e abdominal foi achado freqüente. Na maioria dos fetos encaminhados o cérebro apresentou consistência líquida ou semi-líquida, dificultando a obtenção de tecido para análise histológica e IHQ.

4.1. Achados microscópicos

O abortamento foi caracterizado como infeccioso quando foram encontradas lesões em algum tecido ou anexo fetal, compostas por células inflamatórias mononucleares e/ou polimorfonucleares quando utilizados métodos de H.E.

As lesões sugestivas de infecção por protozoários foram constituídas basicamente por células inflamatórias mononucleares observadas principalmente no pulmão, coração, rim, fígado e SNC. As lesões histológicas e sua ocorrência estão relacionadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Alterações histológicas mais freqüentes em amostras encaminhadas ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Animal do Instituto Biológico, analisadas pelo método de HE.

Lesão	Fígado (n=90)	Rim (n=84)	Pulmão (n=88)	Coração (n=70)	SNC (n=68)	Placenta (n=22)
Necrose	1 (1,1%)	16 (19,0%)	-	-	11 (16,1%)	-
Inf. MN ^a	58 (64,4%)	55 (65,5%)	61 (68,3%)	53 (75,7%)	38 (55,9%)	11 (50,0%)
Inf. PMN ^b	1 (1,1%)	-	4 (4,5%)	3 (4,3%)	3 (4,4%)	4 (18,2%)
Autólise	13 (14,4%)	18 (21,4%)	9 (10,2%)	5 (7,1%)	6 (8,8%)	4 (18,2%)

^a: infiltrado de células inflamatórias mononucleares; ^b: infiltrado de células inflamatórias polimorfonucleares

No coração, infiltrados inflamatórios não supurativos foram encontrados ao longo do epicárdio e miocárdio. Estes infiltrados eram multifocais ou difusos e estendiam-se ao longo do epicárdio em casos mais severos (Figura 1).

No SNC as lesões histológicas observadas caracterizaram-se por encefalite multifocal, de intensidade variada, composta por infiltrados inflamatórios mononucleares e células da glia. Em casos mais severos, freqüentemente foram observados focos de necrose infiltrado inflamatório mononuclear (Figura 2).

Lesões inflamatórias não-supurativas foram também observadas no fígado, rim (glomerulonefrite não-supurativa multifocal, pneumonia intersticial e pleuropneumonia não-supurativa).

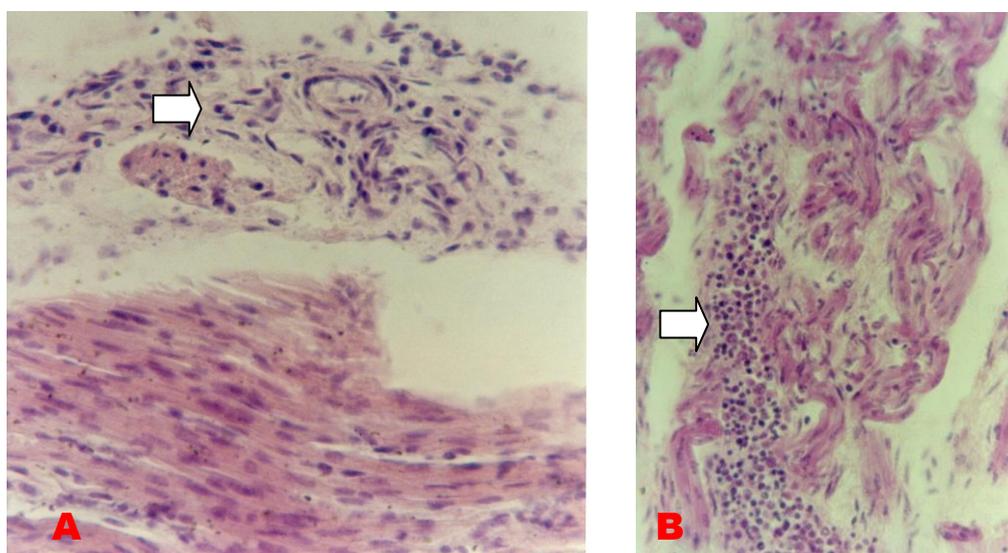


Figura 1 - Feto bovino abortado. Coração (A e B). Em A observa-se epicardite não-supurativa (HE, obj. 40). Em B observa-se miocardite não-supurativa focal (HE, obj 40).

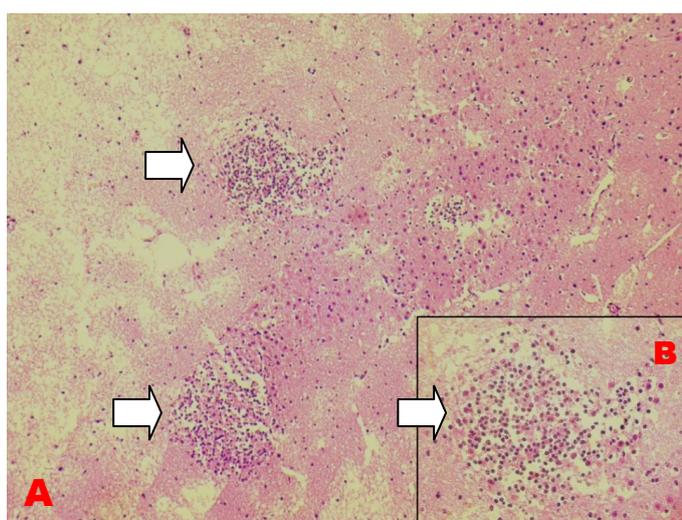


Figura 2 - Feto bovino abortado. SNC. Em A, observa-se encefalite não-supurativa com pequenos focos de necrose com células inflamatórias mononucleares e células da glia (HE, obj 20). Em B, observa-se a encefalite necrosante não-supurativa focal (HE, obj 40).

4.2. Achados imunoistoquímicos e PCR

Todos os controles positivos das reações de IHQ revelaram a presença de taquizoítos de *N. caninum* (Figura 3) e em todos os controles negativos não ocorreu essa marcação.

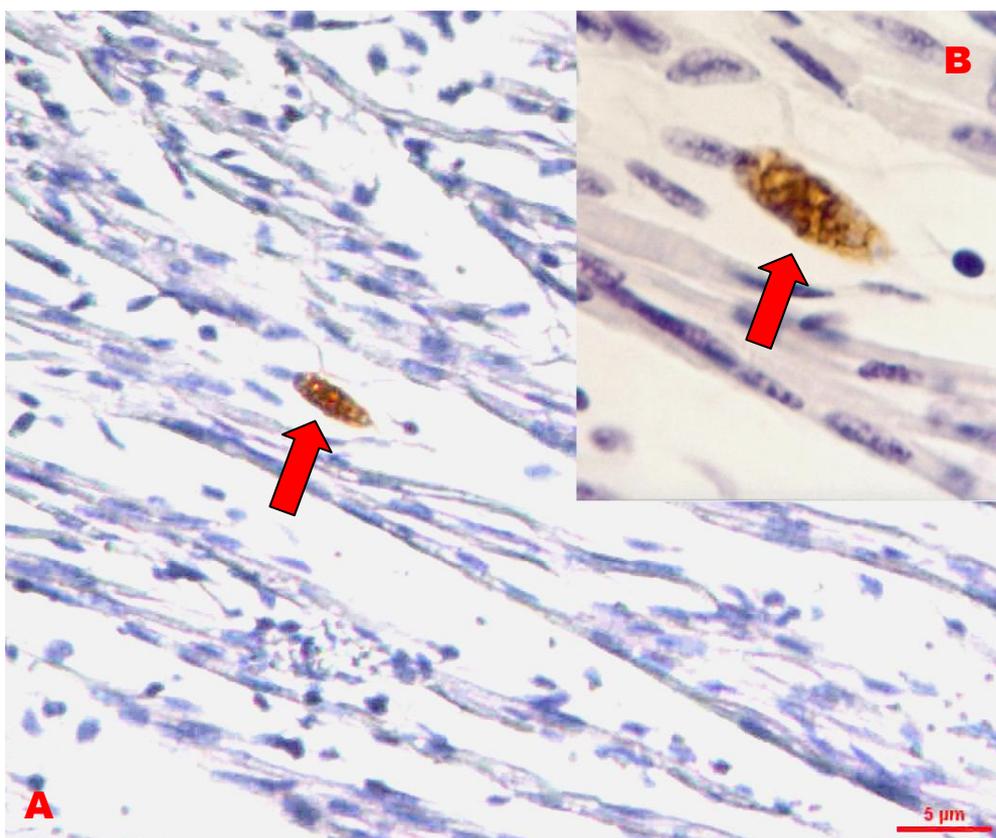


Figura 3 - Coração de feto de uma cabra inoculada com *N. caninum* utilizado como controle positivo da reação de IHQ. Em A observa-se a presença de taquizoítos (IHQ, obj. 40x), em B visualiza-se com maior detalhe os taquizoítos (obj 100x).

O resultado positivo na IHQ sob o total de órgãos examinados com e sem lesão histopatológica pela HE encontra-se na tabela 2, sendo observada maior positividade no SNC, placenta e coração. Nos casos em que foi verificada lesão no SNC 10,52% (4/38) foram positivos na IHQ (Figuras 4 e 5). Nas amostras de placenta com lesão histopatológica 9,1% (1/11) foram positivas pela IHQ. No coração observou-se 3,77% (2/53) dos casos positivos na IHQ com lesão histopatológica, enquanto que houve um caso positivo na IHQ sem lesão histopatológica pela HE (5,88%).

Tabela 2 – Ocorrência de *N. caninum* em SNC e órgãos de fetos bovinos abortados, positivos à IHQ, com e sem lesões histopatológicas pela HE.

Órgãos	Positivo IHQ		Total de órgãos examinados
	Com lesão HE	Sem lesão HE	
SNC	10,52% (4/38)*	0,0% (0/30)	68
Placenta	9,1% (1/11)	0,0% (0/11)	22
Coração	3,77% (2/53)	5,88% (1/17)	70
Rim	1,81% (1/55)*	0,0% (0/29)	84
Fígado	1,72% (1/58)	0,0% (0/32)	90

*SNC e Rim do mesmo feto positivo na IHQ

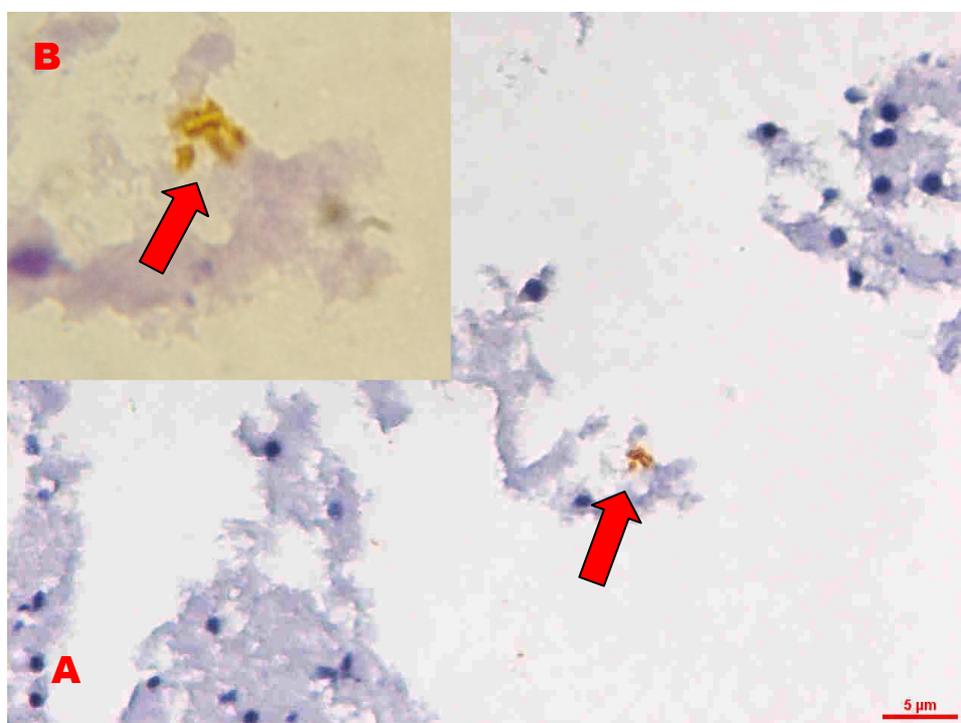


Figura 04 - Presença de taquizoítos no neurópilo do SNC de feto bovino abortado visualizado pela IHQ e positivo na *nested* PCR PLUS (amostra 11) (IHQ, A: obj 40x e B: obj 100x).

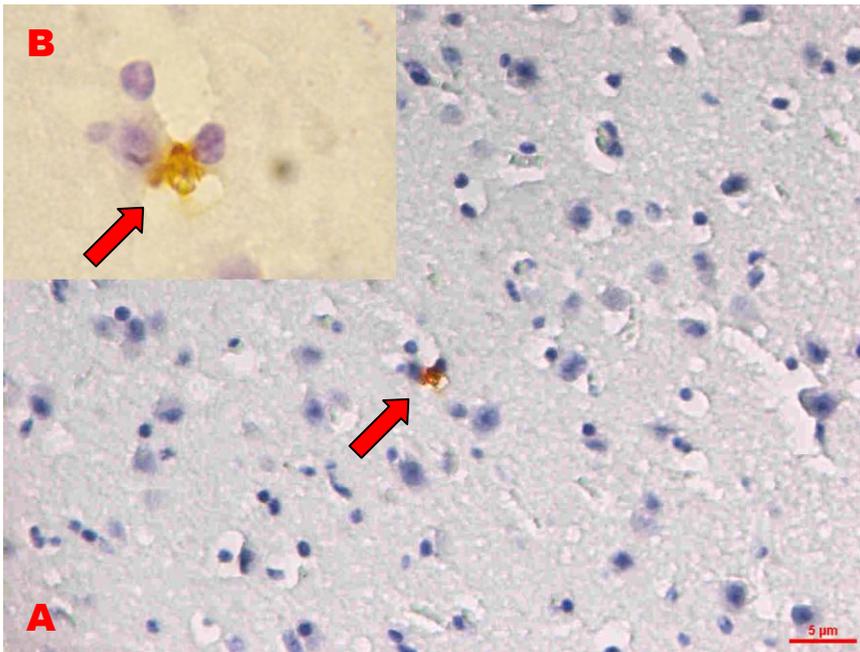


Figura 5 - Presença de taquizoítos no neurópilo do SNC de feto bovino abortado visualizado pela IHQ (amostra 01) (IHQ, A: obj 40x e B: obj 100x).

As reações de *nested* PCR PLUS e *nested* PCR JB estão representadas nas Figuras 6 e 7, respectivamente. Foram empregados controles positivo (células VERO CCL-81 infectadas com taquizoítos da cepa NC-1 de *N. caninum* na concentração de 3×10^6) e negativo (água ultra-pura), e marcador de pares de bases (DNA ladder de 100 pb) em todas as corridas de eletroforese.

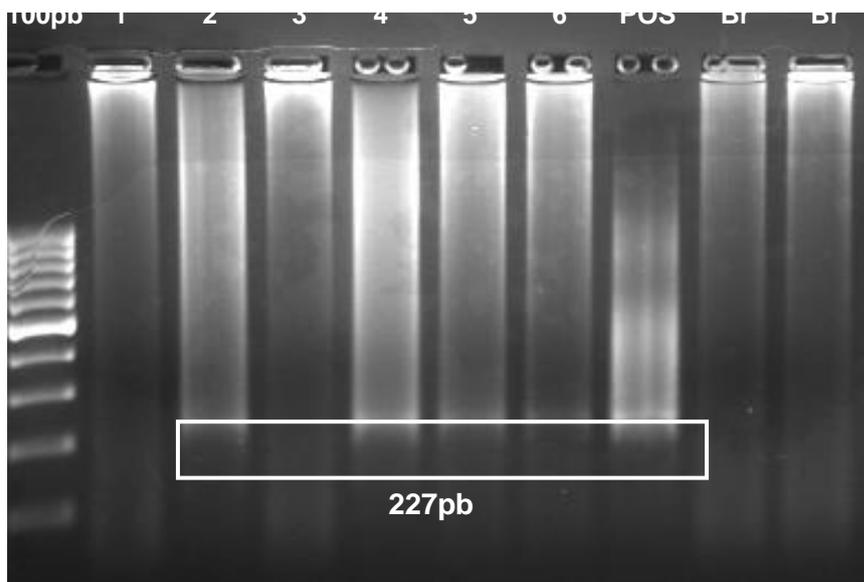


Figura 6 - *Nested* PCR PLUS de amostras de abortamento bovino. Amostras negativas: canaletas 1 e 3. Amostras positivas: canaleta 2 (amostra 11-cérebro), canaleta 4 (amostra 64-coração+fígado) canaleta 5 (amostra 96-cérebro), canaleta 6 (amostra 97-coração+fígado), controle positivo (POS) e controle negativo (Br) da reação.

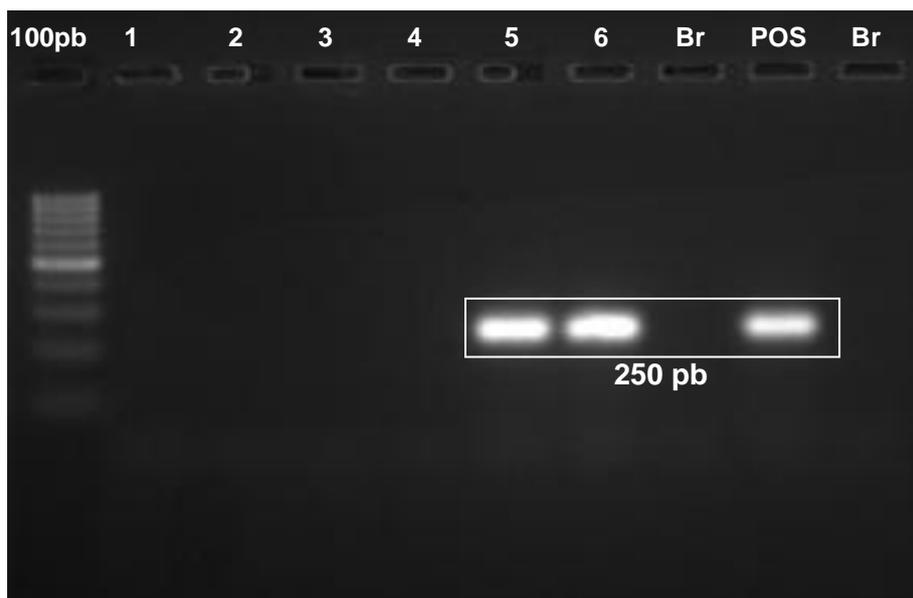


Figura 7 - *Nested* PCR JB de amostras de abortamento bovino. Amostras negativas: canaletas 1, 2, 3 e 4. Amostras positivas: canaleta 5 (amostra 96-cérebro), canaleta 6 (amostra 97-coração+fígado), controle positivo (POS) e controle negativo (Br) da reação.

A análise do SNC pela *nested* PCR PLUS revelou 22,22% (16/72) casos positivos e 6,94% (5/72) pela *nested* PCR JB. Das 20 placentas analisadas 4 (20,00%) foram positivas pela *nested* PCR PLUS e 1 (5,00%) pela *nested* PCR JB. A análise conjunta coração/fígado diagnosticou pela *nested* PCR PLUS 16,32% (8/49) casos positivos e 4,08% (2/49) pela *nested* PCR JB. A análise do *pool* de órgãos diagnosticou pela *nested* PCR PLUS 10,93% (7/64) casos positivos e 3,12% (2/64) pela *nested* PCR JB (Tabela 3).

Tabela 3 - Frequência de positividade para *N. caninum* observada em órgãos e placenta pela reação de *Nested* PCR (PLUS e JB) realizadas em amostras de abortamento bovino.

Órgãos	<i>Nested</i> PCR PLUS		<i>Nested</i> PCR JB	
	%	Positivo/Total	%	Positivo/Total
SNC	22,22	(16/72)	6,94	(5/72)
Placenta	20,00	(4/20)	5,00	(1/20)
Coração e Fígado	16,32	(8/49)	4,08	(2/49)
<i>Pool</i> de órgãos	10,93	(7/64)	3,12	(2/64)

O cálculo da taxa de infecção fetal pelo *N. caninum* para cada técnica individualmente foi para IHQ 8,57% (9/105), para *nested* PCR PLUS 20,95% (22/105) e *nested* PCR JB 6,66% (7/105). Estes resultados podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4 - Positividade das amostras totais de abortamento infeccioso, para cada técnica, individualmente (IHQ, *nested* PCR PLUS e *nested* PCR JB).

Amostras	IHQ	<i>Nested</i> PCR	<i>Nested</i> PCR
		PLUS	JB
Positivas	9 (8,57%)	22 (20,95%)	7 (6,66%)
Negativas	96 (91,43%)	83 (79,05%)	98 (93,34%)
Total	105 (100%)	105 (100%)	105 (100%)

Os valores de positividade das amostras e o cálculo da concordância pelo índice *kappa*, em tabelas de contingência 2 x 2 estão apresentadas a seguir, para *nested* PCR PLUS e IHQ (Tabela 5), *nested* PCR JB e IHQ (Tabela 6) e *nested* PCR PLUS e *nested* PCR JB (Tabela 7).

Tabela 5 - Índice *kappa* para verificar a concordância entre a *nested* PCR PLUS e IHQ realizadas para o diagnóstico de *N. caninum* em amostras de abortamento bovino.

<i>Nested</i> PCR PLUS	IHQ		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	6 *	16	22
	5,70%	15,30%	21%
Negativo	3	80 *	83
	2,80%	76,20%	79%
Total	9	96	105
	8,50%	91,50%	100%
Índice <i>kappa</i>		0,30*	

* baixo grau de concordância estatística em nível de 5%, entre as técnicas avaliadas, pelo índice *kappa*.

Tabela 6 – Índice *kappa* para verificar a concordância entre a *nested* PCR JB e IHQ realizadas para o diagnóstico de *N. caninum* em amostras de abortamento bovino.

<i>Nested</i> PCR JB	IHQ		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	2 *	5	7
	2,00%	4,70%	6,70%
Negativo	7	91*	98
	6,70%	86,60%	93,30%
Total	9	96	105
	8,60%	91,40%	100%
Índice <i>kappa</i>		0,19 *	

* insignificante grau de concordância estatística em nível de 5%, entre as técnicas avaliadas, pelo índice *kappa*.

Tabela 7 – Índice *kappa* para verificar a concordância entre a *nested* PCR PLUS e *nested* PCR JB realizadas para o diagnóstico de *N. caninum* em amostras de abortamento bovino.

<i>Nested</i> PCR PLUS	<i>Nested</i> PCR JB		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	6 *	16	22
	5,70%	15,30%	21%
Negativo	1	82 *	83
	1%	78%	79%
Total	7	98	105
	6,70%	93,30%	100%
Índice <i>kappa</i>		0,35 *	

* baixo grau de concordância estatística em nível de 5%, entre as técnicas avaliadas, pelo índice *kappa*.

A tabela 8 apresenta um resumo dos valores de índice *kappa* entre as diferentes provas, revelando baixo grau de concordância entre a IHQ e *nested* PCR PLUS, entre a *nested* PCR JB e *nested* PCR PLUS e insignificante concordância entre a IHQ e *nested* PCR JB.

Tabela 8 - Concordância expressa pelo índice *kappa* entre testes diagnósticos de *N. caninum* em amostras de abortamento bovino.

Teste	Teste comparativo	Índice <i>kappa</i>	Grau		
			Concordância <i>kappa</i>	IC <i>kappa</i>	erro
IHQ	<i>nested</i> PCR JB	0,19	Insignificante	-0,105 a 0,483	0,15
IHQ	<i>nested</i> PCR PLUS	0,30	Baixo	0,079 a 0,526	0,114
Nested PCR JB	nested PCR PLUS	0,35	Baixo	0,126 a 0,57	0,113

*significância estatística ao nível de 5%

A taxa de infecção fetal pelo *N. caninum*, representada pela positividade em pelo menos uma das técnicas diagnósticas (IHQ, *nested* PCR JB, *nested* PCR PLUS) foi 24,76% (26/105). Estes resultados podem ser observados na tabela 9.

Tabela 9 – Taxa de infecção fetal pelo *N. caninum* representada pela positividade em pelo menos uma das técnicas diagnósticas nas amostras encaminhadas no período de janeiro de 2006 a maio de 2008.

Diagnóstico direto	Total Positivos/técnica	% Positivos Total examinado
IHQ +	3	2,86
<i>Nested</i> PCR PLUS +	12	11,43
<i>Nested</i> PCR JB +	1	0,95
IHQ e <i>nested</i> PCR PLUS +	4	3,81
IHQ e <i>nested</i> PCR JB +	0	0,00
<i>Nested</i> PCR PLUS e JB +	4	3,81
IHQ e <i>nested</i> PCR PLUS e <i>nested</i> PCR JB +	2	1,90
Total positivos	26	24,76
Total amostras avaliadas	105	100,0

Com relação à idade gestacional, na maioria das vezes o feto já havia sido necropsiado e/ou não havia qualquer informação da idade fetal nas fichas clínicas de encaminhamento dos materiais. Nos casos em que foi informada a idade, a maioria se situava na faixa etária entre quatro a seis meses de gestação (Tabela 10).

Tabela 10 – Faixas etárias dos fetos abortados, informadas na ficha de encaminhamento dos materiais fetais e positividade a qualquer um dos testes diagnósticos (IHQ e *nested* PCR PLUS e *nested* PCR JB).

Faixas etárias dos fetos abortados	Total Positivos (%)	N° total fetos examinados
1-3 meses	1 (3,84%)	3
4-6 meses	7 (26,92%)	20
7-9 meses	3 (11,53%)	10
Natimorto	0 (0,0%)	3
Não informado	15 (57,69%)	69
Total	26 (100,0%)	105

Teste Exato de Fischer entre faixas etárias não foi estatisticamente significativo a um nível 5%

As amostras eram oriundas de rebanhos bovinos de 13 Estados Brasileiros. A maior parte dos materiais era proveniente do Estado de São Paulo – 62,85% (66/105), onde também foi verificada a maior taxa de positividade para o *N. caninum* – 12,38% (13/105) para qualquer uma das técnicas diagnósticas (IHQ, *nested* PCR JB e *nested* PCR PLUS) (Tabela 11).

Tabela 11 - Origem das amostras de abortamento quanto aos Estados associadas com a positividade ao *N. caninum* em pelo menos uma das técnicas diagnósticas (IHQ, *nested* PCR PLUS e *nested* PCR JB), considerando as amostras encaminhadas e as positivas, em relação ao total geral.

ESTADOS	Amostras encaminhadas (% total)	Amostras positivas (% total)
Alagoas	1 (0,95%)	1 (0,95%)
Bahia	1 (0,95%)	0 (0,00%)
Ceará	1 (0,95%)	0 (0,00%)
Goiás	11 (10,47%)	4 (3,81%)
Minas Gerais	12 (11,42%)	3 (2,86%)
Mato Grosso	2 (1,90%)	0 (0,00%)
Mato Grosso do Sul	4 (3,80%)	2 (1,90%)
Pernambuco	1 (0,95%)	0 (0,00%)
Paraná	1 (0,95%)	1 (0,95%)
Rio de Janeiro	2 (1,90%)	2 (1,90%)
Rio Grande do Norte	1 (0,95%)	0 (0,00%)
Rondônia	1 (0,95%)	0 (0,00%)
São Paulo	66 (62,85%)	13 (12,38%)
Não informado	1 (0,95%)	0 (0,00%)
TOTAL	105/105 (100,00%)	26/105 (24,76%)

5. DISCUSSÃO

Um diagnóstico pressuposto apenas em lesões histológicas deve ser feito com cautela, pois outro protozoário como *Sarcocystis* spp pode causar lesões similares em fetos abortados (JENKINS et al., 2002). Segundo Dubey, Lindsay e Speer (1998), raramente taquizoítos ou cistos de *N. caninum* são suficientemente numerosos para serem encontrados em todos os cortes histológicos provenientes de um mesmo animal, justificando a utilização de provas específicas e sensíveis na detecção do parasita.

No presente estudo associou-se as técnicas diagnósticas: exame histopatológico por HE e IHQ, e reação de *nested* PCR (JB e PLUS) em 105 amostras de abortamento bovino para o diagnóstico de *N. caninum*.

A histopatologia foi empregada como triagem inicial na indicação de abortamento infeccioso e observou-se predominantemente infiltrado inflamatório mononuclear nos órgãos e placenta (Tabela 1). Por não ser específica, a histopatologia pela coloração HE deve ser interpretada como complementar aos testes que identificam o agente causal, como a IHQ e *nested* PCR.

A IHQ permite a visualização de taquizoítos em cortes histológicos, pois a observação destes pela coloração de HE é difícil. O *N. caninum* causa infiltrado inflamatório mononuclear em diversos órgãos e necrose focal com infiltrado mononuclear no SNC (PESCADOR et al., 2007). No presente estudo, dos 38 casos de abortamento em que foi verificada lesão histológica no SNC quatro foram positivos na IHQ (10,52%). Estes resultados estão de acordo com demais trabalhos que revelaram ser o SNC o órgão de eleição para a detecção do parasita, porque é o mais afetado e qualquer parte deste pode ser utilizada na análise histológica (Tabela 2) (DUBEY; LINDSAY, 1996; DUBEY, 2003; PESCADOR et al., 2007). A placenta também foi considerada importante na avaliação por meio da IHQ, tendo sido encontrado 9,1% (1/11) casos (Tabela 2).

A positividade pela IHQ no coração foi observada em dois de 53 (3,77%) materiais com miocardite não supurativa, enquanto que em apenas um caso positivo na IHQ não foi observado qualquer tipo de lesão histopatológica no fragmento analisado (Tabela 2), comprovando a transmissão vertical do parasita (DUBEY, 2003; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Lesões não supurativas também estavam presentes no pulmão, fígado, rim e placenta indicando que a infecção por *N. caninum* é sistêmica e pode atingir vários tecidos e anexos dos fetos bovinos infectados, estando de acordo com o relato de Corbellini et al.

(2002) e Pescador et al. (2007), que verificaram lesões não supurativas em diversos órgãos de fetos positivos à IHQ. Em todas as amostras de SNC positivas nas técnicas de *nested* PCR PLUS e *nested* PCR JB foram observadas lesões histopatológicas (ANEXO 4).

Vários métodos baseados em PCR têm sido desenvolvidos nos últimos anos, visando à região ITS1 do parasito e a seqüência Nc5 específica de *Neospora*, com diferentes modificações, como *nested* ou *hemi-nested* PCR, na intenção de aumentar a sensibilidade e especificidade da técnica, com diferentes resultados (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2002).

Devido à similaridade do *N. caninum* com outros coccídios, como *T. gondii* e *Hammondia heydorni*, a caracterização molecular tem sido realizada com o seqüenciamento dos ITS1 do DNA, permitindo discriminar a variabilidade inter e intra-espécie. O estudo de Gondim et al. (2004b) demonstrou que o sequenciamento dos ITSs pode ser aplicado como um instrumento complementar na identificação das espécies e cepas de *Neospora*. Várias publicações revelaram que a região ITS1 é um bom marcador para distinguir os membros da família *Sarcocystidae* (HOLMDAHL; MATTSON, 1996; PAYNE; ELLIS, 1996, HOMAN et al., 1997; MONTEIRO, 2006; BARRATT et al., 2008). O presente trabalho empregou a região ITS1 do DNA, por garantir a especificidade do teste molecular na detecção de *N. caninum* e a análise do BLAST confirmou que os *primers* da região ITS1 empregados na *nested* PCR JB são específicos, não ocorrendo reação cruzada com outros coccídeos.

A *nested* PCR JB detectou no SNC 6,94% (5/72) amostras positivas (Tabela 3), valor inferior publicado por Medina et al. (2006), no México (Estado de Aguascalientes), que também utilizaram a *nested* PCR (região ITS1) e encontraram 80% (35/44) de positividade em amostras de cérebro de fetos abortados provenientes de rebanhos leiteiros.

As seqüências dos *primers* da seqüência Nc5 utilizadas não são encontradas no genoma de *T. gondii*, *Sarcocystis capracanis*, *S. cruzi*, *S. miescheliana*, *S. moulei*, *S. tenella* e de *Hammondia hammondi* (YAMAGE; FLECHTNER; GOTTSTEIN, 1996; HUGHES et al., 2006), demonstrando que a *nested* PCR PLUS também possui especificidade para o *N. caninum*. A *nested* PCR PLUS detectou 22,22% (16/72) de amostras de SNC positivas (Tabela 3), resultado semelhante ao obtido por Gottstein et al. (1998) que também utilizaram *primers* da região Nc5 (DNA genômico) e detectaram pela *nested* PCR 29% de 83 cérebros de fetos bovinos abortados na Suécia. Paula (2003) empregou a técnica de *hemi-nested* PCR utilizando também *primers* da região Nc5 em cérebro congelado e detectou positividade em 31,25% (10/32) dos fetos abortados no Brasil.

A taxa de fetos abortados positivos pela IHQ encontrada na amostragem do Instituto Biológico - 8,57% (9/105) (Tabela 4) foi inferior ao encontrado por Pescador et al. (2007) - 21,31% (55/258) nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Na Argentina, MOORE et al. (2008) encontraram 7,36% (49/666) de fetos positivos na IHQ, estando estes

valores bem próximos ao encontrado no presente trabalho. A incidência de aborto bovino por *N. caninum* diagnosticado pela IHQ variou de 4,2% na Inglaterra e Irlanda do Norte (OTTER et al., 1995; McNAMEE et al., 1996) a 19% na Califórnia (ANDERSON et al., 1991).

A taxa de infecção fetal pelo *N. caninum*, representada individualmente pela positividade em cada uma das técnicas diagnósticas foi na IHQ 8,57% (9/105), na *nested* PCR PLUS 20,95% (22/105) e na *nested* PCR JB 6,66% (7/105) (Tabela 4), indicando que a *nested* PCR PLUS foi a técnica que mais detectou positividade para *N. caninum*, seguida pela IHQ e *nested* PCR JB, sendo importante avaliar a concordância entre as técnicas para poder interpretar a taxa de positividade.

Ao comparar a IHQ com a *nested* PCR PLUS obteve-se índice *kappa* 0,3 indicando baixo grau de concordância em nível de 5% (Tabelas 5 e 8). Comparando a IHQ e a *nested* PCR JB, o valor de *kappa* foi 0,19 indicando insignificante grau de concordância estatística em nível de 5% entre estas duas técnicas avaliadas (Tabelas 6 e 8). Sager et al. (2001) também relatam uma fraca correlação entre a IHQ e a PCR, em 47 casos diagnosticados como positivos pela PCR, em apenas cinco não haviam lesões compatíveis às causadas pelo *N. caninum* pela histologia, entretanto, nenhum destes casos reagiu à IHQ. A diferença entre as duas provas se deve ao fato das técnicas moleculares detectarem o DNA do parasita em pequenas quantidades de amostras fetais, quer estejam mumificadas ou em diferentes graus de autólise.

A *nested* PCR JB detectou menor taxa de infecção fetal - 6,66% (7/105) quando comparada com a *nested* PCR PLUS - 20,95% (22/105) (Tabela 4) e a baixa concordância entre ambas foi revelada pelo índice *kappa* (0,35) a um nível de significância estatística de 5% (Tabelas 7 e 8). Tendo em vista que o protocolo de extração de DNA foi o mesmo, o menor limiar de detecção entre ambas pode estar relacionado com os *primers* utilizados e a região do gene por eles amplificada, visto que a *nested* PCR PLUS teve maior sensibilidade analítica quando comparada com a *nested* PCR JB.

Os baixos valores de índices *kappa* entre as diferentes provas (Tabela 8) comprovam que as técnicas são complementares e demonstram a necessidade de calcular a taxa de infecção total levando em consideração pelo menos um resultado positivo a cada uma das técnicas (Tabela 9). Desta forma, 24,76% (26/105) das amostras foram positivas a qualquer uma das técnicas (IHQ, *nested* PCR PLUS ou *nested* PCR JB). Por outro lado, foram unicamente positivas na IHQ 2,86% (3/105), na *nested* PCR PLUS 11,43% (12/105) e na *nested* PCR JB 0,95% (1/105); amostras positivas simultaneamente na IHQ e *nested* PCR PLUS 3,81% (4/105), nenhuma positiva simultaneamente para IHQ e *nested* PCR JB e 3,81% (4/105) para a *nested* PCR PLUS e JB. Em 1,90% (2/105) amostras foram simultaneamente positivas nas três técnicas (Tabela 9). Pereira-Bueno et al. (2003) também concluem que é necessário utilizar mais de uma técnica diagnóstica para aumentar a

probabilidade de detecção do parasita nos fetos abortados. Baszler et al. (1999) consideram um protocolo de diagnóstico de rotina do *N. caninum* em fetos bovinos abortados empregando conjuntamente o estudo das alterações histopatológicas, identificação do parasita por IHQ e PCR, conforme realizado no presente trabalho, pelo fato da IHQ ser uma prova específica, sendo necessário aumentar a sensibilidade do diagnóstico com a utilização de técnicas moleculares. Com a finalidade de otimizar tempo e reduzir gastos com reagentes, pode-se ainda sugerir a padronização de um protocolo de PCR multiplex incluindo os dois *primers* (ITS1 e Nc5), tendo em vista que foi demonstrada a complementaridade entre a *nested* PCR JB e PLUS, porque detectam diferentes regiões do genoma do parasita.

Amostras de fetos e placentas, remetidas ao Instituto Biológico para diagnóstico diferencial de causas de abortamento em bovinos estavam muitas vezes congeladas e/ou autolisadas, o que dificultou o diagnóstico histopatológico por HE e IHQ. A hematina ácida formolínica, pigmento formado pela reação do formol ácido em tecidos hemorrágicos e autolisados (VASCONCELOS, 2000) bem como a biotina endógena (RAMOS-VARA et al., 2008) são considerados artefatos de técnica porque apresentam a mesma coloração bronzeada que o DAB confere ao taquizoíto, por este motivo, a leitura da lâmina de IHQ deve associar a morfologia do parasita com a cor desenvolvida pela ligação antígeno-anticorpo marcada com cromógeno.

O congelamento e a autólise destroem a arquitetura celular do parasita, o que pode explicar a não visualização das estruturas (cistos ou taquizoítos) pela IHQ, podendo ser eficiente quando aplicada em tecidos intactos e bem fixados (EPERON et al., 1999). A fixação dos tecidos pela formalina também pode interferir na imunoreatividade da amostra, tendo em vista que esta substância forma múltiplas ligações com proteínas (pontes de metileno), o que mascara os epítomos e bloqueia o acesso de anticorpos ao antígeno, ocasionando resultado falso-negativo. Por esta razão devem ser utilizados métodos enzimáticos ou o calor, que promovem a recuperação antigênica ao destruírem as pontes de metileno e melhoram a imunoreatividade da prova (BOENISCH, 2005; KEY; BOENISH, 2006; RAMOS-VARA et al., 2008).

Outro fator que pode estar contribuindo para a não detecção do parasita pela IHQ e sim pela *nested* PCR é a amostragem de tecido, onde um diferente fragmento foi aliquoteado para histopatologia e outro para análise molecular, podendo o parasita estar presente em uma porção, mas não na outra. A microtomia de cortes seriados de um mesmo bloco de parafina aumenta a chance de obter pelo menos um fragmento com o *N. caninum*, porém fazer diversas lâminas para IHQ eleva o custo da análise, bem como essa técnica é laboriosa, por este motivo esses fatores devem ser ponderados na escolha da técnica diagnóstica.

Com relação à PCR, uma possível justificativa para a não detecção do DNA em algumas amostras de órgãos fetais testadas e positivas para IHQ pode ser devida à degradação do DNA devido a autólise (SHIBATA 1994). Por outro lado, o congelamento não afeta o DNA do *N. caninum*, sendo a *nested* PCR um método útil quando tecidos estiverem congelados, o que dificulta as análises histológicas.

Nos materiais em que foi informada a idade, apesar de não haver correlação estatística entre abortamento e faixa etária pelo Teste Exato de Fisher a um nível de significância estatística de 5%, observa-se que houve uma maior frequência de ocorrência no terço médio da gestação (26,92%) (Tabela 10), o que corrobora com os relatos de outros autores (THILSTEAD et al., 1989; BARR et al., 1990; ANDERSON et al., 1991; NIETFIELD et al., 1992; DUBEY; LINDSAY, 1996; HATTEL et al., 1998). Segundo Anderson, Andrianarivo e Conrad (2000), surtos de abortamento nessa faixa etária podem ser indicativos de neosporose e estão associados à capacidade do feto em possuir ou não uma resposta imunológica frente ao parasita para protegê-lo contra a infecção.

Quanto à origem dos fetos encaminhados, deve-se ressaltar que a amostragem foi oriunda de rebanhos com problemas reprodutivos, não tendo sido coletada por meio de delineamento estatístico. A maior parte das amostras totais foi originária do Estado de São Paulo – 62,85% (66/105), que obteve o maior índice de positividade – 12,38% (13/105), enquanto que somando os demais Estados (Alagoas, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná e Rio de Janeiro) obteve-se 12,38% (13/105). A amostragem obtida pelo Instituto Biológico demonstrou que em sete de 13 Estados Brasileiros de onde os fetos bovinos eram provenientes foi detectado pelo menos um feto bovino abortado por *N. caninum* considerando as três técnicas (IHQ, *nested* PCR PLUS e *nested* PCR JB), o que demonstra que a neosporose encontra-se disseminada no Brasil e deve ser considerada no diagnóstico diferencial de abortamento bovino (Tabela 11).

O diagnóstico etiológico de um abortamento infeccioso por *N. caninum* requer a demonstração do parasito por técnicas específicas (IHQ) ou sensíveis e específicas (PCR), preferencialmente associado com lesões histopatológicas (SAGER et al., 2001). Apesar de o presente trabalho ter tido como objetivo avaliar apenas o *N. caninum* é importante salientar que outras causas poderiam estar implicadas e que os achados histopatológicos poderiam ser coincidentes (ANDERSON; BARR; CONRAD, 1994; FAYER; DUBEY 1986). Genovez et al. (1993) examinaram 257 fetos bovinos abortados provenientes de rebanhos na maioria leiteiros, provenientes de vários Estados no Brasil, no período de 1985 a 1992, diagnosticando causas bacterianas em 37,4%, tendo sido isolada *Brucella abortus* 6,2%, *Leptospira* spp 6,2%, *Staphylococcus aureus* 5,4%, *Campylobacter fetus* 4,7% e *Streptococcus* Beta hemolítico 3,5%. Otter et al. (1995) encontraram evidências de

infecções causadas por *Leptospira hardjo*, *Pasteurella haemolytica* e *Bacillus licheniformis* em casos de fetos bovinos que continham lesões inflamatórias não supurativas.

A ausência de sinais clínicos e lesões macroscópicas evidentes que acompanham o aborto por *N. caninum* e a necessidade de recorrer ao laboratório para alcançar um diagnóstico etiológico preciso são características compartilhadas pela maioria dos processos infecciosos e parasitários que cursam com infertilidade (falha na concepção, morte embrionária ou fetal e aborto). Por este motivo, o diagnóstico da causa de aborto em um animal ou em um grupo de animais num rebanho é sempre uma tarefa difícil devido aos múltiplos agentes que podem estar implicados, a ausência de um quadro clínico característico na maioria dos casos e a inespecificidade das lesões macroscópicas. A investigação da infecção fetal por *N. caninum* é apenas mais uma das quais se deve realizar nos abortos bovinos, tendo em vista que inclusive nos melhores laboratórios a porcentagem de êxito não superará 40-50% (FERRE et al., 2003).

O diagnóstico histológico sugestivo de quadro infeccioso é importante principalmente quando os métodos microbiológicos e sorológicos não podem ser utilizados e esforços para a coleta de órgãos, placenta e principalmente do cérebro fetal devem ser estimulados para aumentar o sucesso de diagnóstico definitivo de neosporose pelos exames de IHQ e *nested* PCR.

6. CONCLUSÕES

- A histopatologia pela HE pode ser empregada como triagem para identificar lesões sugestivas de abortamento infeccioso, sendo importante a associação de técnicas específicas e sensíveis como a *nested* PCR e IHQ ao histopatológico, pois demonstraram ser complementares.
- Com a finalidade de otimizar tempo e reduzir gastos com reagentes, sugere-se a padronização de um único protocolo de PCR multiplex incluindo os *primers* das regiões ITS1 e Nc5.
- A *nested* PCR é uma ferramenta útil no diagnóstico do *N. caninum*, podendo ser utilizada nos materiais que não apresentaram condições favoráveis para a análise histológica (autólise, mumificação e/ou congelamento).
- Recomenda-se o cérebro como órgão de eleição para o diagnóstico do parasita, para qualquer uma das técnicas (IHQ, *nested* PCR PLUS e *nested* PCR JB).
- A Neosporose está disseminada nos rebanhos de diversos Estados Brasileiros, justificando a importância da pesquisa do agente no diagnóstico diferencial de abortamento em bovinos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, T. C. Hematoxilina y eosina. In: PROPHET, E.B. et al. (Eds.). **Métodos Histotecnológicos**. Washington: Registro de Patología de los Estados Unidos de América, 1995. cap. 9, p. 55-60.
- ÁLVAREZ-GARCIA, G. **Identificación y caracterización de antígenos de *Neospora caninum* con interés inmunodiagnóstico en bovinos**. 2003. 279p. [Tese (Doutorado) – Universidad Complutense de Madrid], Madrid, 2003.
- ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P.A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 417-431, 2000.
- ANDERSON, M. L.; BARR, B. C.; CONRAD, P. A. Protozoal causes of reproductive failure in domestic ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 10, n. 3, p. 439-461, 1994.
- ANDERSON, M. L.; BLANCHARD, P. C.; BARR, B. C.; DUBEY, J. P.; HOFFMAN, R. L.; CONRAD, P. A. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 198, p. 241-244, 1991.
- ANDERSON, M. L.; BLANCHARD, P. C.; BARR, B. C.; HOFFMAN, R. L. A survey of causes of bovine abortion occurring in the San Joaquin Valley, California. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 283-287, 1990.
- ANDERSON, M. L.; PALMER, C. W.; THURMOND, M. C.; PICANSO, J. P.; BLANCHARD, P. C.; BREITMEYER, R. E.; LAYTON, A. W.; MCALLISTER, M.; DAFT, B.; KINDE, H. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 207, p. 1206-1210, 1995.
- ATKINSON, R.; HARPER, P. A.; REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. **Parasitology Today**, v. 16, p. 110-114, 2000.
- BARR, B. C.; ANDERSON, M. L.; BLANCHARD, P. C.; DAFT, B. M.; KINDE, H.; CONRAD, P. A. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. **Veterinary Pathology**, v. 27, n. 5, p. 354-361, 1990.
- BARR, B. C.; ANDERSON, M. L.; DUBEY, J. P.; CONRAD, P. A. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. **Veterinary Pathology**, v. 28, p. 110-116, 1991a.
- BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; BREITMEYER, R.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M. L.; REYNOLDS, J.; CHAUVET, A. E.; DUBEY, J. P.; ARDANS, A. A. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses:

four cases (1990-1992). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 202, p. 113-117, 1993.

BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; DUBEY, J. P.; ANDERSON, M. L. *Neospora*-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 3, p. 39-46, 1991b.

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

BARRATT, J.; QASSAB, A. S.; REICHEL, P. M.; ELLIS, T. J. The development and evaluation of a nested PCR assay for detection of *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* in feral mouse tissues. **Molecular and Cellular Probes**, v. 22, n. 4, p. 228-233, 2008.

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

BJERKÅS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift Fuer Parasitenkunde**, v. 70, p. 271-274, 1984.

BJÖRKMAN, C.; JOHANSSON, O.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O. J.; UGGLA, A. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 208, p. 1441-1444, 1996.

BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1497- 1507, 1999.

BOENISCH, T. Effect of heat-induced antigen retrieval following inconsistent formalin fixation. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 13, p. 283-286, 2005.

BOULTON, J. G.; GILL, P. A.; COOK, R. W.; FRASER, G. C.; HARPER, P. A.; DUBEY, J. P. Bovine *Neospora* abortion in north-eastern New South Wales. **Australian Veterinary Journal**, v. 72, p. 119-120, 1995.

BRAUTIGAM, C. P.; HIETALA, S. K.; GLASS, R. Resultados de levantamento sorológico para espécie *Neospora* em bovinos de corte e leite. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15., Campo Grande, 1996. **Abstracts...** Campo Grande: Associação Panamericana de Ciências Veterinárias, 1996, p. 284.

BRYAN, L. A.; GAJADHAR, A. A.; DUBEY, J. P.; HAINES, D. M. Bovine neonatal encephalomyelitis associated with a *Neospora* sp. protozoan. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 35, p. 111-113, 1994.

BUXTON, D.; MALEY, S. W.; WRIGHT, S.; THOMSON, K. M.; RAE, A. G.; INNES, E. A. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v. 118 , p. 267-279, 1998.

BUXTON, D.; McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 546-552, 2002.

CAETANO-DA-SILVA, A.; FERRE, I.; COLLANTÉZ-FERNÁNDEZ, E.; NAVARRO, V.; ADURIZ, G.; UGARTE-GAEAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L. M. Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 62, n. 7, p. 1329-1336, 2004.

CAMPERO, C. M.; ANDERSON, M. L.; CONOSCIUTO, G.; ODRIUZOLA, H.; BRETSCHEIDER, G.; POSO, M.A. *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in Argentina. **The Veterinary Record**, v. 143, p. 228-229, 1998.

CAMPERO, C. M.; MOORE, D. P.; LAGOMARSINO, H.; ODEÓN, A. C.; CASTRO, M.; VISCA, H. Serological status and abortion rate in progeny obtained by natural service or embryo transfer from *Neospora caninum* seropositive cows. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 50, p. 458-460, 2003.

CHAHAN, B.; GATURAGA, I.; HUANG, X.; LIAO, M.; FUKUMOTO, C.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; IGARASHI, I.; MIKAMI, T.; XUAN, X. Serodiagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle by enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant truncated NcSAG1. **Veterinary Parasitology**, v. 118, p. 177-185, 2003.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ZABALLOS, A.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; ORTEGA-MORA, L. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1194-1198, 2002.

CORBELLINI, L. G. **Infecção por *Neospora caninum* em bovinos leiteiros no Estado do Rio Grande do Sul: diagnóstico, avaliação sorológica e aspectos epidemiológicos**. Porto Alegre: 2001. 81p. [Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária – URGs].

CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C. F. E.; DIAS, M. M. Aborto bovino por *Neospora caninum* no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 30, n. 5, p. 863-868, 2000.

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

DAVISON, H. C.; FRENCH, N.P.; TREES, A. J. Herd-specific and age-specific seroprevalence of *Neospora caninum* in 14 British dairy herds. **The Veterinary Record**, v. 144, p. 547-550, 1999a.

DAVISON, H. C.; GREINER, M.; TREES, A. J. Quantitative analysis of *Neospora caninum* serological data obtained from dairy cattle. **Proceedings of the Society of Veterinary**

Epidemiology and Preventive Medicine, Annual Conference, Bristol, UK, p. 172-181, 1999c.

DAVISON, H. C.; OTTER, A.; TREES, A. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1683-1689, 1999b.

DE MAREZ, T.; LIDDELL, S.; DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; GASBARRE, L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1647-1657, 1999.

DEL FAVA, C.; PITUCO, E. M., GENOVEZ, M. E. Diagnóstico diferencial de doenças da reprodução em bovinos: experiência do Instituto Biológico. **O Biológico**, v. 69, n. 2, p. 73-79, 2007.

DUBEY, J. P. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 214, p. 1160-1163, 1999a.

_____. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p. 349-367, 1999b.

_____. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2003.

DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERKAS, 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.; MATSSON, J. G.; McALLISTER, M. M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L. D.; SPEER, C. A.; TREES, A. J.; UGGLA, A.; UPTON, S. J.; WILLIAMS, D. J.; LINDSAY, D. S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 929-946, 2002a.

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, p. 1269-285, 1988.

DUBEY, J. P.; DE LAHUNTA, A. Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf. **Applied Parasitology**, v. 34, p. 229-233, 1993.

DUBEY, J. P., HARTLEY, W. J., LINDSAY, D. S. Congenital *Neospora caninum* infection in a calf with spinal cord anomaly. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 197, p. 1043-1044, 1990.

DUBEY, J. P.; HILL, D. E.; LINDSAY, D. S.; JENKINS, M. C.; UGGLA, A.; SPEER, C. A. *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* are separate species/organisms. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 66-69, 2002b.

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

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.

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

DUBEY, J. P.; SHARMA, S. P. Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 5, p. 1-16, 2003.

ELLIS, J. T.; LUTON, K.; BAVERSTOCK, P. R.; BRINDLEY, P. J.; NIMMO, K. A.; JOHNSON, A. M. The phylogeny of *Neospora caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 64, p. 303-311, 1994.

ELLIS, J. T.; MORRISON, D. A.; LIDDELL, S.; JENKINS, M. C.; MOHAMMED, O. B.; RYCE, C.; DUBEY, J. P. The genus *Hammondia* is paraphyletic. **Parasitology**, v. 118, p. 357-362, 1999.

ENTRICAN, G. New technologies for studying immune regulation in ruminants. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 87, p. 485-90, 2002.

EPERON, S.; BRONNIMANN, K.; HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B. Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (microMT) mice to *Neospora caninum* infection. **Parasite Immunology**, v. 21, p. 225-36, 1999.

FAYER, R.; DUBEY, J. P. Bovine sarcocystosis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.8, p.130-142, 1986.

FERRE, I.; ÁLVAREZ-GARCIA, G.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; PÉREZ, F. J.; ORTEGA-MORA, L. M. Diagnóstico de la infección y del aborto causado por *Neospora caninum* em los bovinos. **Producción Animal**, v. 190, p. 52-62, 2003.

GENNARI, S. M.; SOUZA, S. L. P. Neosporose. **Vet news**, n. 59, p. 11-13, 2002.

GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E.; ROJAS, S.; GIORGI, W.; KANETO, C. N. Isolamentos bacterianos de fetos abortados bovinos examinados no Instituto Biológico de São Paulo, no período de 1985 a 1992. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 30, n. 2, p. 107-112, 1993.

GONDIM, L. F. P.; LASKI, P.; GAO, L.; McALLISTER, M. M. Variation of the internal transcribed spacer 1 sequence within individual strains and among different strains of *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 1, p. 119-122, 2004b.

GONDIM, L. F. P.; McALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 159-161, 2004a.

GONDIM, L. F. P.; SARTOR, L. F. Detecção de anticorpos contra *Neospora caninum* em vacas leiteiras em uma propriedade com histórico de aborto. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, p. 346, 1997. Suplemento 1.

GONDIM, L.F.P.; SARTOR, I.F.; MONTEIRO Jr., L.A.; HARITANI, M. *Neospora caninum* infection in an aborted bovine fetus in Brazil. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 47, n. 1, p. 35, 1999.

GONZÁLEZ, L.; BUXTON, D.; ATXAERANDIO, R.; ADURIZ, G.; MALEY, S.; MARCO, J. C.; CUERVO, L. A. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. **The Veterinary Record**, v.1 44, p. 145-150, 1999.

GOTTSTEIN, B.; HENTRICH, B.; WYSS, R.; THUR, B.; BUSATO, A.; STARK, K. D.; MÜLLER, N. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 679-691, 1998.

HATTEL, A. L.; CASTRO, M. D.; GUMMO, J. D.; WEINSTOCK, D.; REED, J. A.; DUBEY, J. P. Neosporosis-associated bovine abortion in Pennsylvania. **Veterinary Parasitology**, v. 74, p. 307-313, 1998.

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B.; KAUFMANN, H. Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 112, p. 183-197, 1996.

HENTRICH, B.; WALDVOGEL, A.; HEMPHILL, A.; MÜLLER, N.; WYSS, R.; HÄSSIG, M.; BRUCKNER, L.; GOTTSTEIN, B. Comparative assessment of molecular and immunodiagnostic methods based upon experimental and natural *Neospora* sp infection. **Proceedings EU COST820 Annual Workshop**. Oxford, UK, September, 82, 1997.

HERNANDEZ, J.; RISCO, C.; DONOVAN, A. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, p. 632-635, 2001.

HILL, D. E.; LIDDELL, S.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. Specific detection of *Neospora caninum* oocysts in fecal samples from experimentally-infected dogs using the polymerase chain reaction. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 2, p. 395-398, 2001.

HO, M. S.; BARR, B. C.; MARSH, A. E.; ANDERSON, M. L.; ROWE, J. D.; TARANTAL, A. F.; HENDRICKX, A. G.; SVERLOW, K.; DUBEY, J. P.; CONRAD, P. A. Identification of bovine *Neospora* parasites by PCR amplification and specific small-subunit rRNA sequence probe hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 1203-1208, 1996.

HOBSON, J. C.; DUFFIELD, T. F.; KELTON, D.; LISSEMORE, K.; HIETALA, S. K.; LESLIE, K. E.; McEWEN, B.; PEREGRINE, A.S. Risk factors associated with *Neospora caninum* abortion in Ontario Holstein dairy herds. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 177-188, 2005.

HOMAN, W. L.; LIMPER, L.; VERLAAN, M.; BORST, A.; VERCAMMEN, M.; KNAPEN, F. Comparison of the internal transcribed spacer, ITS 1, from *Toxoplasma gondii* isolates and *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, v. 83, p. 285-289, 1997.

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

HUGHES, M. J.; WILLIAMS, H. R.; MORLEY, K. E.; COOK, N. A. D.; TERRY, S. R.; MURPH, G. R.; SMITH, E. J.; HIDE, G. The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. **Parasitology**, v. 132, p. 29-36, 2006.

INNES, E. A.; ANDRIANARIVO, A. G.; BJÖRKMAN, C.; WILLIAMS, D. J.; CONRAD, P. A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 497-504, 2002.

INNES, E. A.; WRIGHT, S. E.; MALEY, S.; RAE, A.; SCHOCK, A.; KIRVAR, E.; BARTLEY, P.; HAMILTON, C.; CAREY, I. M.; BUXTON, D. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 1523-1534, 2001.

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

KEY, M.; BOENISH, T. Antigen Retrieval. In: KEY, M. (ed.). **Immunohistochemical staining methods**. 4. ed. Carpinteria: Dako Corporation, 2006. p. 41-45.

KIM, J. H.; SOHN, H. J.; HWANG, W. H.; HWANG, E. K.; JEAN, Y. H.; YAMANE, I.; KIM, D. Y. *In vitro* isolation and characterization of bovine *Neospora caninum* in Korea. **Veterinary Parasitology**, v. 90, p. 147-154, 2000.

KIRKBRIDE, C. A. Etiologic agents detected in a 10-year study of bovine abortion and stillbirths. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, p. 175-180, 1992.

_____. **Laboratory diagnosis of livestock abortion**. 3ed. Iowa State University Press, 1990, 260p.

LANDMANN, J. K.; JILLELLA, D.; O'DONOGHUE, P. J.; MCGOWAN, M. R. Confirmation of the prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle by the use of embryo transfer. **Australian Veterinary Journal**, v. 80, p. 502-503, 2002.

LIDDELL, S.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. A competitive PCR assay for quantitative detection of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1583-1587, 1999.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Canine neosporosis. **Journal of Veterinary Parasitology**, v. 14, n. 1, p. 1-11, 2000.

_____. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 11, p. 1981-1983, 1989.

LOBATO, J.; SILVA, D. A.; MINEO, T. W. P.; AMARAL, J. D. H. F.; SILVA SEGUNDO, G. R.; COSTA-CRUZ, J. M.; FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S.; MINEO, J. R. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 1, p. 84-89, 2006.

MAGNINO, S.; VIGO, P. G.; BANDI, C.; De GIULI, L.; FABBI, M.; GENCHI, C. PCR diagnosis for *Neospora caninum* infection in aborted bovine fetuses and for *Toxoplasma gondii* infection in hares and goats in Italy. **Parasitology International**, v. 47, p. 374, 1998.

MAYHEW, I. G.; SMITH, K. C.; DUBEY, J. P.; GATWARD, L. K.; MCGLENNON, N. J. Treatment of encephalomyelitis due to *Neospora caninum* in a litter puppies. **Journal of Small Animal Practice**, v. 32, p. 609-612, 1991.

McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; McGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1473-1478, 1998.

McALLISTER, M. M.; BJORKMAN, C.; ANDERSON-SPRECHER, R.; ROGERS, D. G. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 217, p. 881-887, 2000.

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

McNAMEE, P. T.; TREES, A. J.; GUY, F.; MOFFETT, D.; KILPATRICK, D. The diagnosis and prevalence of neosporosis in Northern Ireland cattle. **The Veterinary Record**, v. 138, p. 419-420, 1996.

MEDINA, L.; CRUZ-VÁZQUEZ, C.; QUEZADA, T.; MORALES, E.; GARCIA-VÁZQUEZ, Z. Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, Mexico. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 3-4, p. 187-191, 2006.

MOEN, A. R.; WOUDA, W.; DE GEE, A. Clinical and serological observations of bovine *Neospora* abortion in three Dutch dairy herds. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 19., 1996, Edimburgh. **Proceedings...** Edimburgh: British Cattle Veterinary Association, 1996. p. 198-202.

MONTEIRO, R. M. **Caracterização de protozoários pertencentes à sub-família Toxoplasmatinae pela análise molecular do gene codificador de proteína do choque térmico (HSP70) e do espaçador interno transcrito 1 (ITS-1)**. São Paulo: 2006, 92p. [Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- Universidade de São Paulo, São Paulo].

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

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

MOORE, D. P.; REGIDOR-CERRILLO, J.; MORRELL, E.; POSO D. B.; LEUNDA, M. R.; LINSCHINKY, L.; ODEÓN, A. C.; ODRIOZOLA, L. M.; ORTEGA-MORA, L. M.; CAMPERO, C. M. The role of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in spontaneous bovine abortion in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 156, p. 163-167, 2008.

MUGRIDGE, N. B.; MORRISON, D. A.; HECKEROTH, A. R.; JOHNSON, A. M.; TENTER, A. M. Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1545-1556, 1999.

MUGRIDGE, N. B.; MORRISON, D. A.; JAKEL, T.; HECKEROTH, A. R.; TENTER, A. M.; JOHNSON, A. M. Effects of sequence alignment and structural domains of ribosomal DNA on phylogeny reconstruction for the protozoan family Sarcocystidae. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, p. 1842-1853, 2000.

MÜLLER, N.; VONLAUFEN, N.; GIANINAZZI, C.; LEIB, S. L.; HEMPHILL, A. Application of real-time fluorescent PCR for quantitative assessment of *Neospora caninum* infections in organotypic slice cultures of rat central nervous system tissue. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 252-255, 2002.

MÜLLER, N.; ZIMMERMANN, V.; HENDRICH, B.; GOTTSTEIN, B. Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 11, p. 2850-2852, 1996.

NAM, H. W., KANG, S. W., CHOI, W. Y. Antibody reaction of human anti-*Toxoplasma gondii* positive and negative sera with *Neospora caninum* antigens. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 36, p. 269-275, 1998.

NIETFIELD, J. C.; DUBEY, J. P.; ANDERSON, M. L.; LIBAL, M. C.; YAEGER, M. J.; NEIGER, R. D. Neospora-like protozoan infection as a cause of abortion in dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, p. 223-226, 1992.

OKUDA, L. H.; PITUCO, E. M.; STEFANO, E.; PERUCINI, L. M. Isolamento de *Neospora caninum* em amostras de fetos bovinos abortados no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 2, p. 248-250, 2001.

OOI, H. K.; HUANG, C. C.; YANG, C. H.; LEE, S. H. Serological survey and first finding of *Neospora caninum* in Taiwan, and the detection of its antibodies in various body fluids of cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 90, p. 47-55, 2000.

ORTEGA-MORA, L. M.; FERRE, I.; CAETANO-DA-SILVA, A.; COLLANTEZ-FERNÁNDEZ, E.; REGIDOR-CARRILLO, J.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ADURIZ, G. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 301-308, 2003.

OSBURN, B. I. Ontogeny of immune responses in cattle. In: MORRISON, I., IVAN, W., (Eds.). **The ruminant immune system in health and disease**. Great Britain, 1988. p. 252-260.

OTTER, A.; JEFFREY, M.; GRIFFITHS, I. B.; DUBEY, J. P. A survey of the incidence of *Neospora caninum* infection in aborted and stillborn bovine fetuses in England and Wales. **The Veterinary Record**, v. 136, p. 602-606, 1995.

PARÉ, J.; THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 82-87, 1997.

PAYNE, S.; ELLIS, J. Detection of *Neospora caninum* DNA by the polymerase chain reaction. **International Journal for Parasitology**, v. 26, p. 347-351, 1996.

PAULA, V. S. O. **Avaliação de uma reação em cadeia pela polimerase para detecção de *Neospora caninum* em fetos bovinos**. São Paulo: 2003. 72p. [Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo].

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

PESCADOR, C. A. **Aborto bovino por *Neospora caninum*: fatores associados ao resultado positivo da imunoistoquímica**. Porto Alegre: 2005 76p. [Dissertação (Mestrado) Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre].

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

PETERS, M.; LUTKEFELS, E.; HECKEROTH, A. R.; SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 1144-1148, 2001.

PROPHET, E. B. Procesamiento de Tejidos: Deshidratación, aclaramiento y Infiltración. In: _____ et al. (Eds.). **Métodos Histotecnológicos**. Washington: Registro de Patología de los Estados Unidos de América, 1995. cap. 5, p. 31-34.

RAMOS-VARA, J. A.; KIUPEL, M.; BASZLER, T.; BLIVEN, L.; BRODERSEN, B.; CHELACK, B.; CZUB, S.; DEL PIERO, F.; DIAL, S.; EHRHART, E. J.; GRAHAM, T.; MANNING, L.; PAULSEN, D.; VALLI, V. E.; WEST, K. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, p. 393-413, 2008.

ROGERS, D. G.; GROTELUESCHEN, D. M.; ANDERSON, M. L.; MCCULLOUGH, M. S.; SHAIN, W. S.; DUBEY, J. P. Endemic protozoal abortions in a dairy cow herd. **Agri-Practice**, v. 14, p. 16-21, 1993.

ROMERO, J. J.; FRANKENA, K. The effect of the dam relationship on serostatus to *Neospora Caninum* on 20 Costa Rica dairy farms. **Veterinary Parasitology**, v. 114, p. 159-171, 2003.

ROMERO, J. J.; PÉREZ, E.; FRANKENA, K. Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rica dairy cows under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 149-159, 2004.

SAGER, H.; FISCHER, I.; FURRER, K.; STRASSER, M.; WALDVOGEL, A.; BOERLIN, P.; AUDIGE, L.; GOTTSTEIN, B. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. **Veterinary Parasitology**, v. 102, p. 1-15, 2001.

SANTOS, A. P. M. E. **Diagnóstico imuno-histoquímico do *Neospora caninum* em rebanho bovino leiteiro, da região Norte do Paraná**. 2000. 92 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2000.

SANTOS, A. P. M. E.; NAVARRO, I. T.; VIDOTTO, O.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Encefalomielite congênita em bezerro associada ao *Neospora caninum* no Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, p. 111-114, 2006.

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

SHIBATA, D. Preparation of nucleic acids from archival material. In: MULLIS, K. B.; FERRE, F.; GIBBS, R. A. (Eds.). **The polymerase chain reaction**. Boston: Birkhauser, 1994, p. 47-54.

SILVA, A. C. Diagnóstico da neosporose bovina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, suplemento 1, 2004.

SPEER, C. A.; DUBEY, J. P. Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum*. **Journal of Protozoology**, v. 36, p. 458-463, 1989.

SPEER, C. A.; DUBEY, J. P.; McALLISTER, M. M.; BLIXT, J. A. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1509-1519, 1999.

STENLUND, S.; KINDHAL, H.; MAGNUSSON, U.; UGGLA, A.; BJÖRKMAN, C. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 185, n. 4, p. 227-234, 1999.

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

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

THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, p. 1381-1385, 1997.

TRANAS, J.; HEINZEN, R. A.; WEISS, L. M.; McALLISTER, M. M. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, p. 765-767, 1999.

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

VASCONCELOS, A. C. Patologia em Hipertexto. Base de dados no ar desde 2000. Disponível em: <<http://www.icb.ufmg.br/pat/pat/old/9pigpat.htm>>. Acesso em: 10 mar. 2009.

VIANNA, L. C. **Transmissão vertical do *Neospora caninum* em novilhas prenhes**. Botucatu: 2004, 52p. [Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP, Campus Botucatu].

WEISS, L. M.; MA, Y. F.; HALONEN, S.; McALLISTER, M. M.; ZHANG, Y. W. The *in vitro* development of *Neospora caninum* bradyzoites. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1713-1723, 1999.

WILLIAMS, D. J.; GUY, C. S.; MCGARRY, J. W.; GUY, F.; TASKER, L.; SMITH, R. F.; MACEACHERN, K.; CRIPPS, P. J.; KELLY, D. F.; TREES, A. J. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally induced parasitaemia during gestation determines fetal survival. **Parasitology**, v. 121, p. 347-358, 2000.

WOUDA, W. Diagnosis and epidemiology of bovine neosporosis: a review. **The Veterinary Quarterly**, v. 22, n. 2, p. 71-74, 2000.

WOUDA, W.; MOEN, A.; DE GEE, A.; VAN KNAPEN, F. Laboratory and field experiences with bovine *Neospora* abortion in Dutch dairy herds. In: ANNUAL MEETING, 41, 1996, Louisville. **Proceedings...** Louisville: American Association of Veterinary Parasitologists, 1996.

WOUDA, W.; MOEN, A. R.; SCHUKKEN, Y. H. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. **Theriogenology**, v. 49, p. 1311-1316, 1998.

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

lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, n. 2, p. 180-185, 1997.

YAMAGE, M.; FLECHTNER, O.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). **Journal of Parasitology**, v. 82, p. 272-279, 1996.

8. ANEXOS

ANEXO 1

A. Preparo da Hematoxilina

Hematoxilina.....	0,5 g
Álcool absoluto.....	5,0 mL
Alúmem de potássio	10,0 g
Água destilada	100 mL
Óxido de Mercúrio.....	0,25 g
Ácido acético glacial	2 mL

Preparo: Dissolver a hematoxilina no álcool absoluto sem aquecimento. Dissolver o alúmem de potássio na água destilada à quente até a dissolução completa do sal. Misturar as duas soluções e levar à ebulição o mais rápido possível. Remover do fogo e acrescentar o óxido de mercúrio. Se necessário reaquecer a solução até completa diluição. Retirar do fogo e resfriar rapidamente em recipiente com água fria e gelo. Descansar 24 horas a temperatura ambiente e filtrar.

B. Preparo da Eosina

Eosina	4 g
Bicromato de potássio	2 g
Solução aquosa saturada de ácido pícrico	40 mL
Álcool absoluto	40 mL
Água destilada	320 mL

Preparo:

Solução Saturada de Ácido Pícrico: dissolver 100mL de água destilada e 2 g de ácido pícrico. Misturar bem, aquecer levemente, com bastante cuidado, até que se dissolva completamente. Após resfriar, formará um precipitado que deverá ser filtrado

ANEXO 2

Soluções e reagentes IHQ

A. Tampão Citrato (pH 6.0)

Solução estoque A :	ácido cítrico	21,1 g
	Água deionizada	1000 mL
Solução estoque B:	citrato de sódio	29,4 g
	Água deionizada	1000 mL

Preparo do tampão citrato (2000 mL) para uso:

Solução estoque A: 36 mL

Solução estoque B: 164 mL

Adicionar 1800 mL de água deionizada e ajustar o pH para 6.0 com NaOH 1N.

B. Solução Tampão Fosfato (PBS) 1000 mL (pH 7,2)

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	11,5 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Água deionizada	1000 mL q.s.p.

ANEXO 3

A- Solução de antibiótico (ATB): para preparo de 100 mL de meio MEM

Penicilina	0,7 g
Estreptomicina	1,0 g
Gentamicina	1,0 g
L-Glutamina	2,92 g
Anfotericina B	0,05 g
Água Milli-Q	100 mL q.s.p.

ANEXO 4

Amostras	IHQ	Nested PCR		HE		Estado	Idade gestação
		PLUS	JB	Lesões	Autolisado		
1	positivo	negativo	negativo	positivo		SP	
2	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	
3	negativo	negativo	negativo	positivo		GO	
4	negativo	negativo	negativo	negativo		GO	
5	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	5,5 meses
6	negativo	negativo	negativo	positivo		MG	
7	negativo	negativo	negativo	negativo		SP	
8	negativo	negativo	negativo	positivo		GO	
9	negativo	negativo	negativo	negativo		SP	
10	negativo	negativo	negativo	positivo		MT	6 meses
11	positivo	positivo	negativo	positivo		MS	5 meses
12	negativo	positivo	negativo	positivo		MG	
13	negativo	negativo	negativo	negativo		MG	
14	negativo	negativo	positivo	positivo		RJ	
15	negativo	negativo	negativo	positivo		PE	
16	negativo	positivo	positivo	positivo		SP	
17	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	
18	negativo	positivo	negativo	positivo		SP	
19	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	
20	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	
21	positivo	negativo	negativo	negativo		SP	
22	negativo	negativo	negativo	negativo		SP	
23	negativo	negativo	negativo	negativo		SP	
24	negativo	negativo	negativo	negativo		SP	
25	negativo	negativo	negativo	positivo		MG	
26	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	
27	negativo	positivo	negativo	positivo		SP	
28	negativo	positivo	negativo	positivo		RJ	8 meses
29	negativo	positivo	negativo	positivo		MG	
30	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	
31	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	
32	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	
33	negativo	negativo	negativo	positivo		GO	
34	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	
35	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	
36	positivo	positivo	positivo	positivo		PR	
37	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	
38	negativo	negativo	negativo		autolisado	MG	
39	negativo	positivo	negativo	positivo		MS	4,8 meses
40	positivo	positivo	negativo	positivo		GO	
41	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	

Amostras	IHQ	Nested PCR		HE		Estado	Idade gestação
		PLUS	JB	Lesões	Autolisado		
42	positivo	positivo	negativo	positivo		AL	
43	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	
44	negativo	negativo	negativo		autolisado	SP	
45	negativo	negativo	negativo		autolisado	SP	natimorto
46	negativo	negativo	negativo	negativo		SP	7 meses
47	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	
48	positivo	negativo	negativo	negativo		GO	
49	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	
50	negativo	negativo	negativo	positivo		GO	
51	negativo	negativo	negativo	negativo		RO	
52	negativo	negativo	negativo	positivo		MG	
53	negativo	positivo	negativo	positivo		SP	6 meses
54	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	6 meses
55	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	
56	negativo	negativo	negativo	negativo		SP	8 meses
57	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	
58	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	
59	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	
60	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	
61	negativo	negativo	negativo	positivo		MG	
62	negativo	positivo	negativo	positivo		GO	2 meses
63	negativo	negativo	negativo	positivo		GO	4 meses
64	positivo	positivo	negativo	positivo		GO	
65	negativo	negativo	negativo	negativo			
66	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	7 meses
67	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	
68	negativo	positivo	negativo	positivo		SP	6,5 meses
69	negativo	negativo	negativo	positivo		MS	
70	negativo	positivo	positivo		autolisado	SP	
71	negativo	negativo	negativo	positivo		MG	7 meses
72	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	
73	negativo	negativo	negativo	positivo		MG	
74	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	5 meses
75	negativo	negativo	negativo	negativo		SP	natimorto
76	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	7 meses
77	negativo	negativo	negativo	negativo		SP	8 meses
78	negativo	negativo	negativo	negativo		MS	5 meses
79	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	4 meses
80	positivo	negativo	negativo	positivo		SP	7 meses
81	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	5,5 meses
82	negativo	negativo	negativo	negativo		CE	
83	negativo	negativo	negativo	positivo		GO	

Amostras	IHQ	Nested PCR		HE		Estado	Idade gestação
		PLUS	JB	Lesões	Autolisado		
84	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	
85	negativo	negativo	negativo	negativo		SP	6 meses
86	negativo	positivo	positivo	positivo		SP	3-4 meses
87	negativo	negativo	negativo	negativo		MT	
88	negativo	negativo	negativo		autolisado	SP	
89	negativo	negativo	negativo		autolisado	SP	5 meses
90	negativo	negativo	negativo	negativo		SP	
91	negativo	positivo	negativo	positivo		MG	5 meses
92	negativo	positivo	negativo	positivo		SP	5 meses
93	negativo	negativo	negativo		autolisado	RN	5 meses
94	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	6 meses
95	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	3 meses
96	positivo	positivo	positivo	positivo		SP	
97	negativo	positivo	positivo	positivo		SP	7 meses
98	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	
99	negativo	negativo	negativo	negativo		SP	natimorto
100	negativo	positivo	negativo	positivo		SP	
101	negativo	negativo	negativo	negativo		SP	
102	negativo	negativo	negativo	negativo		BA	
103	negativo	negativo	negativo	positivo		MG	8 meses
104	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	8 meses
105	negativo	negativo	negativo	positivo		SP	4 meses
Total	9	22	7	75	7	104	36



SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)