

## ISOLAMENTO DE *Neospora caninum* DE FETO BOVINO DE REBANHO LEITEIRO NO PARANÁ

ROSANGELA LOCATELLI-DITTRICH<sup>1</sup>; VANETE THOMAZ-SOCCOL<sup>2</sup>; ROSÁRIA REGINA T.B.RICHARTZ<sup>3</sup>; MARA E. GASINO-JOINEAU<sup>3</sup>; ROGER VAN DER VINNE<sup>4</sup>; RHONDA D. PINCKNEY<sup>5</sup>

**ABSTRACT.**-LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; VANDER VINNE, R.; PINCKNEY, R.D. [Isolation of *Neospora caninum* from bovine fetus from a dairy herd in Paraná.] Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13, n. 3, p. 103-109, 2004. Universidade Federal do Paraná, Departamento de Medicina Veterinária, Rua dos Funcionários, 1540, CEP 80.035-050, Curitiba, Paraná, Brazil. E-mail: roslocdi@ufpr.br

Cerebral tissue from four fetuses and from a calf were obtained from a dairy herd in Paraná State, Brazil, with a history of abortion. *Neospora caninum*-specific antibodies were detected in 60 of 172 (34.8%) dairy cattle. The brain homogenates were inoculated into Vero cell culture and intraperitoneally into outbred Swiss Webster mice and into gerbils. *Neospora caninum* was isolated in Vero cell culture from the brain of an aborted 7-month-old fetus. The dam of the aborted fetus was positive for *N. caninum* antibodies and had histories of three abortions. The new isolate (BCN/PR3) was confirmed as *N. caninum* by polymerase chain reaction (PCR). *N. caninum* tachyzoites were not isolated from the peritoneal exudate. Few tissue cysts were observed in mice and gerbils brains. The isolate BNC/PR3 of *N. caninum* has been successfully maintained in cell culture.

**KEY WORDS:** *Neospora caninum*; bovine; isolation; fetus; tissue cysts.

### RESUMO

Amostras de cérebro de quatro fetos e de um bezerro foram obtidas de um rebanho leiteiro no Paraná, Brasil, com histórico de abortos endêmicos. A soro prevalência para *N. caninum* foi de 34,8% (60/172). As amostras foram inoculadas *in vitro* (células Vero) e *in vivo* (camundongos e gerbils). *Neospora caninum* foi isolado do cérebro de um feto de sete meses de idade, filho de vaca soro positiva para o agente e com histórico de três abortos consecutivos. A cepa BCN/PR3 foi isolada *in vitro* e confirmada como de *N. caninum* pela reação da polimerase em cadeia (PCR). Taquizoítas não foram isolados do exsudato peritonial dos camundongos e gerbils, contudo, cistos do parasita foram observados no cérebro desses ani-

mais. Os protozoários estão sendo mantidos em células Vero de forma contínua.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Neospora caninum*; bovino; isolamento; feto; cistos.

### INTRODUÇÃO

O protozoário *Neospora caninum* é um parasita intracelular obrigatório que na última década despontou como a principal causa de abortos em bovinos leiteiros, em vários países (ANDERSON et al., 2000). A neosporose clínica também foi diagnosticada em cães, ovinos, caprinos, cervos, rinocerontes e eqüinos, causando encefalite e mortalidade neonatal (DUBEY, 2003).

Os mecanismos de infecção por *N. caninum* são a transmissão vertical ou congênita e a horizontal, em que os bovinos podem ser infectados pela ingestão de oocistos eliminados nas fezes de cães e coiotes (McALLISTER et al., 1998; GONDIM et al., 2004). A transmissão vertical de *Neospora caninum* parece ser a principal via de infecção nos rebanhos bovinos com abortos endêmicos. A transmissão ocorre das vacas para as suas descendências por várias gerações, de

<sup>1</sup> Universidade Federal do Paraná, Departamento de Medicina Veterinária, Rua dos Funcionários, 1540, CEP 80.035-050, Curitiba, Paraná - Brasil. E-mail: roslocdi@ufpr.br

<sup>2</sup> Universidade Federal do Paraná, Departamento de Patologia Básica.

<sup>3</sup> Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, Curitiba, Paraná.

<sup>4</sup> Médico Veterinário autônomo.

<sup>5</sup> University of Wisconsin-Madison, USA.

forma crônica e com uma eficiência de 81 a 95%, confirmada pela presença de anticorpos pré-colostrais nos bezerros nascidos de mães soro positivas (ANDERSON et al., 2000).

A neosporose bovina está amplamente disseminada na Europa, África do Sul, Ásia, Austrália e nas Américas. No Brasil há relatos da ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos do Rio Grande do Sul, Paraná, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Bahia e Sergipe. No Paraná, anticorpos anti *N. caninum* foram detectados em bovinos leiteiros na região Norte do Estado e nos municípios de Carambeí, Witmarsum, Chopinzinho, Quatro Barras e em São José dos Pinhais, próximo a Curitiba (OGAWA et al., 1999; LOCATELLI-DITTRICH, 2002; RAGOZO et al., 2003; GUIMARÃES JÚNIOR et al., 2004).

Cepas de *N. caninum* foram isoladas de bezerros e de fetos na Austrália, Itália, Japão, Coreia, Portugal, Suécia, Inglaterra, Estados Unidos (DUBEY, 2003). No Brasil foram isoladas de cão, na Bahia (GONDIM et al., 2001) e de bezerro com cegueira congênita, no Paraná (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2003). No Brasil não existem relatos do isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino (DUBEY, 2003; GENNARI, 2004).

Em um rebanho leiteiro de Carambeí, com histórico de abortos endêmicos, a soroprevalência para *N. caninum* foi de 34,8% (60/172) e as vacas soro positivas apresentaram um risco de aborto quatro vezes maior do que as vacas soro negativas. Na propriedade também foram detectados anticorpos pré-colostrais nos bezerros filhos de mães soro positivas para *N. caninum* (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2001). Considerando-se que os animais apresentaram sorologia positiva para *N. caninum* e foram negativos na pesquisa de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* levantou-se a hipótese que *N. caninum* estaria causando os abortos. O objetivo deste trabalho foi o isolamento do protozoário a partir de amostras de tecidos de fetos e de bezerro com sorologia pré-colostral positiva para *N. caninum*, procedentes do rebanho avaliado.

## MATERIALE MÉTODOS

### Amostras para o isolamento *in vitro* e *in vivo* de *Neospora caninum*

As amostras para isolamento de *N. caninum* foram obtidas do cérebro de quatro fetos (FB1 a FB4) e de um bezerro sadio, filho de vaca soro positiva para *N. caninum* e soro positivo na amostra pré-colostral (título de 1:600). O bezerro e sua mãe apresentaram sorologia negativa para *T. gondii*.

Os fetos FB1 e FB2 eram filhos de vacas soro negativas para *N. caninum*. Os outros dois fetos, FB3 e FB4, eram filhos de uma mesma vaca, soro positiva ao agente. Esta vaca não tinha descendentes e abortou três vezes consecutivas, nos dias 03/09/98; 22/06/99 e 02/02/00. O primeiro feto foi abortado com seis meses de idade gestacional, e os outros dois, com sete meses. Nos dois últimos abortos os fetos FB3 e FB4 foram enviados ao laboratório para o isolamento de *N. caninum*. Os fetos foram mantidos e enviados sob refrigeração ao laboratório, no dia seguinte ao aborto.

### Isolamento *in vivo*

Os inóculos dos fetos e do bezerro foram preparados segundo o protocolo de isolamento de *N. caninum* de tecidos (CONRAD et al., 1993), sendo mantidos a 4°C durante 14 dias, para repetição das inoculações. Os sedimentos de cérebro dos animais suspeitos de neosporose foram ressuspensos em meio Eagle (Sigma) e inoculados em lotes de camundongos (*Mus musculus*) do tipo Swiss Webster, imunocompetentes e imunodeprimidos, e em gerbils (*Meriones unguiculatus*). Nos animais controles foi inoculado o meio Eagle.

As suspensões de cérebro dos fetos FB1, FB2, FB3 e FB4 foram inoculadas em lotes de quatro camundongos imunodeprimidos:

a) 0,5 ml da suspensão/ camundongo, via intra-peritonial (IP), dois dias depois do aborto. Em cada camundongo foi administrado 4,0 mg de acetato de metilprednisolona, MPA (Depo-Medrol®), no dia da inoculação.

As amostras de tecidos do bezerro BEZ1, soro positivo para *N. caninum*, foram inoculadas em:

a) lote de quatro camundongos imunocompetentes: 1,0 ml da suspensão de cérebro/ camundongo, via IP; um dia e 10 dias depois da eutanásia do bezerro;

b) lote de quatro camundongos imunodeprimidos: 1,0 ml da suspensão de cérebro/camundongo, via IP, um dia depois da eutanásia do bezerro; 4,0 mg de acetato de metilprednisolona por camundongo, no dia da inoculação.

c) lote de quatro gerbils: 1,0 ml da suspensão de cérebro/ animal, via IP; um dia e 10 dias depois da eutanásia do bezerro;

Dez dias após as inoculações foram realizadas as colheitas de líquido peritonial de 50% dos camundongos e dos gerbils/ lote. Após a eutanásia dos animais foi inoculado 5,0 ml de solução de tampão fosfato (PBS), via IP. Em seguida, o conteúdo foi retirado, transferido para um tubo cônico, centrifugado (2.600 rpm, 10 minutos) e o sedimento examinado quanto a presença de taquizoítas. Após o exame, os sedimentos foram ressuspensos com 1,0 ml de meio Eagle e reinoculados via IP em dois camundongos imunocompetentes. Na sequência foram realizadas mais quatro sucessivas passagens intraperitoniais em camundongos imunocompetentes, com intervalos de cinco dias, objetivando-se uma formação contínua de parasitas.

O restante dos animais inoculados permaneceu no biotério para desenvolverem uma infecção crônica. As eutanásias foram realizadas de dois a 20 meses após a inoculação, para pesquisa de cistos no cérebro.

### Isolamento *in vitro* de *Neospora caninum*

As amostras de cérebro dos fetos e do bezerro foram processadas, inoculadas em células Vero e incubadas em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por 12 horas. Na sequência, a suspensão foi removida, sendo acrescentado o meio Eagle. Os frascos foram avaliados diariamente em microscópio invertido (CONRAD et al., 1993).

### Cultivo dos Protozoários

Após o isolamento, os protozoários foram mantidos nas células Vero, em meio de manutenção Eagle suplementado com

2% de soro fetal bovino. O meio foi substituído duas a três vezes por semana e os parasitas foram transferidos periodicamente para novos frascos, conforme o crescimento.

As cepas de referência de *N. caninum*, NC-1 e NC-2, e a cepa RH de *Toxoplasma gondii* também foram cultivadas *in vitro* para obtenção do sedimento parasitário e extração do DNA. As cepas de *N. caninum* foram cedidas pelo Laboratório de Parasitologia Veterinária da Universidade de Madison-Wisconsin, EUA, e a cepa de *T. gondii* foi cedida pelo Laboratório de Protozoologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina, Paraná.

### Caracterização molecular

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para identificação da cepa de protozoário isolada. A extração de DNA foi realizada no sedimento parasitário obtido dos cultivos. As amostras de DNA das células Vero, de duas cepas de *N. caninum* de referência (NC-1 e NC-2), da cepa RH de *T. gondii* e a da obtida *in vitro*, foram submetidas à amplificação, utilizando-se três combinações de *primers*, Np21 e Np6, Np7 e Np4, Np21 e Np4. O alvo da PCR foi a sequência Nc5 do DNA de *N. caninum*. Esta sequência apresenta repetições no genoma de *N. caninum* e não foi encontrada no genoma de *T. gondii*, *Sarcocystis capracanis*, *S. cruzi*, *S. miescheliana*, *S. moulei*, *S. tenella* e *Hammondia hammondi* (YAMAGE et al., 1996; BASZLER et al., 1999).

A amplificação foi realizada no termociclador "Mini Cycler" MJ RESEARCH, com o seguinte programa: desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, 40 ciclos de 1 minuto a 94°C para desnaturação do DNA, 1 minuto a 50°C para anelamento dos *primers*, 3 minutos e 30 segundos a 74°C para extensão. No final foi programado 1 ciclo de 5 minutos a 72°C para a extensão final, e posterior manutenção a 4°C por 14 horas. Após a amplificação, os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,4%. Na eletroforese foi utilizado o marcador 1 Kb PLUS DNA de 100 a 12.000 pares de bases.

## RESULTADOS

### Isolamento *in vitro*

A cepa de protozoário BNC/PR3 foi isolada do cérebro do feto bovino FB4, 30 dias após a inoculação das amostras. Os taquizoítas foram observados em áreas de rompimento da monocamada, em grupos ou isolados, e de maneira gradativa aumentaram a área de infecção com a destruição das células. Os protozoários extracelulares, isolados, em duplas ou em grupos enovelados, foram observados em maior número, sobre as células hospedeiras e nos espaços da monocamada. A multiplicação dos parasitas ocorreu de maneira lenta e produziu os efeitos citopáticos de destruição gradativa da monocamada. Nos frascos controle negativo não foram observados protozoários.

### Isolamento *in vivo*

Taquizoítas do protozoário não foram isolados do líquido peritoneal dos animais inoculados com as suspensões de cé-

rebros dos fetos e do bezerro. Nas passagens intra peritoneais, mesmo após a quinta passagem cega, não foram observados taquizoítas.

Em dois camundongos imunocompetentes foram observados cistos esféricos no cérebro, dez meses após as inoculações com as amostras de cérebro do bezerro soro positivo para *N. caninum*. Em um camundongo foram encontrados dois cistos, com 29 µm e 31 µm de diâmetro (Figura 1). Os dois cistos apresentavam uma parede espessa. Apenas um cisto de parede espessa e com 33 µm de diâmetro foi observado no cérebro de um gerbil, 20 meses depois da inoculação das amostras.

### Reação da Polimerase em Cadeia - PCR

Os pares de *primers* produziram fragmentos amplificados para a cepa isolada *in vitro* e para as duas cepas de *N. caninum* de referência. As cepas NC-1, NC-2 e BNC/PR3 apresentaram bandas de 328 pb com os *primers* Np21/Np6; de 376 pb com os *primers* Np21 e Np4 e de 275 pb com os *primers* Np7 e Np4. A cepa BNC/PR3 apresentou uma segunda banda, de 290 pb e 500 pb, com os *primers* Np21/Np4 e Np7/Np4, respectivamente. A cepa de referência, NC-2, também apresentou uma segunda banda de 500 pb com os *primers* Np7/Np4 e de 900 pb com os *primers* Np21/Np6 (Figura 2).

Os produtos de amplificação não foram obtidos com as amostras de DNA de *T. gondii* e das células Vero. A amplifica-

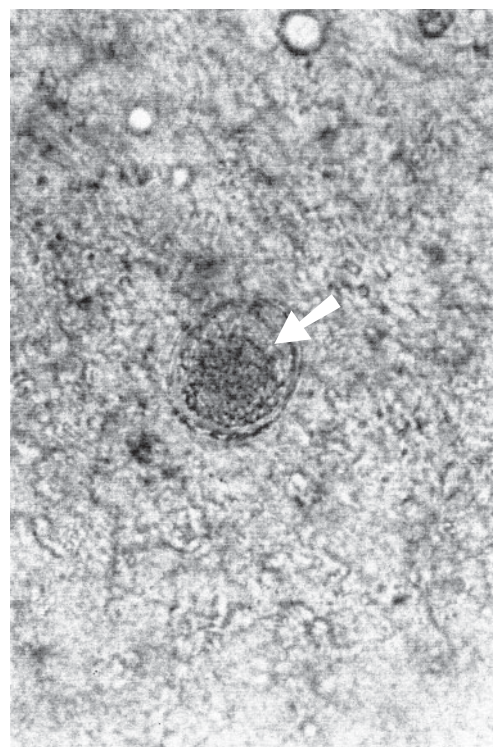


Figura 1. Cisto de *Neospora caninum*. Cisto de parede espessa (seta) com 31 mm de diâmetro, no cérebro de camundongo inoculado com amostras de cérebro de bezerro com sorologia pré-colostroal positiva para *Neospora caninum*. Sem coloração. 1.000 X.



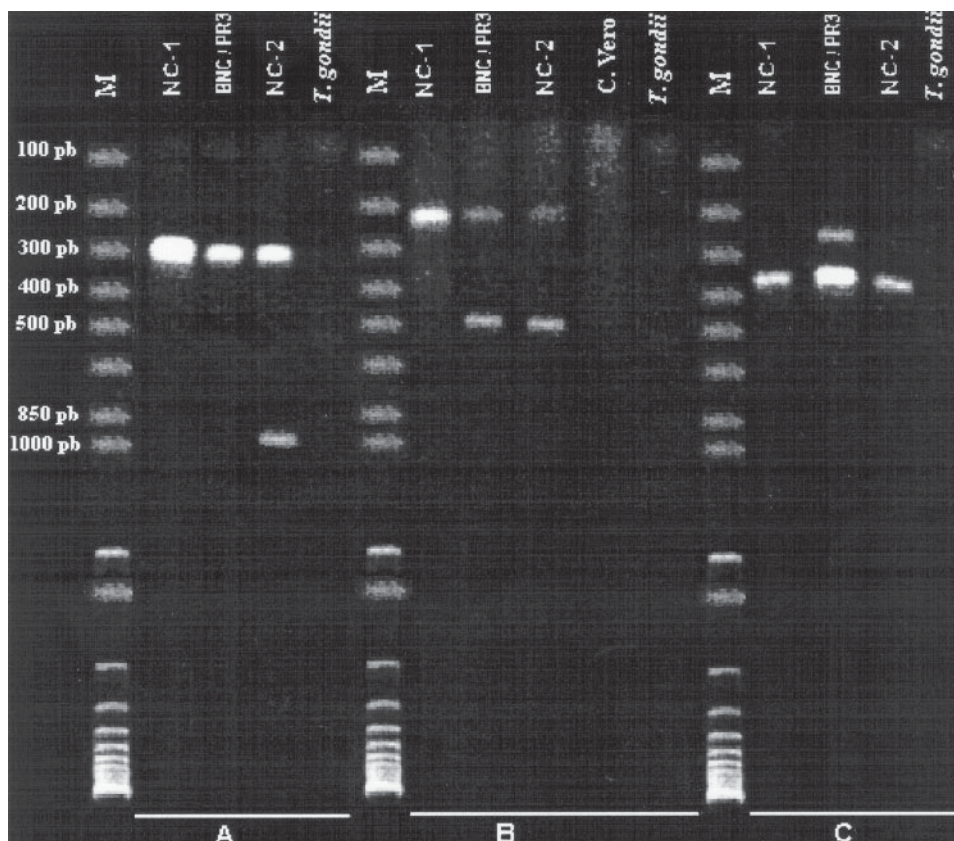


Figura 2. Produtos da PCR obtidos com a cepa de protozoário isolada de feto bovino, em três combinações de *primers*. Marcador molecular 1 kb plus DNA. **A** - *Primers* Np21 e Np6; **B** - *Primers* Np7 e Np4; **C** - *Primers* Np21 e Np4. [NC-1 e NC-2 – cepas de referência de *N. caninum*; BNC/PR3 – cepa de *N. caninum* isolada de feto bovino; RH – cepa de referência de *T. gondii*; célula Vero – célula do cultivo celular].

ção das seqüências do DNA da cepa isolada de feto bovino, utilizando-se os *primers* específicos, identificou os protozoários como pertencentes à espécie *Neospora caninum*.

#### Cultivo da cepa BNC/PR3 de *Neospora caninum*

A cepa BNC/PR3 foi mantida em cultura contínua nas células Vero e a primeira transferência dos parasitas foi realizada após 30 dias; a segunda, após 20 dias, e a terceira, após 10 dias. O período de estabelecimento do cultivo foi de 60 dias. A destruição de 80% da monocamada de células foi utilizada como parâmetro para a transferência dos parasitas para novos frascos de cultivo, na diluição de 1:2.

#### DISCUSSÃO

O isolamento de taquizoítas *in vivo* foi negativo para todas as amostras, possivelmente devido a resistência dos camundongos e gerbils a algumas cepas do parasita. A imunossupressão dos camundongos não contribuiu para isolar cepas de *N. caninum*, possivelmente porque as doses de corticosteróides não foram suficientes para inibir a produção de interferon gama. Camundongos “knockout” (KO), sem interferon gama, são os mais utilizados para o isolamento de *N. caninum* (NISHIKAWA et al., 2001), porém, apresentam um custo de aquisição e dificuldades de manutenção elevados.

O isolamento *in vitro* da cepa BNC/PR3 de *N. caninum* de um feto bovino confirmou a transmissão congênita do protozoário no rebanho de Carambeí. Os parasitas foram isolados do cérebro, principal local de encistamento do protozoário, assim como a medula espinhal (DUBEY et al., 1998). O período de isolamento de 30 dias foi similar ao período de 29 dias relatado por Davison et al. (1997), em células Vero. Os períodos de 45 e até de 60 dias também foram relatados para o isolamento de *Neospora* de bovinos, em células Vero (KIM et al., 2000; STENLUND et al., 1997). Conrad et al. (1993) isolaram duas cepas de *N. caninum* de bovinos, em 15 e 34 dias, em células bovinas, indicando que nas células Vero os períodos de isolamento podem ser mais longos. Porém, Yamane et al. (1997) isolaram uma cepa de *N. caninum* de bezerro clinicamente normal, em células endoteliais bovinas, após 49 dias. Os frascos de cultivo devem ser observados durante 60 dias, porque os inóculos podem conter poucos parasitas, o período de adaptação das cepas de *N. caninum* ao cultivo pode variar ou depender da célula usada no cultivo (DUBEY et al., 1998).

A cepa BNC/PR3 apresentou um crescimento lento, evidenciado pela transferência dos parasitas a cada 10 dias, na diluição 1:2. A taxa de proliferação parece variar entre as diferentes cepas de *Neospora*, sendo que alguns isolados multi-

plicam-se mais rapidamente do que outros, provavelmente devido a melhor adaptação ao crescimento em cultivo celular, mas a razão é desconhecida (DUBEY et al., 1998; KIM et al., 2000).

O isolamento de *N. caninum in vitro* das amostras do bezerro foi negativo, possivelmente devido a inexistência do parasita nos fragmentos coletados. Na maioria das amostras de cérebro de bovinos com neosporose, os cistos ou taquizoítas estão em número reduzido dificultando o isolamento do parasita. A obtenção das amostras das regiões submeningeal ou paraventricular do cérebro, com mais lesões e parasitas, foi considerada a principal razão do sucesso do isolamento das duas cepas de *Neospora* de bovinos na Coreia (KIM et al., 2000). O isolamento de *N. caninum* de bezerro clinicamente sadio, com infecção congênita, foi relatado apenas uma vez, no Japão (DUBEY, 2003).

Nos cérebros dos camundongos imunocompetentes e dos gerbils que receberam duas inoculações das amostras de cérebro do bezerro, foram observados poucos cistos esféricos, com parede espessa, similares aos cistos de *N. caninum*. A parede dos cistos de *N. caninum* é mais espessa ( $\geq 1 \mu\text{m}$ ) do que a parede de *T. gondii* ( $< 0,5 \mu\text{m}$ ), podendo ser diferenciados pela microscopia ótica (DUBEY et al., 2002). O número de cistos observados foi pequeno, sendo de no máximo dois cistos por camundongo e apenas um cisto por gerbil. Existem relatos desde a ausência de cistos de *N. caninum* em gerbils (BASSO et al., 2001) até numerosos (GONDIM et al., 2001). A observação dos cistos semelhantes aos de *N. caninum* nos cérebros dos camundongos e do gerbil, inoculados com amostras de cérebro do bezerro com sorologia pré-colostral positiva para *N. caninum* e negativa para *T. gondii*, indica uma neosporose congênita no bezerro (DIJKSTRA et al., 2001).

As seqüências dos *primers* utilizadas neste estudo não são encontradas no genoma de *T. gondii*, *Sarcocystis capracanis*, *S. cruzi*, *S. miescheliana*, *S. moulei*, *S. tenella* e de *Hammondia hammondi* (YAMAGE et al., 1996). Os produtos gerados com os pares Np21/Np6 e Np21/Np4 apresentaram bandas mais fortes e mais definidas na eletroforese. O par de *primers* Np21/Np6 produziu fragmentos com 328 pb para as duas cepas de referência de *N. caninum* e para a cepa isolada BNC/PR3. Estes *primers* foram utilizados para identificar cepas de *N. caninum* de cães (PETERS et al., 2000; GONDIM et al., 2001), de bovinos (SAWADA et al., 2000; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2003; GONDIM et al., 2004) e para identificar os oocistos de *N. caninum* em cães (BASSO et al., 2001). Estes *primers* também foram utilizados na identificação do parasita em camundongos com infecção experimental (McALLISTER et al., 1998) e em cérebro de ovelha com infecção natural (KOBAYASHI et al., 2001). As bandas adicionais foram observadas para a cepa de referência NC-2 e para BNC/PR3. Slapeta et al. (2002) também verificaram banda adicional para a cepa CZ-4 de *N. caninum*, na amplificação da mesma região Nc5 do DNA do protozoário.

O aborto causado por *N. caninum* ocorre em novilhas e vacas, entre os três meses de gestação até a termo, porém, o

período entre cinco e seis meses de gestação é o mais provável para ocorrer o aborto (ANDERSON et al., 2000). A cepa BNC/PR3, isolada do feto com sete meses, indicou que o sistema imune não desenvolvido do feto contribuiu para a transmissão do parasita, porque em alguns fetos o desenvolvimento imunológico ocorre no final da gestação (BARR et al., 1993).

A infecção congênita por *N. caninum* foi confirmada no rebanho, considerando o isolamento *in vitro* da cepa do protozoário, BNC/PR3, de um feto de sete meses, de vaca soro positiva, com histórico de três abortos consecutivos e sem descendentes. A transmissão congênita ou transplacentária de *N. caninum* é considerada a principal via de infecção em bovinos, enquanto que *H. heydorni* não é transmitida por esta via (DIJKSTRA et al., 2001; DUBEY et al., 2002). *Hammondia heydorni* também não pode ser mantida em cultivo celular (DUBEY et al., 2002). Anticorpos contra *T. gondii* não foram detectados na mãe do feto com neosporose e o parasita também não foi isolado, afastando a possibilidade de aborto por *T. gondii*.

Segundo revisão feita por Dubey em 2003 e por Gennari em 2004, no Brasil existem relatos da presença de anticorpos contra *N. caninum* em bovinos, búfalos, cães, gatos, ovinos, caprinos e em animais silvestres como cachorros do mato, cervídeos, gambás e capivaras (DUBEY, 2003; GENNARI, 2004). Em eqüinos os anticorpos contra *N. caninum* foram detectados em éguas com histórico de aborto no Paraná (LOCATELLI-DITTRICH, 2002).

A detecção de *N. caninum* por imunohistoquímica, em fetos no Rio Grande do Sul (CORBELLINI et al., 2002), o isolamento do protozoário de um cão, na Bahia (GONDIM et al., 2001), de um bezerro com cegueira congênita, no Paraná (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2003) e do feto bovino deste estudo, reforçam a necessidade de incluir o parasita no diagnóstico de abortos e doenças neurológicas de bovinos.

## CONCLUSÕES

Este é o primeiro relato de isolamento de *Neospora caninum* de feto no Brasil, o que confirma a presença e a transmissão congênita do parasita no rebanho bovino avaliado. O rebanho apresentava um histórico de ocorrência de vários abortos, de uma elevada soro prevalência de anticorpos contra *N. caninum* (34,8%) e de um risco quatro vezes maior de aborto nas vacas soro positivas. O nascimento de bezerros com sorologia pré-colostral positiva e filhos de vacas soro positivas também foi observado. Na propriedade é realizado um controle sanitário para as outras doenças reprodutivas e as estratégias de controle da neosporose também serão adotadas para diminuir o número de abortos e os prejuízos causados pela doença.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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



- 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, n. 1, p. 113-117, 1993.
- BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M. C.; HILL, D. E.; KWOK, O.C.H.; SHEN, S.K.; DUBEY, J.P. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *Journal of Parasitology*, v. 87, n. 3, p. 612-618, 2001.
- BASZLER, T.V.; GAY, L.J.C.; LONG, M.T.; MATHISON, B.A. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 12, p. 4059-4064, 1999.
- CONRAD, P.A.; BARR, B.C.; SVERLOW, K.W.; ANDERSON, M.L.; DAFT, B.; KINDE, H.; DUBEY, J.P.; MUNSON, L.; ARDANS, A. *In vitro* isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine fetuses. *Parasitology*, v. 106, n. 3, p. 239-249, 1993.
- 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, n. 3, p. 195-202, 2002.
- DAVISON, H.C.; TREES, A.J.; GUY, F.; OTTER, A.; HOLT, J.J.; SIMPSON, V.R.; JEFFREY, M. Isolation of bovine *Neospora* in Britain. *Veterinary Record*, v. 141, n. 23, p. 607, 1997.
- DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H.W.; EYSKER, M.; WOUDE, W. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *International Journal for Parasitology*, v. 31, n. 2, p. 209-215, 2001.
- DUBEY, J.P.; DOROUGH, K.R.; JENKINS, M.C.; LIDDEL, S.; SPEER, C.A.; KWOK, O.C.H.; SHEN, S.K. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. *International Journal for Parasitology*, v. 28, n.8, p. 1293-1304, 1998.
- 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.; MATTSSON, 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.L.; LINDSAY, D.S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *International Journal for Parasitology*, v. 32, n. 8, p. 929-946, 2002.
- DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean Journal of Parasitology*, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2003.
- GENNARI, S.M. *Neospora caninum* no Brasil: Situação Atual da Pesquisa. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.13, n. 1, p. 23-28, 2004.
- GONDIM, L.F.P.; PINHEIRO, A.M.; SANTOS, P.O.M.; JESUS, E.E.V.; RIBEIRO, M.B.; FERNANDES, H.S.; ALMEIDA, M.A.O.; FREIRE, S.M.; MEYER, R.; McALLISTER, M.M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. *Veterinary Parasitology*, v. 101, n. 1, p. 1-7, 2001.
- 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, 2004.
- GUIMARÃES JÚNIOR, J.S.; SOUZA, S.L.; BERGAMASCHI, D.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in cattle of the north of Paraná state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 124, n. 1-2, p. 1-8, 2004.
- KIM, J.; SOHN, H.; HWANG, W.; HWANG, E.; JEAN, Y.; YAMANE, I.; KIM, D. *In vitro* isolation and characterization of bovine *Neospora caninum* in Korea. *Veterinary Parasitology*, v. 90, n. 1-2, p. 147-154, 2000.
- KOBAYASHI, Y.; YAMADA, M.; OMATA, Y.; KOYAMA, T.; SAITO, A.; MATSUDA, T.; OKUYAMA, K.; FUJIMOTO, S.; FURUOKA, H.; MATSUI, T. Naturally-occurring *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses. *Journal of Parasitology*, v. 87, n. 2, p. 434-436, 2001.
- LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V.T.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; VINNE, R.; PINCKNEY, R.D. Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in Southern Brazil. *Journal of Parasitology*, v. 87, n. 6, p. 1493-1494, 2001.
- LOCATELLI-DITTRICH, R. *Diagnóstico sorológico, isolamento, cultivo e caracterização molecular de Neospora caninum em bovinos leiteiros e em eqüinos no Estado do Paraná, Brasil*. 2002. 184p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.
- LOCATELLI-DITTRICH, R.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; PINCKNEY, R.D.; SOUSA, R.S.; LEITE, L.C.; THOMAZ-SOCCOL, V. Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Paraná, southern Brazil. *The Veterinary Record*, v. 153, n. 12, p. 366-367, 2003.
- 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 of Parasitology*, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, 1998.
- NISHIKAWA, Y.; TRAGOOLPUA, K.; INOUE, N.; MAKALA, L.; NAGASAWA, H.; OTSUKA, H.; MIKAMI, T. In the absence of endogenous gamma interferon, mice acutely infected with *Neospora caninum* succumb to a lethal immune response characterized by inactivation of peritoneal macrophages. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 8, n. 4, p. 811-816, 2001.
- OGAWA, L.; NAVARRO, I.T.; VIDOTO, O.; FREIRE, R.L.; GONDIM, L.F.P.; MARANA, E.R.M.; SILVA, E.H.; SEDEMAKA, T.M.; DAMAS, A.C.; MATTOS, M.R.; PRUDENCIO, L.B.; TSUTSUI, V.S.; SANTOS, A.P.M. Avaliação sorológica do *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em bovinos de leite da região do norte do Paraná.

- In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11, 1999, Salvador, *Anais...* Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999. p. 225.
- PETERS, M.; WAGNER, F.; SCHARES, G. Canine neosporosis: clinical and pathological findings and first isolation of *Neospora caninum* in Germany. *Parasitology Research*, v. 86, n.1, p. 1-7, 2000.
- RAGOZO, A.M.A.; PAULA, V.S.O.; SOUZA, S.L.P.; BERGAMASCHI, D.P.; GENNARI, S.M. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis estados brasileiros. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.12, n.1, p.33-37, 2003.
- SAWADA, M.; KONDO, H.; TOMIOKA, Y.; PARK, C.; MORITA, T.; SHIMADA, A.; UMEMURA, T. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. *Veterinary Parasitology*, v. 90, n. 3, p. 247-252, 2000.
- SLAPETA, J.R.; MODRY, D.; KYSELOVÁ, I.; HOREJS, R.; LUKES, J.; KOUDELA, B. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. *Veterinary Parasitology*, v. 109, n. 3-4, p. 157-167, 2002.
- STENLUND, S.; BJÖRKMAN, C.; HOLMDAHL, O.J.M.; KINDAHL, H.; UGGLA, A. Characterization of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*. *Parasitology Research*, v. 83, n. 3, p. 214-219, 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. *Journal of Parasitology*, v. 82, n. 2, p. 272-279, 1996.
- YAMANE, I.; KOKUHO, T.; SHIMURA, K. ETO, M.; SHIBAHARA, T.; HARITANI, M. OUCHI, Y.; SVERLOW, K.; CONRAD, P.A. *In vitro* isolation and characterization of a bovine *Neospora* species in Japan. *Research in Veterinary Science*, v. 63, n. 1, p. 77-80, 1997.

Recebido em 22 de julho de 2004.

Aceito para publicação em 10 de outubro de 2004.