

DANIELE CRISTINE SILVEIRA HOFFMANN

**CINÉTICA, AVALIAÇÃO DA TRANSMISSÃO VERTICAL E
MONITORAMENTO DA TRANSFERÊNCIA PASSIVA DE
ANTICORPOS ANTI-*Neospora* sp. EM EQUÍNOS.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Patologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosangela
Locatelli Dittrich

CURITIBA
2007

**DEDICO ESTE TRABALHO AOS MEUS QUERIDOS E AMADOS
PAIS TÂNIA E SALÉSIO, PELO APOIO E INCENTIVO EM TODAS AS
MINHAS ESCOLHAS, PELO AMOR, FIRMEZA, TERNURA, DEDICAÇÃO E
COMPANHEIRISMO CONSTANTE SEM MINHA VIDA!
AMO VOCÊS!!!!**

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me proporcionar mais uma grande conquista em minha vida!

*Agradeço imensamente ao meu grande amor e eterno companheiro, **Leonardo**, pela paciência, dedicação, compreensão, incentivo e respeito constantes. Amo você!*

*Agradeço de maneira especial à minha orientadora, **Professora Doutora Rosangela Locatelli Dittrich**. Agradeço imensamente sua amizade e confiança, dando-me a oportunidade de trabalhar em conjunto desde a graduação. Seus ensinamentos e experiências passados a mim com muita paciência, dedicação e ética foram, são e serão motivo de orgulho e incentivo para as minhas próximas conquistas profissionais. Meu eterno reconhecimento e gratidão!*

*À médica veterinária **Katherinne**, pela amizade, apoio e ajuda constantes!*

*Ao médico veterinário **Joaquim Antunes e demais funcionários do Haras São José da Serra** pela disposição, amizade e colaboração na execução deste trabalho!*

*Aos **colegas médicos veterinários e funcionários do laboratório de Patologia Clínica da UFPR**, pelo incentivo, amizade e apoio!*

*Aos **colegas médicos veterinários e funcionários do laboratório de Diagnóstico Marcos Enrietti**, pela amizade e pelos ensinamentos de cultivo celular e demais técnicas laboratoriais!*

*Agradeço aos **professores do Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná**, pelos ensinamentos!*

*À **Universidade Federal do Paraná**, órgão público que enfrenta e contorna os obstáculos ocasionados pela descrença e descaso de muitas pessoas, mas apesar de tudo continua sendo uma das melhores entidades de ensino superior do Brasil. Meu reconhecimento e orgulho!*

*Aos **animais**, seres admiráveis e grandes inspiradores de meu trabalho e realização!*

“... Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o címbalo que retine. E ainda que tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria. E ainda que distribuísse todos os meus bens para sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, e não tivesse amor, nada disso me aproveitaria. O amor é sofredor, é benigno; o amor não é invejoso; o amor não se vangloria, não se envaidece; não se porta inconvenientemente, não busca os seus próprios interesses, não se irrita, não suspeita mal; não se regozija com a injustiça, mas se regozija com a verdade; tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta. O amor jamais acaba; mas havendo profecias, serão aniquiladas; havendo línguas, cessarão; havendo ciência, desaparecerá. Quando eu era menino, pensava como menino; mas, logo que cheguei a ser homem, acabei com as coisas de menino. Porque agora vemos como por espelho, em enigma, mas então veremos face a face; agora conheço em parte, mas então conhecerei plenamente, como também sou plenamente conhecido. Agora, pois, permanecem a fé, a esperança, o amor, estes três; mas o maior destes é o amor ”.

I CORÍNTIOS 13

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	01
2 JUSTIFICATIVAS	02
3 OBJETIVOS	03
3.1 OBJETIVO GERAL	03
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	03
NEOSPOROSE EQUINA	04
4 REVISÃO DE LITERATURA	04
4.1 HISTÓRICO	04
4.2 ESTRUTURA E BIOLOGIA DE <i>Neospora sp.</i>	05
4.2.1 Taquizoítas	05
4.2.2 Cistos e bradizoítas	06
4.2.3 Oocistos	06
4.3 FORMAS DE INFECÇÃO DE <i>Neospora sp.</i>	07
4.4 SINAIS CLÍNICOS	08
4.4.1 Problemas Reprodutivos	09
4.4.2 Problemas Neurológicos	10
4.5 DIFERENÇAS MOLECULARES ENTRE <i>Neospora caninum</i> e <i>Neospora hughesi</i> ..	10
4.6 DIAGNÓSTICO DE <i>Neospora caninum</i> e <i>Neospora hughesi</i>	11
4.6.1 Métodos de Diagnóstico Sorológico	11
4.6.2 Métodos de Diagnóstico Parasitológico	13
4.6.2.1 Lesões Histopatológicas do Protozoário <i>Neospora sp.</i>	14
4.7 SOROPREVALÊNCIA DE <i>Neospora sp.</i> EM EQUINOS	15
4.8 RELAÇÃO HOSPEDEIRO-PARASITA	16
4.9 CONTROLE E TRATAMENTO DA NEOSPOROSE	18
4.10 SITUAÇÃO ATUAL E PERSPECTIVAS DA IMUNIZAÇÃO EM BOVINOS	19
IMUNIDADE DO POTRO E IMUNIDADE PASSIVA	21
4.11 INTRODUÇÃO	21
4.12 IMUNIDADE DO POTRO	21
4.13 IMUNIDADE PASSIVA	22

4.13.1	Metabolismo dos Anticorpos Maternos	23
5	MATERIALE MÉTODOS	25
5.1	ÁREA GEOGRÁFICA PARA OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	25
5.2	COLHEITAS DAS AMOSTRAS SANGUÍNEAS	25
5.3	CULTIVO CELULAR	26
5.4	CULTIVO DE <i>Neospora caninum</i>	26
5.5	REAÇÃO DA IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA (IFI)	27
5.5.1	Preparo das Lâminas de IFI	27
5.5.2	Técnica da Imunofluorescência Indireta	28
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
6	RESULTADOS	30
6.1	SOROPREVALÊNCIA DAS ÉGUAS E DOS POTROS	30
6.1.1	Titulação 1:50 das éguas	30
6.1.1.1	Soroprevalência das éguas com e sem histórico de perdas reprodutivas	32
6.1.2	Titulação 1:100 das éguas	32
6.1.2.1	Soroprevalência das éguas com e sem histórico de perdas reprodutivas	35
6.1.3	Titulação 1:50 dos potros	37
6.1.3.1	Soroprevalência dos potros nascidos de mães com e sem histórico de perdas reprodutivas	40
6.1.4	Titulação 1:100 dos potros	40
6.1.4.1	Soroprevalência dos potros nascidos de mães com e sem histórico de perdas reprodutivas	44
6.2	MONITORAMENTO SOROLÓGICO DAS ÉGUAS E DOS POTROS	45
6.2.1	Titulação 1:50 das éguas	45
6.2.2	Titulação 1:100 das éguas	45
6.1.1	Titulação 1:50 dos potros	46
6.2.4	Titulação 1:100 dos potros	47
7	DISCUSSÃO	48
8	CONCLUSÕES	56
9	REFERÊNCIAS	57
10	ANEXOS	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PERÍODO DE TEMPO DE PERMANÊNCIA DOS ANTICORPOS MATERNOS PARA ALGUMAS DOENÇAS EQUINAS.....	24
TABELA 2 – RESULTADOS SOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp.</i> DAS ÉGUAS NO 8º, 9º, 10º E 11º MESES DE GESTAÇÃO A PARTIR DA DILUIÇÃO 1:50.....	31
TABELA 3 – RESULTADOS SOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp.</i> DAS ÉGUAS NO 8º, 9º, 10º E 11º MESES DE GESTAÇÃO A PARTIR DA DILUIÇÃO 1:100.....	33
TABELA 4 – SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>Neospora sp.</i> CONFORME AS TITULAÇÕES NO 8º, 9º, 10º E 11º MESES DE GESTAÇÃO DAS ÉGUAS.....	34
TABELA 5 – RESULTADOS SOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp.</i> DAS ÉGUAS SEM HISTÓRICO DE PERDAS REPRODUTIVAS NOS ÚLTIMOS QUATRO MESES DE GESTAÇÃO E DE SEUS RESPECTIVOS POTROS NOS PRIMEIROS CINCO MESES DE VIDA	36
TABELA 6 – RESULTADOS SOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp.</i> DAS ÉGUAS COM HISTÓRICO DE PERDAS REPRODUTIVAS NOS ÚLTIMOS QUATRO MESES DE GESTAÇÃO E DE SEUS RESPECTIVOS POTROS NOS PRIMEIROS CINCO MESES DE VIDA.....	36
TABELA 7 – RESULTADOS SOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp.</i> DOS POTROS NO 1º, 2º, 3º, 4º E 5º MESES DE VIDA A PARTIR DA DILUIÇÃO 1:50	38
TABELA 8 – RESULTADOS SOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp.</i> DOS POTROS NO 1º, 2º, 3º, 4º E 5º MESES DE VIDA A PARTIR DA DILUIÇÃO 1:100.....	41
TABELA 9 - SOROPREVALÊNCIA DOS ANTICORPOS ANTI- <i>Neospora sp.</i> CONFORME AS TITULAÇÕES DOS POTROS PRÉ-COLOSTRAIS E NO 1º, 2º, 3º, 4º E 5º MESES DE VIDA.....	43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>Neospora sp</i> A PARTIR DA DILUIÇÃO 1:50 DE TODAS AS ÉGUAS NO 8º, 9º, 10º E 11º MESES DE GESTAÇÃO.....	30
FIGURA 2 – SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>Neospora sp</i> A PARTIR DA DILUIÇÃO 1:100 DE TODAS AS ÉGUAS NO 8º, 9º, 10º E 11º MESES DE GESTAÇÃO.....	33
FIGURA 3 – SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>Neospora sp</i> . NAS DIFERENTES TITULAÇÕES NO 8º, 9º, 10º E 11º MESES DE GESTAÇÃO DAS ÉGUAS.....	35
FIGURA 4 – SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>Neospora sp</i> A PARTIR DA DILUIÇÃO 1:50 DE TODOS OS POTROS DURANTE OS PRIMEIROS CINCO MESES DE VIDA.....	37
FIGURA 5 – SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS anti- <i>Neospora sp</i> . A PARTIR DA DILUIÇÃO 1:100 DE TODOS OS POTROS DURANTE OS CINCO PRIMEIROS MESES DE VIDA.....	40
FIGURA 6 – SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>Neospora sp</i> . NAS DIFERENTES TITULAÇÕES DURANTE OS CINCO PRIMEIROS MESES DE VIDA DOS POTROS.....	44
FIGURA 7 – RESULTADOS SOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp</i> . DAS ÉGUAS NO 8º, 9º, 10º E 11º MESES DE GESTAÇÃO.....	46
FIGURA 8 – RESULTADOS SOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp</i> . DOS POTROS NO 1º, 2º, 3º, 4º E 5º MESES DE VIDA.....	47
FIGURA 9 – RESULTADOS SOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp</i> . DA ÉGUA 1.....	66
FIGURA 10 - RESULTADOS SOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp</i> . DO POTRO FILHO DA ÉGUA 1.....	66
FIGURA 11 - RESULTADOS SOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp</i> . DA ÉGUA 2.....	67
FIGURA 12 - RESULTADOS SOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp</i> . DO POTRO FILHO DA ÉGUA 2.....	67
FIGURA 13 - RESULTADOS SOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp</i> . DA ÉGUA 3.....	68
FIGURA 14 - RESULTADOS SOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp</i> . DO POTRO FILHO DA ÉGUA 3.....	68
FIGURA 15 - RESULTADOS SOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp</i> . DA ÉGUA 4.....	69
FIGURA 16 - RESULTADOS SOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp</i> . DO POTRO FILHO DA ÉGUA 4.....	69

FIGURA 17 - RESULTADOSSOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp.</i> DA ÉGUA 5.....	70
FIGURA 18 - RESULTADOS SOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp.</i> DO POTRO FILHO DA ÉGUA 5.....	70
FIGURA 19 - RESULTADOSSOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp.</i> DA ÉGUA 6.....	71
FIGURA 20 - RESULTADOS SOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp.</i> DO POTRO FILHO DA ÉGUA 6.....	71
FIGURA 21 - RESULTADOSSOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp.</i> DA ÉGUA 7.....	72
FIGURA 22 - RESULTADOSSOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp.</i> DA ÉGUA 8.....	72
FIGURA 23 - RESULTADOS SOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp.</i> DA ÉGUA 9.....	73
FIGURA 24 - RESULTADOS SOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp.</i> DO POTRO FILHO DA ÉGUA 9.....	73
FIGURA 25 - RESULTADOSSOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp.</i> DA ÉGUA 10....	74
FIGURA 26 - RESULTADOS SOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp.</i> DO POTRO FILHO DA ÉGUA 10.....	74
FIGURA 27 - RESULTADOSSOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp.</i> DA ÉGUA 11....	75
FIGURA 28 - RESULTADOS SOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp.</i> DO POTRO FILHO DA ÉGUA 11.....	75
FIGURA 29 - RESULTADOSSOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp.</i> DA ÉGUA 12....	76
FIGURA 30 - RESULTADOS SOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp.</i> DO POTRO FILHO DA ÉGUA 12.....	76
FIGURA 31 - RESULTADOSSOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp.</i> DA ÉGUA 13....	77
FIGURA 32 - RESULTADOSSOROLÓGICOS ANTI- <i>Neospora sp.</i> DA ÉGUA 14....	77

RESUMO

O presente estudo teve por objetivos avaliar a soroprevalência e a dinâmica dos anticorpos anti-*Neospora sp.* em éguas gestantes e seus respectivos descendentes, possibilitando o estudo da patogênese e transmissão vertical do protozoário e da transferência passiva dos anticorpos maternos; e verificar a associação entre soropositividade ao protozoário *Neospora sp.* e perda reprodutiva eqüina. Foram analisadas, pela técnica de imunofluorescência indireta, amostras séricas de 14 fêmeas no 8º, 9º, 10º e 11º meses de gestação, e de seus respectivos potros pré-colostrais e no 1º, 2º, 3º, 4º e 5º meses de vida. Foram utilizadas as diluições 1:16, para os potros pré-colostrais, 1:50 e 1:100 para os potros a partir do 1º mês de vida e para as éguas gestantes. Na diluição 1:50, o 8º mês de gestação foi o que apresentou a maior soroprevalência ($8/14 = 57\%$), e o 10º mês foi o que apresentou o maior número de conversões soropositivas. Do total das éguas testadas, 12 (85,7%) apresentaram soropositividade em pelo menos um mês de gestação. Deste total de positivas, sete foram soropositivas no 11º mês de gestação, das quais três apresentaram a maior titulação: 1:200 e 1:400 e seus potros foram a óbito no 1º mês de vida. Na diluição 1:100, o 11º mês foi o que apresentou a maior soroprevalência ($4/14 = 29\%$), e o 10º e 11º meses foram os que apresentaram o maior número de conversões soropositivas. Do total das éguas testadas, nove (64%) foram soropositivas em pelo menos um mês de gestação, sendo que quatro foram soropositivas no 11º mês de gestação. Não foi verificada associação entre soropositividade ao protozoário *Neospora sp.* e perda reprodutiva nas duas diluições. Todas as amostras séricas de potros pré-colostrais foram negativas para *Neospora sp.* Na diluição 1:50, apenas três potros tornaram-se positivos para *Neospora sp.* no primeiro mês de vida, e o terceiro e quarto meses foram os que apresentaram a maior soroprevalência e os maiores números de conversões soropositivas. Na diluição 1:100, apenas dois potros foram soropositivos no primeiro mês, sendo considerado o mês de maior soroprevalência. Ocorreu uma baixa eficiência da transferência passiva de anticorpos maternos anti-*Neospora sp.* Tanto na população de éguas gestantes quanto na população de potros verificou-se uma acentuada flutuação dos níveis séricos de anticorpos. As soroprevalências encontradas permitem sugerir a inclusão deste protozoário no diagnóstico diferencial de doenças neurológicas e reprodutivas em eqüinos.

Palavras-Chave: *Neospora sp.*, éguas gestantes, potros, anticorpos, soroprevalência, dinâmica.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the seroprevalence and anti-*Neospora sp.* antibodies dynamic in pregnant mares and their offspring, enabling the study of the pathogenesis and vertical transmission of the protozoa and the passive antibodies transmission from mother to son and also evaluate the connection between seropositivity to *Neospora sp.* protozoa and equine reproductive loss. Serum samples of 14 mares in the 8^o, 9^o, 10^o and 11^o month of pregnancy and their respective precolostrum foal in the 1^o, 2^o, 3^o, 4^o and 5^o month were evaluated by the indirect immunofluorescence technique. The dilutions used were 1:16, for the precolostrum foals, 1:50 and 1:100 for the foals and mares. In the 1:50 dilution the 8^o month of pregnancy showed the highest seroprevalence (8/14 = 57%) and the 10^o month showed the highest seropositive conversion. Seropositivity was observed in at least one month during the pregnancy in 12 (85.7%) mares. In the 11^o month of pregnancy seven mares were seropositive, 3 of those showing the higher titration : 1:200 and 1:400 and their foal died in the 1^o month after birth. In the 1:100 dilution, the 11^o month showed the highest seroprevalence (4/14 = 29%) and the 10^o and 11^o months showed the highest seropositive conversions. From the total tested mares, 9 (64%) were seropositive in at least one month during the pregnancy, four of those being positive during the 11^o month. Relation between seropositivity to *Neospora sp.* protozoa and reproductive loss in both dilutions was not observed. All pre-colostrum serum samples were negative to *Neospora sp.*, 3 foals became positive to *Neospora sp.* during the first month after birth in the 1:50 dilution and the 3^o and 4^o months after birth showed the highest seroprevalence and the highest seropositive conversion. Only two foals were seropositive in the 1:100 dilution in the 1^o month, considered to be the month with the highest seroprevalence. There was a decrease in the anti-*Neospora sp.* antibodies passive transfer from the mare to the foal. In both pregnant mares and foals groups it was observed an important fluctuation in the antibodies serum levels. The seroprevalence found suggests the importance of including this protozoa in the differential diagnosis of neurological and reproductive diseases in equines.

Key-words: *Neospora sp.*, pregnant mares, foal, antibodies, seroprevalence, dynamic.

1 INTRODUÇÃO

O protozoário *Neospora caninum* é responsável por diversos casos de abortos de bovinos de vários países. Em eqüinos, a sua patogenia e conseqüências são pouco conhecidas.

A neosporose é uma doença causada pelos protozoários *Neospora caninum* e *Neospora hughesi*, parasitas intracelulares obrigatórios, pertencentes ao *phylum* Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidiida e família Sarcocystidae (DUBEY *et al.*, 1988 a, b; MARSH *et al.*, 1998).

Em 1984, na Noruega, BJERKAS *et al.* observaram um protozoário semelhante ao *T. gondii* em tecidos de cães. Em 1988, DUBEY *et al.* identificaram infecções por *N. caninum* em cães com quadro clínico de encefalomielite. Em 1989, *N. caninum* foi identificado em placenta de bovinos (SHIVAPRASAD *et al.*, 1989) e em bezerros com paralisia neonatal (DUBEY *et al.*, 1989), e em 1990, em bezerros natimortos (DUBEY *et al.*, 1990).

Em 1998, MARSH *et al.* isolaram um protozoário semelhante ao *N. caninum*, de cérebro e medula espinhal de um cavalo que apresentava sinais compatíveis com a mieloencefalite protozoária (MEP), denominando esta nova espécie de *N. hughesi*.

O parasita *N. caninum* tem como hospedeiros definitivos o cão e o coioote, e infecta os bovinos, ovinos, caprinos, cervos, eqüinos e cães (DUBEY *et al.*, 2002). O hospedeiro definitivo de *N. hughesi* não foi ainda determinado, permanecendo incerta a forma de exposição dos cavalos a este parasita e a existência de outros hospedeiros intermediários (HOANE *et al.*, 2006).

Nos eqüinos, as espécies *N. caninum* e *N. hughesi* são infectantes. Nestes animais, a forma clínica da doença caracteriza-se por aborto, doença neonatal e encefalomielite (LINDSAY, 2001; CIARAMELLA *et al.*, 2004). A importância da transmissão vertical de neosporose em eqüinos foi descrita por DUBEY e PORTERFIELD (1990), que detectaram taquizoítas em pulmão de um feto abortado. A partir de então, poucos relatos de neosporose clínica foram descritos. Existem poucas informações sobre a infecção transplacentária por este parasita em eqüinos (PITEL *et al.*, 2003b).

A descoberta de uma outra espécie de protozoário como causa de MEP lançou um novo desafio ao diagnóstico e tratamento da doença, considerando que *N. hughesi* causa a MEP assim como *Sarcocystis neurona* (VARDELEON *et al.*, 2001). Casos esporádicos de neosporose clínica têm sido descritos em cavalos nos EUA e França, e é incerto se *N. caninum*, *N. hughesi*, ou ambos, são os responsáveis (LINDSAY, 2001; DUBEY, 2003). Apesar de existirem relatos de neosporose em eqüinos, as conseqüências de uma infecção por *Neospora sp.* são ainda pouco conhecidas nestes animais (MCDOLE e GAY, 2002).

Em bovinos, alguns estudos verificaram uma flutuação dos níveis séricos de anticorpos. SAGER *et al.* em 2001, em duas investigações sorológicas com intervalo de tempo de três a doze meses, verificaram uma diminuição da soroprevalência de 17 a 12%. Das 3008 vacas, noventa soroconverteram de negativo a positivo, e 212 de 543 vacas inicialmente positivas tornaram-se soronegativas no reteste.

KYAW *et al.* em 2005, observaram que todas as vacas avaliadas e inicialmente positivas converteram soronegativamente (4/4) no momento do parto, e três de seus bezerros não se infectaram.

Nos eqüinos, os estudos se concentram em investigações epidemiológicas, não avaliando a cinética e o comportamento dos anticorpos durante um determinado período de tempo e nem sua importância no papel da defesa imune contra o protozoário *Neospora sp.*

2 JUSTIFICATIVAS

Este trabalho visou contribuir com a escassa literatura de neosporose em eqüinos. No Brasil são freqüentes os casos de abortos e alterações neurológicas sem um diagnóstico definitivo, e a neosporose não é incluída como rotina nos exames laboratoriais.

A falta de diagnóstico da neosporose em eqüinos pode ser atribuída ao desconhecimento deste protozoário como possível causa de abortos e doenças neurológicas, e ao custo elevado dos métodos diagnósticos de ELISA, Imunofluorescência Indireta, isolamento e cultivo do parasita.

No Brasil, existem apenas quatro estudos de soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora sp.* em eqüinos (DUBEY *et al.*, 1999; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2006; HOANE *et al.*, 2006; VILLALOBOS *et al.*, 2006). Apenas dois estudos evidenciaram a ocorrência de transmissão vertical, através do isolamento de *Neospora sp.* de dois fetos abortados e da sorologia positiva de dois potros recém-nascidos antes da ingestão de colostro (LOCATELLI-DITTRICH, 2002; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2006).

Sabe-se que nos bovinos ocorre uma flutuação dos níveis séricos de anticorpos (SCHARES *et al.*, 1998; SAGER *et al.*, 2001; KYAW *et al.*, 2005; HÄSLER *et al.*, 2006). Já nos eqüinos, as conseqüências da neosporose e a importância da transmissão vertical são pouco conhecidas. Não existem informações quanto à cinética dos anticorpos anti-*Neospora sp.* e a eficiência da transmissão vertical do parasita e da transmissão passiva dos anticorpos.

3 OBJETIVOS

Considerando-se os fatores como a ocorrência de abortos e doenças neurológicas em eqüinos e a escassez de informações sobre neosporose em eqüinos no Brasil; e, a possibilidade de existir flutuações nos níveis séricos de anticorpos nesta espécie como ocorre nos bovinos, os objetivos deste estudo foram:

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a soroprevalência e a dinâmica dos anticorpos anti-*Neospora sp.* em éguas gestantes e seus respectivos descendentes, possibilitando o estudo da patogênese, transmissão vertical e transferência passiva dos anticorpos maternos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Cultivar o protozoário *N. caninum in vitro* para a produção de antígenos e confecção das lâminas de Imunofluorescência Indireta (IFI);
- 3.2.2 Promover o aumento da virulência da cepa de referência NC-1 de *N. caninum in vivo*;
- 3.2.3 Realizar o monitoramento sorológico de neosporose em éguas gestantes nos últimos quatro meses de gestação;
- 3.2.4 Realizar o monitoramento sorológico de neosporose nos potros descendentes nos primeiros cinco meses de vida;
- 3.2.5 Verificar a associação entre soropositividade ao protozoário *Neospora sp.* e perda reprodutiva eqüina.

NEOSPOROSE EQUINA

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 HISTÓRICO

A primeira detecção de *Neospora* sp. em eqüinos foi realizada por DUBEY & PORTERFIELD em 1990. Eles encontraram taquizoítas de *N. caninum* em tecido pulmonar de um feto prematuro, evidenciando a ocorrência da transmissão vertical.

Parasitas semelhantes ao *T. gondii* foram observados no fígado e músculo esquelético de um feto de oito meses na Itália (DUBEY *et al.*, 1999). PRONOST *et al.* (1999) descreveram um caso de aborto eqüino por *N. caninum* na França.

PITEL *et al.* (2003) detectaram DNA de *N. caninum* em 3/91 cérebros e 2/77 corações de fetos abortados, e 1/1 placenta de égua, na Normandia, França.

O isolamento de *Neospora* sp. de feto eqüino no Paraná demonstrou a presença do parasita no Brasil, indicando que o diagnóstico de neosporose deveria ser incluído nos casos de aborto (LOCATELLI-DITTRICH, 2002).

Em 1998, MARSH *et al.* identificaram uma nova espécie de *Neospora* proveniente de um cavalo adulto que apresentava severa incoordenação motora. O parasita foi isolado em cultivo celular e denominaram esta nova espécie de *N. hughesi*, através das diferenças estruturais e moleculares com o *N. caninum*.

A partir de então, duas cepas de *N. hughesi* foram isoladas nos EUA, da medula espinhal de eqüinos adultos com MEP, por CHEADLE *et al.* (1999), no Alabama, e por DUBEY *et al.* (2001), em Oregon.

Antes da descoberta da espécie *N. hughesi*, todos os casos de MEP eram atribuídos ao *S. neurona*. HAMIR *et al.* (1993), em um estudo retrospectivo de cavalos que apresentavam MEP, detectaram 67% de reação ao *S. neurona* pela imunohistoquímica. Assim, os demais casos poderiam estar relacionados ao protozoário *N. hughesi*.

Historicamente, a maioria dos casos de neosporose eqüina atribuíram-se ao protozoário *N. caninum*. Entretanto, permanece incerto se os dois protozoários, *N. caninum* e *N. hughesi*, estão envolvidos ou somente *N. hughesi* é o responsável pela doença nos eqüinos (DUBEY e PORTERFIELD, 1990; MARSH *et al.*, 1998).

4.2 ESTRUTURA E BIOLOGIA DE *Neospora sp.*

Os estágios do ciclo de vida de *Neospora caninum* são os taquizoítas, os cistos contendo os bradizoítas e os oocistos (MCALLISTER *et al.*, 1998).

Os estágios do ciclo de vida conhecidos de *Neospora hughesi* são os taquizoítas e os cistos contendo os bradizoítas. Os oocistos não foram detectados, permanecendo incerta a forma de exposição dos cavalos a este parasita (MARSH *et al.*, 1998).

O hospedeiro definitivo de *N. caninum* foi observado em 1998, quando os cães, após a ingestão de cérebros de camundongos contendo cistos de *N. caninum*, eliminaram os oocistos não esporulados nas fezes. Os estágios intestinais do parasita ainda não foram descritos, sendo o cão considerado hospedeiro definitivo e intermediário (MCALLISTER *et al.*, 1998).

O hospedeiro definitivo de *N. hughesi* é desconhecido (HOANE *et al.*, 2006), sendo que MARSH *et al.* (1998) observaram os taquizoítas e os cistos desta nova espécie.

4.2.1 Taquizoítas

Os taquizoítas apresentam um formato ovóide, redondo ou em meia-lua, com o núcleo em posição central ou terminal. Apresentam multiplicação rápida, por endodiogenia (ANDREOTTI *et al.*, 2003).

Os taquizoítas entram nas células hospedeiras por invasão ativa e tornam-se intracelulares logo após o contato com a célula, localizando-se diretamente no citoplasma da célula hospedeira ou dentro de um vacúolo citoplasmático, o vacúolo parasitóforo, podendo localizar-se em mais de um vacúolo (SPEER e DUBEY, 1989).

Os taquizoítas de *N. caninum* tem sido detectados numa variedade de tecidos e tipos celulares. Eles exibem pouca especificidade de hospedeiro, infectando células nervosas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, miócitos, células epiteliais dos túbulos renais e hepatócitos (HEMPHILL *et al.*, 1999; ANDREOTTI *et al.*, 2003).

Nos eqüinos acometidos por neosporose, os taquizoítas foram encontrados em diversos tecidos, entre eles, intestino delgado, cérebro, cordão espinhal, nervos periféricos e fetos abortados (GRAY *et al.*, 1996; MARSH *et al.*, 1996; DAFT *et al.*, 1997; LINDSAY *et al.*, 1996; DUBEY e PORTERFIELD, 1990).

DUBEY *et al.* (2001), na caracterização da cepa isolada de *N. hughesi* (HAMIR *et al.*, 1998), observou taquizoítas nas células musculares cardíacas, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, e ocasionalmente linfócitos. Não foram observados em fibroblastos, células musculares, células endoteliais e lúmen de vasos sanguíneos.

Os taquizoítas de *N. caninum* (5,1-8,4 X 1,5-2,5 µm) são ligeiramente maiores que os de *N. hughesi* (4,0-7,0 X 1,8-3,0 µm) (MARSH *et al.*, 1998; DUBEY *et al.*, 2001).

4.2.2 Cistos e bradizoítos

Os bradizoítas são encontrados em grande número dentro de cistos teciduais e apresentam multiplicação lenta (ANDREOTTI *et al.*, 2003).

Provavelmente devido ao início da resposta imune do hospedeiro e a presença de outros fatores fisiológicos, os taquizoítas de *N. caninum* entram nas células e se diferenciam em bradizoítas, estabelecendo assim uma infecção persistente (ANDREOTTI *et al.*, 2003).

Os cistos teciduais podem persistir dentro do hospedeiro infectado por vários anos sem causar nenhuma manifestação clínica (DUBEY e LINDSAY, 1996).

Os cistos teciduais de *N. hughesi* são normalmente encontrados no SNC e retina, e ocasionalmente nos nervos periféricos e músculo ocular de cavalos. Em um potro infectado congenitamente observou-se também cistos teciduais de *Neospora sp.* no tálamo e hipotálamo (DAFT *et al.*, 1997; LINDSAY *et al.*, 1996).

MARSH *et al.* (1998) e DUBEY *et al.* (2001) observaram que os cistos teciduais e a espessura de parede de *N. hughesi* (tamanho de 6,9-16,0 X 10,7-19,3 µm e espessura de parede de 0,15-1,0 µm) são menores que os de *N. caninum* (tamanho de até 107 µm e espessura de parede de 1-4 µm).

4.2.3 Oocistos

Serão descritos a seguir os oocistos do protozoário *N. caninum*, visto que os oocistos de *N. hughesi* não foram ainda isolados.

Os oocistos não esporulados recém eliminados das fezes de cães apresentam um esporonte central e não são infectivos. Eles podem esporular no meio ambiente em 24 horas, tornando-se infectivos e apresentando dois esporocistos cada qual com quatro esporozoítos (LINDSAY *et al.*, 1999).

Os oocistos são morfologicamente similares aos oocistos de *Hammondia heydorni* encontrados nas fezes de cães, e *Toxoplasma gondii* e *Hammondia hammondi* encontrados nas fezes de gatos (DUBEY, 1999).

Experimentalmente, os cães não são bons hospedeiros definitivos de *N. caninum*, dado pela observação do número reduzido de oocistos eliminados nas fezes e pelo curto período de tempo, sendo desconhecida a frequência de eliminação durante toda a vida do cão (BASSO *et al.*, 2001).

Tentativas para demonstrar oocistos de *N. hughesi* nas fezes de cães que ingeriram tecidos infectados de camundongos têm sido fracassadas (WALSH *et al.*, 2000).

4.3 FORMAS DE INFECÇÃO DE *Neospora sp.*

As formas de infecção atualmente conhecidas referem-se ao protozoário *Neospora caninum* em caninos e bovinos.

Os dois mecanismos principais de infecção são a transmissão vertical ou infecção congênita e a transmissão horizontal ou infecção pós-natal, com a ingestão de oocistos esporulados (ANDREOTTI *et al.*, 2003). A transmissão vertical de *Neospora caninum* tem sido observada em bovinos (DUBEY *et al.*, 1992), ovinos (DUBEY e LINDSAY, 1990; BUXTON *et al.*, 1998), caprinos (LINDSAY *et al.*, 1995), camundongos (LIDDELL *et al.*, 1999), cães (DUBEY & LINDSAY, 1989), gatos (DUBEY & LINDSAY, 1989), macacos (BARR *et al.*, 1994), porcos (JENSEN *et al.*, 1998) e eqüinos (LOCATELLI-DITTRICH, 2002; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2006). A infecção congênita é a principal forma de transmissão e manutenção de *N. caninum* no rebanho bovino (DUBEY *et al.*, 1992; ANDERSON *et al.*, 1997; HIETALA e THURMOND, 1999).

A transmissão horizontal do *N. caninum* nos hospedeiros intermediários ocorre após a ingestão de oocistos esporulados, e a transmissão vertical através da invasão do parasita nas células uterinas. A reativação de uma infecção latente pode originar os taquizoítas (ANDREOTTI *et al.*, 2003).

Os cães (hospedeiros definitivos) ingerem os cistos teciduais dos hospedeiros intermediários e eliminam os oocistos nas fezes. Os hospedeiros intermediários infectam-se consumindo os oocistos esporulados (ANDREOTTI *et al.*, 2003).

Os hospedeiros intermediários naturais de *N. caninum* são os cães, os bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos e cervos, e os hospedeiros definitivos são os cães. Infecções experimentais foram induzidas em camundongos, ratos, cães, raposas, caprinos, gatos, ovinos, coiotes, suínos, gerbils, coelhos e bovinos (MCALLISTER *et al.*, 1998; DUBEY & LINDSAY, 1996; DUBEY, 1999).

UGGLA *et al.* (1998) forneceram colostro contendo taquizoítas de *N. caninum* a bezerras e observaram o desenvolvimento de uma infecção, possibilitando a ocorrência de uma forma adicional de transmissão vertical.

As formas de infecção dos eqüinos com o protozoário *N. hughesi* são desconhecidas, assim como seus hospedeiros definitivos e outros hospedeiros intermediários (DUBEY *et al.*, 2001).

4.4 SINAIS CLÍNICOS

Existem poucos estudos sobre a patogenicidade e prevalência de *Neospora sp.* em eqüinos. A neosporose causa aborto, doença neonatal e encefalite em eqüinos nos Estados Unidos (VARDELEON *et al.*, 2001; MCDOLE *et al.*, 2002) e na França (PITEL *et al.*, 2003 a, b).

Os sinais clínicos de neosporose em eqüinos são cegueira, perda de peso, paralisia dos membros posteriores, comportamento bizarro, dificuldade de mastigação, ataxia e aborto (WALSH *et al.*, 2000).

Dentre as doenças clínicas provocadas por *Neospora sp.* descritas em eqüinos destacam-se duas éguas que abortaram (DUBEY e PORTERFIELD, 1990; PRONOST *et al.*, 1999); uma potra infectada congenitamente que apresentou encefalomielite e problemas de visão (LINDSAY *et al.*, 1996); uma égua que apresentou neosporose visceral, com lesões nos linfonodos mesentéricos e intestino delgado, após um tratamento com droga imunossupressora (GRAY *et al.*, 1996); e quatro cavalos adultos que apresentaram mieloencefalite, com sinais clínicos compatíveis a MEP, sendo que dois destes encontravam-se imunodeprimidos (MARSH *et al.*, 1996; DAFT *et al.*, 1997; HAMIR *et al.*, 1998; CHEADLE *et al.*, 1999).

De acordo com um estudo recente na Itália, muitos eqüinos são acometidos subclínicamente (CIARAMELLA *et al.*, 2004). No Brasil, a maioria dos estudos referem-se a investigações soroepidemiológicas, tendo ocorrido somente dois casos de neosporose clínica: dois fetos abortados de onde foram isoladas duas cepas de *Neospora sp.* (LOCATELLI-DITTRICH, 2002; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2006; HOANE *et al.*, 2006; VILLALOBOS *et al.*, 2006; DUBEY *et al.*, 1999).

Não existem estudos relacionando a possibilidade de cavalos clinicamente sadios e soropositivos de desenvolverem a neosporose clínica. Em cães e gatos, as condições imunossupressoras (administração de glicocorticóides ou presença de infecções oportunistas) promovem o desenvolvimento da doença (DUBEY e LINDSAY, 1996). HAMIR *et al.* (1998) questionou a possibilidade da neosporose ser uma doença oportunista em eqüinos, visto a ocorrência de neosporose clínica em três cavalos imunodeprimidos.

4.4.1 Problemas Reprodutivos

A detecção de taquizoítas de *Neospora sp.* em fetos eqüinos abortados e em placentas de éguas indicam a importância deste protozoário no diagnóstico de aborto (DUBEY e PORTERFIELD, 1990; DUBEY *et al.*, 1990; PRONOST *et al.*, 1999; PITEL *et al.*, 2003b e LOCATELLI-DITTRICH, 2002).

Evidências do papel de *Neospora sp.* nas perdas reprodutivas em eqüinos não foram observadas por HOFFMANN *et al.* (2004) e LOCATELLI-DITTRICH *et al.* (2006); entretanto, MCDOLE & GAY (2002); PITEL *et al.* (2003b) e VILLALOBOS *et al.* (2006) detectaram uma maior prevalência de anticorpos anti-*Neospora sp.* na população de éguas com histórico de abortos e/ou reabsorções embrionárias.

PITEL *et al.* (2003b) observaram uma menor frequência de *N. caninum* em fetos eqüinos do que nos fetos bovinos, enquanto que a soroprevalência para *Neospora sp.* foi similar entre as éguas e vacas com histórico de abortos. Isto se deve principalmente a menor eficiência da passagem vertical de *Neospora sp.* em éguas quando comparado às vacas devido às diferenças de placentação.

Diferentemente dos eqüinos, a patogênese do aborto em bovinos já está bem elucidada. A infecção no feto é sistêmica, com áreas de inflamação na maioria dos órgãos (WREN, 1999). A morte fetal resulta provavelmente de dois mecanismos principais, o primeiro e mais comum, é a insuficiência cardíaca associada à miocardite e necrose do miocárdio, lesões consistentes nos fetos com infecção por *Neospora*. A evidência da insuficiência cardiovascular é o edema do feto (anasarca) e necrose hepática (DUBEY e LINDSAY, 1996; WREN, 1999). O segundo mecanismo do aborto, é a placentite com necrose do epitélio coriônico da placenta, e separação das vilosidades coriônicas das carúnculas do endométrio. Embora as lesões do cérebro sejam importantes, a infecção do sistema nervoso pode não ser o principal fator de morte fetal ou aborto (WREN, 1999; ANDERSON *et al.*, 2000).

Em eqüinos ainda existem poucos estudos relacionando a neosporose com a ocorrência de abortos, a eficiência na transmissão vertical do protozoário e no possível nascimento de potros assintomáticos (MCDOLE e GAY, 2002).

4.4.2 Problemas Neurológicos

A neosporose eqüina associada a doenças neurológicas foi observada em quatro cavalos adultos e um potro infectado congenitamente. Os sinais clínicos observados foram: paralisia de posterior, ataxia, dismetria, hipermetria, incoordenação motora, incontinência urinária, problemas de visão e perda de peso (MARSH *et al.*, 1996; DAFT *et al.*, 1997; HAMIR *et al.*, 1998; CHEADLE *et al.*, 1999; LINDSAY *et al.*, 1996).

O protozoário *N. hughesi* tem sido associado a doenças neurológicas em eqüinos. Ele causa a mieloencefalite protozoária eqüina (MEP) (MARSH *et al.*, 1998). A MEP é causada por uma infecção protozoária (*Sarcocystis neurona* e *Neospora hughesi*) do SNC e é a doença neurológica mais comumente diagnosticada em cavalos da América do Norte (HOANE *et al.*, 2006).

A existência de *N. hughesi* como causa de MEP representou uma mudança no tratamento devido ao comportamento de recrudescência da infecção (DUBEY, 1999b).

Aproximadamente 50% dos cavalos nos EUA são soropositivos ao *Sarcocystis neurona* (BENTZ *et al.*, 1997; BLYTHE *et al.*, 1997), e somente uma minoria destes desenvolvem doença clínica (COHEN e MACKAY, 1997).

No Brasil, DUBEY *et al.* (1999c) detectaram uma soroprevalência de 36% de 101 cavalos sadios para *S. neurona*.

4.5 DIFERENÇAS MOLECULARES ENTRE *N. caninum* e *N. hughesi*

Os estudos moleculares de *N. hughesi* demonstraram que não existem diferenças entre as sequências do gene da pequena subunidade ribossomal do RNA, de *N. hughesi* e *N. caninum*. A comparação das regiões ITS-1 ("internal transcribed spacer") do DNA dos parasitas revelou diferenças entre a sequência dos nucleotídeos de *N. hughesi* e de *N. caninum*. A sequência da região ITS-1 do DNA do *N. hughesi* é 98% similar a sequência de *N. caninum* (MARSH *et al.*, 1998).

As proteínas SAG e SRS2 são antígenos de superfície de *T. gondii* e *Neospora sp.* Estes antígenos dos taquizoítas são imunodominantes, e o antígeno SAG1 de *N. hughesi* apresenta 94% de identidade à sequência de aminoácidos da SAG1 de *N. caninum*, e a NhSRS2 apresenta 91% de identidade com a sequência de aminoácidos da SRS2 de *N. caninum* (MARSH *et al.*, 1999).

Assim, *N. caninum* e *N. hughesi* podem ser diferenciados pelas sequências que codificam as proteínas ITS-1, SAG1 e SRS2. O anticorpo mAB 6c11 produzido contra a proteína SAG1 de *N. caninum* não reage com o SAG1 de *N. hughesi* (Marsh *et al.*, 1998; 1999).

As duas espécies de *Neospora* compartilham os mesmos antígenos de superfície (MARSH *et al.*, 1996; BJORKMAN & UGGLA, 1999; VARDELEON *et al.*, 2001). Assim, os testes sorológicos existentes, como o ensaio imunoenzimático (ELISA), a imunofluorescência indireta (IFI) e a soroaglutinação, não diferenciam entre *N. caninum* e *N. hughesi* (WALSH *et al.*, 2000).

WALSH *et al.* (2001) amplificaram os genes das proteínas GRA6 e GRA7 (proteínas granulares liberadas após a infecção e ruptura da célula hospedeira) de *N. caninum* e *N. hughesi* que são exclusivas de *Neospora*, obtendo a base para o desenvolvimento de anticorpos capazes de diferenciar estas duas espécies.

4.6 DIAGNÓSTICO DE *Neospora caninum* e *Neospora hughesi*

O diagnóstico dos animais infectados por *Neospora sp.* é a chave para o entendimento da epidemiologia da neosporose (HEMPHILL *et al.*, 2000).

Existem os testes parasitológicos e os testes sorológicos. A confirmação laboratorial de neosporose deve ser realizada preferencialmente pelo diagnóstico parasitológico, com a detecção do parasita nos tecidos, por exames histopatológico e imunohistoquímico, ou isolar os parasitas mediante a inoculação do material suspeito em cultivo celular ou em animais de laboratório. O diagnóstico sorológico pesquisa os anticorpos direcionados aos antígenos de superfície dos taquizoítas de *Neospora sp.* no soro dos animais (PETERS *et al.*, 2001).

Os testes parasitológicos utilizados para a detecção de *Neospora sp.* são a histopatologia, imunohistoquímica e PCR (reação em cadeia da polimerase). Para testes sorológicos, utilizam-se a IFI (imunofluorescência indireta), ELISA (ensaio imunoenzimático), soroaglutinação e Western Blot (HEMPHILL *et al.*, 2000).

Os métodos sorológicos e parasitológicos serão discutidos a seguir.

4.6.1 Métodos de Diagnóstico Sorológico

A infecção por *Neospora sp.* induz a produção de anticorpos. Porém, o início da infecção com base no exame sorológico ainda não é possível determinar (MCALLISTER *et al.*, 2000).

A presença de anticorpos num animal indica a exposição ao parasita ou a um parasita estritamente relacionado passível de reação cruzada, não indicando necessariamente a existência de uma infecção ativa (VARDELEON *et al.*, 2001).

Os testes sorológicos mais utilizados para *Neospora sp.* são: a reação de imunofluorescência indireta (IFI), o ensaio imunoenzimático (ELISA), a soroaglutinação, e o Western Blot (HOANE *et al.*, 2006).

O primeiro método sorológico aplicado em animais para o diagnóstico de *N. caninum* foi a IFI, utilizando taquizoítas intactos como antígenos. A IFI é considerada um método de referência, um “padrão ouro” (HEMPHILL *et al.*, 2000).

Na realização de testes em larga escala, como nos estudos epidemiológicos de rebanhos, utiliza-se principalmente a técnica de ELISA (HEMPHILL *et al.*, 2000).

Segundo VARDELEON *et al.* (2001), o método de IFI é altamente sensível e identifica todas as amostras reagentes. O método de Western Blot identifica especificamente as reações antígeno-anticorpo direcionadas às proteínas específicas.

O Western Blot tem sido muito utilizado como teste confirmatório para *Neospora sp.* em muitas espécies animais, sendo considerado um teste altamente específico. Assim, quando associado aos métodos de IFI ou ELISA, a prevalência diminui, sugerindo que a infecção é menos comum quando comparado ao resultado dos demais testes sorológicos (VARDELEON *et al.*, 2001; HOANE *et al.*, 2006).

Os métodos sorológicos devem ser utilizados com cautela no diagnóstico de aborto por *N. caninum*, a confirmação é realizada pela demonstração do parasita ou de seu DNA no feto, preferencialmente em associação com a patologia característica (ANDREOTTI *et al.*, 2003).

No diagnóstico sorológico dos eqüinos, os taquizoítas de *N. caninum* e *N. hughesi* podem ser utilizados como antígenos. Neste caso, os anticorpos contra *N. hughesi* apresentam reação cruzada com *N. caninum*, e os anticorpos contra *N. caninum* também reagem com *N. hughesi* (MARSH *et al.*, 1996).

Os seguintes testes são realizados nesta espécie: soroaglutinação, com taquizoítas de *N. caninum* ou *N. hughesi* como antígenos e títulos considerados positivos na diluição 1:50; método da imunofluorescência indireta (IFI), com taquizoítas de *N. caninum* ou *N. hughesi* como antígenos e títulos considerados positivos nas diluições 1:50 e 1:100 (DUBEY *et al.*, 1999; CHEADLE *et al.*, 1999; MCDOLE & GAY, 2002; VARDELEON *et al.*, 2001). A utilização de um “cut-off” de 1:50 aumenta a sensibilidade diagnóstica. Assim, um cavalo infectado, ou potencialmente infectado, poderá ser identificado. Esta importância foi observada por LOCATELLI-DITTRICH *et al.* (2006) que detectaram duas fêmeas soropositivas com títulos de 1:50 e tendo seus potros soropositivos nas amostras pré-colostrais.

PACKHAM *et al.* (2002) compararam quatro métodos sorológicos, entre eles IFI, wELISA (parasitas lisados inteiros), rELISA (antígeno recombinante) e soroaglutinação, e observaram que a IFI, na titulação 1:640, foi o único método capaz de diferenciar consistentemente cavalos infectados por *N. hughesi* experimentalmente ou naturalmente dos não infectados. Entretanto, mais investigações de proteínas recombinantes de *N. hughesi* são importantes para a sua aplicação em um teste rELISA, produzindo assim um teste sorológico mais específico.

GUPTA *et al.* (2002) realizaram sorologia para *N. hughesi* pela técnica de IFI em cavalos sadios, obtendo uma soroprevalência de 2%. Testando estas mesmas amostras pelo Western Blot, os resultados foram todos negativos. Assim, estes cavalos poderiam ter sido expostos ao *N. caninum* ou a um outro protozoário semelhante.

Em uma população de animais soropositivos para *Neospora sp.* pelo método de IFI, nem todos irão reagir com o antígeno de *N. hughesi* pela técnica de Western Blot. Logo, existem limitações diagnósticas consideráveis na avaliação da soroprevalência de *Neospora sp.* na população equina (GUPTA *et al.*, 2002).

As principais limitações dos testes sorológicos são as diferentes metodologias, titulações e critérios de interpretação dos resultados entre os diferentes laboratórios. Outras limitações são as flutuações dos níveis de anticorpos durante a vida do animal, pela característica de recrudescência da infecção (LOCATELLI-DITTRICH, 2002).

4.6.2 Métodos de Diagnóstico Parasitológico

Os métodos parasitológicos utilizados no diagnóstico e pesquisa de *Neospora sp.* são os exames histopatológico, imunohistoquímico, o isolamento *in vitro* e *in vivo*, a detecção do DNA do parasita por PCR (reação em cadeia da polimerase), a observação dos cistos nos tecidos à fresco e o exame de fezes dos cães (PETERS *et al.*, 2001; HEMPHILL *et al.*, 2000).

Cada método apresenta vantagens, desvantagens e limitações, que devem ser considerados na interpretação dos resultados (LOCATELLI-DITTRICH, 2002).

A confirmação de *Neospora sp.* como causa de aborto deverá ser realizada através da associação do isolamento do protozoário e a observação de lesões patológicas características (DUBEY, 2003).

Se o exame do soro materno, fluidos corporais fetais ou tecidos fetais é positivo ao *N. caninum* pela sorologia ou PCR, o aborto pode estar associado ao *N. caninum*, mas é importante relacionar outras causas potenciais. Se as lesões no cérebro e coração são graves e os taquizoítas de *N. caninum* estão presentes nas lesões, muito provavelmente a causa do aborto é devido à neosporose (DUBEY e SCHARES, 2006).

4.6.2.1 Lesões Histopatológicas do Protozoário *Neospora sp.*

O protozoário *N. caninum* é capaz de produzir lesões necróticas visíveis em poucos dias, e causar morte celular pela multiplicação ativa dos taquizoítas. Pode produzir severa doença neuromuscular em cães e bovinos, destruindo grande número de células neurais, e afetar sua condutividade (DUBEY e LINDSAY, 1996).

Na necropsia dos eqüinos que apresentavam problemas neurológicos, os principais achados foram a necrose do SNC (Sistema Nervoso Central) e fígado. No exame histopatológico observam-se cistos cerebrais, meningo-encefalite não supurativa branda e polimiosite com estágios de *N. caninum* visíveis em secções coradas com hematoxilina-eosina (DUBEY e LINDSAY, 1996; DUBEY *et al.*, 1998).

Outras lesões observadas foram: cérebro com inflamação linfocítica perivascular; medula espinhal hemorrágica e com infiltrado de células mononucleares (macrófagos, células gigantes, linfócitos e plasmócitos) associadas a grupos de taquizoítas; lesões no baço, fígado e coração; lesões nos linfonodos mesentéricos e intestino delgado (GRAY *et al.*, 1996; MARSH *et al.*, 1996; DAFT *et al.*, 1997; LINDSAY *et al.*, 1996; DUBEY e PORTERFIELD, 1990).

Nos relatos de aborto eqüino, DUBEY e PORTERFIELD (1990) observaram taquizoítas de *Neospora sp.* no pulmão de um feto abortado, onde observaram taquizoítas individuais e em grupos nos macrófagos e células alveolares.

4.7 SOROPREVALÊNCIA DE *Neospora sp.* EM EQUINOS

Anticorpos anti-*Neospora sp.* tem sido detectados nos EUA e Nova Zelândia (DUBEY *et al.*, 1999a; CHEADLE *et al.*, 1999; VARDELEON *et al.*, 2001; DUBEY, 2003), na Coréia do Sul (GUPTA *et al.*, 2002), na França (PITEL *et al.*, 2001; PITEL *et al.*, 2003 a,b), Itália (CIARAMELLA *et al.*, 2004), Suécia (JAKUBEK *et al.*, 2006) e Brasil (HOANE *et al.*, 2006; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2006; VILLALOBOS *et al.*, 2006).

Nos EUA, as soroprevalências obtidas para *Neospora sp.* variaram de 10 a 21,3% (DUBEY *et al.*, 1999a; CHEADLE *et al.*, 1999; VARDELEON *et al.*, 2001). Em 2001, VARDELEON *et al.* (2001) detectaram uma prevalência de 32% de anticorpos anti-*N. hughesi* em 178 cavalos, e MCDOLE e GAY (2002) detectaram anticorpos anti-*Neospora sp.* em 13% de 140 fêmeas com histórico de abortos.

Em 2001, na Nova Zelândia, a prevalência para *N. hughesi* foi de 5% (VARDELEON *et al.*, 2001).

Em 2001 na França, PITEL *et al.*, utilizando IFI, detectaram uma soroprevalência de 23% para *Neospora sp.*, e em 2003, através da técnica de soroaglutinação, obtiveram uma soroprevalência de 50% nas fêmeas que abortaram (PITEL *et al.*, 2001; PITEL *et al.*, 2003b).

Na Suécia, JAKUBEK *et al.* (2006) obtiveram uma prevalência de 1% de anticorpos anti-*Neospora sp.* Soroprevalência esta considerada baixa quando comparada às detectadas nos EUA, França, Itália e Brasil, que variaram de 23 a 47% (PITEL *et al.*, 2001; CIARAMELLA *et al.*, 2004; e LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2006).

No Brasil, DUBEY *et al.* (1999c) não observaram soropositividade em 76 cavalos sadios nos estados do RS, SP e RJ. Já LOCATELLI-DITTRICH *et al.* (2006), no Paraná, utilizando a IFI, obtiveram uma soroprevalência de 30 a 47% para *Neospora sp.* em éguas e 22,2% em potros pré-colostrais (1:400). Estes resultados indicam que os fetos foram expostos ao antígeno *in utero* após os 180 dias de gestação, quando adquirem uma certa imunocompetência.

HOANE *et al.* (2006) detectaram uma soroprevalência de 2,5% (24/961) para *N. hughesi* em cavalos provenientes de diferentes Estados brasileiros (Bahia, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul, Rondônia, Santa Catarina e São Paulo).

No estado de São Paulo, Brasil, VILLALOBOS *et al.* (2006) verificaram uma associação positiva entre a presença de anticorpos séricos para *Neospora sp.* e a existência de perdas reprodutivas em éguas.

Na Argentina não foram detectados anticorpos anti-*Neospora sp.* em 101 cavalos sadios (DUBEY *et al.*, 1999b).

4.8 RELAÇÃO HOSPEDEIRO-PARASITA

A relação hospedeiro-parasita determina o resultado da infecção, contribuindo na eliminação ou sobrevivência do parasita. Ela é fortemente dependente da resposta imune do hospedeiro (HEMPHILL *et al.*, 1999).

A seguir será descrita a resposta imune ao protozoário *N. caninum*. Ela está bem estudada em modelos de camundongos e em bovinos infectados experimentalmente (INNES *et al.*, 2001). Em eqüinos ainda não existem informações referentes a imunidade e patogênese da neosporose.

A imunidade mediada por células é a principal resposta efetiva do organismo ao *N. caninum*, já que este é um parasita intracelular obrigatório. A infecção experimental com *N. caninum* induz a uma resposta celular típica por linfócito T helper tipo 1, caracterizada por altos níveis de interferon gama (IFN- γ) e uma resposta humoral por IgG2. Esta resposta controla a multiplicação dos taquizoítas (WILLIAMS *et al.*, 2003). Estudos *in vitro* mostraram que o tratamento das células com IFN- γ ou fator de necrose tumoral (TNF) α inibiu significativamente a multiplicação intracelular de *N. caninum*. Estudos *in vivo* têm mostrado que camundongos depletados de interleucina (IL)-12 ou IFN- γ , assim como camundongos nocauteados de IFN- γ , são incapazes de sobreviver à infecção com *N. caninum* (INNES *et al.*, 2002).

Na ausência de uma resposta imune, os taquizoítas continuariam sua multiplicação, causando progressivamente morte celular até a morte do hospedeiro. Entretanto, com o início de uma resposta imune do hospedeiro e a presença de outros fatores fisiológicos, os taquizoítas se diferenciam em bradizoítas e uma infecção cística tecidual persistente é estabelecida. A ocorrência de destruição celular, e assim da doença, depende de um balanço entre os taquizoítas sendo capazes de penetrar e multiplicar nas células hospedeiras e a capacidade do hospedeiro de inibir sua multiplicação (BUXTON *et al.*, 2002).

A presença de anticorpos específicos é útil como auxílio ao diagnóstico e em estudos epidemiológicos. A ação dos anticorpos na imunidade protetora permanece desconhecida, mas o papel provável seria ajudar no controle da propagação do protozoário pela neutralização dos taquizoítas extracelulares (INNES *et al.*, 2002).

Estudos de infecções natural e experimental por *N. caninum* em bovinos indicam que os abortos são causados por taquizoítas que surgem da reativação de bradizoítos e/ou cistos teciduais ou de oocistos que foram ingeridos durante a gestação. Os taquizoítas que se multiplicam rapidamente atravessam a placenta e infectam o feto, que, dependendo da idade gestacional, pode levar ao aborto (ANDERSON *et al.*, 1991; BJÖRKMAN *et al.*, 1996; PARÉ *et al.*, 1996; WILLIAMS *et al.*, 2000; JENKINS, 2001). Os fatores que influenciam a patogênese do aborto são: o momento da parasitemia durante a gestação, a capacidade da resposta imune do feto, a eficiência da resposta imune materna, a quantidade de parasitas e a duração da parasitemia (ANDREOTTI *et al.*, 2003). Na invasão das células uterinas, os protozoários multiplicam-se causando destruição dos tecidos fetais e maternos na interface materno-fetal, iniciando uma resposta inflamatória.

As citocinas produzidas pelos linfócitos T helper tipo 1: natural killer (NK), interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e óxido nítrico (NO) são deletérios na gestação, podendo ocasionar aborto e/ou reabsorção fetal. Assim, as células trofoblásticas fetais produzem IL-10, que alimentam o sistema imune materno, ativando os linfócitos T helper tipo 2 na interface materno-fetal. A IL-10 regula para baixo a produção de IFN- γ , facilitando a multiplicação de *N. caninum* durante a gravidez e altera a relação hospedeiro-parasita a favor do parasita. As citocinas regulatórias do linfócito T helper tipo 2 (Th2), como a IL-10, transformando o fator de crescimento β (TGF- β), IL-4 e IL-5 são produzidos localmente na interface materno-fetal e irão contrapor-se ao efeito das citocinas dos linfócitos T helper tipo 1 (Th1). Portanto, as células Th2 são o padrão durante a gestação, com tecidos fetoplacentários produzindo citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10 (QUINN *et al.*, 2002; INNES *et al.*, 2002).

Devido à imaturidade imunológica do feto, a infecção no início da gestação normalmente é fatal (BARR *et al.*, 1994; BUXTON *et al.*, 1998; WILLIAMS *et al.*, 2000). Um feto imunocompetente já é capaz de resistir à infecção, porém provavelmente ele nascerá infectado com o parasita (INNES *et al.*, 2002).

A alta taxa de transmissão vertical de *N. caninum* em bovinos pode ser devido a uma imunorregulação natural que ocorre no hospedeiro durante a gestação. As respostas imunes pró-inflamatórias mediadas por linfócitos T helper tipo 1 e a produção de interferon gama (IFN- γ) que são efetivas no combate à multiplicação dos parasitas, são desreguladas na gestação, favorecendo a sobrevivência e multiplicação protozoária (INNES *et al.*, 2001).

4.9 CONTROLE E TRATAMENTO DA NEOSPOROSE

As informações que serão descritas sobre controle referem-se principalmente a estudos *in vitro* e alguns métodos utilizados nas espécies bovina, canina e em camundongos, já que em eqüinos as estratégias de controle e tratamento não foram estudados.

Não existem ainda métodos efetivos para o controle da neosporose bovina. As práticas de manejo do rebanho são utilizadas para tentar eliminar ou reduzir a infecção e os prejuízos causados por *Neospora caninum* (ANDREOTTI *et al.*, 2003).

A estimativa de prevalência da infecção no rebanho é o passo inicial para selecionar as estratégias de controle da neosporose (ANDREOTTI *et al.*, 2003).

Algumas medidas de controle para neosporose bovina são (ANDREOTTI *et al.*, 2003):

- ? Descarte, de modo gradativo, dos animais soropositivos;
- ? Animais soropositivos e os seus descendentes não devem ser mantidos na reprodução, para evitar a transmissão vertical do parasita no rebanho;
- ? Utilização de animais soronegativos para reposição do rebanho;
- ? Evitar o acesso dos cães domésticos e silvestres aos fetos, placentas e carnes cruas, para o controle da transmissão horizontal;
- ? Reduzir as possibilidades de contato dos bovinos com as fezes de cães, através da proteção dos locais de armazenamento de água e alimentos;
- ? Evitar o contato das vacas com fetos e placentas, evitando a placentofagia

Não existem ainda medicamentos antineospora efetivos para o tratamento em bovinos. Várias drogas, como decoquinato, depudecina, toltrazulrin, ponazuril, artemisinina e os extratos de ervas medicinais têm sido utilizados *in vitro* (cultivo celular) e *in vivo* (camundongos), porém, em bovinos não há ainda comprovação de sua eficácia (LINDSAY *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 2002; YOUN *et al.*, 2003; KWON *et al.*, 2003).

Os tratamentos com sulfonamidas, pirimetaminas e clindamicinas tem sido eficazes em alguns cães acometidos por neosporose (KIM *et al.*, 2002).

A sulfadiazina foi eficiente em 90% dos camundongos, se aplicada três dias após a infecção durante um período de 14 dias. O tratamento com várias sulfonamidas com inibidores de dihidrofolato redutase e timidilato sintetase foram eficientes contra a neosporose (DUBEY e LINDSAY, 1996).

O tratamento químico apresenta algumas limitações, como o desenvolvimento de resistência do parasita às drogas, os riscos para a saúde humana no consumo de carne ou de leite com resíduos químicos e a possibilidade de contaminação ambiental (ANDREOTTI *et al.*, 2003).

4.10 SITUAÇÃO ATUAL E PERSPECTIVAS DA IMUNIZAÇÃO EM BOVINOS

Uma estratégia de controle da neosporose é a imunização dos animais do rebanho (positivos e negativos) por meio da vacinação. As vacas infectadas por *N. caninum* podem desenvolver uma imunidade protetora que poderá evitar a transmissão congênita e o aborto (ANDREOTTI *et al.*, 2003).

Embora os animais infectados congenitamente já tenham sido imunizados *in utero* pelo parasita, a resposta imunológica induzida não é suficiente para protegê-los quando ocorre a reativação do parasita durante as gestações subseqüentes. Assim, obter a imunização protetora dos animais que já foram sensibilizados pelo parasita tornou-se um grande desafio. A proteção efetiva contra o parasita não requer apenas a indução de anticorpos específicos de *N. caninum*, mas também o estímulo de respostas mediadas por células (BIELSA *et al.*, 2004).

Há vantagens e desvantagens na utilização de vacinas vivas e mortas na proteção contra a neosporose. A principal vantagem da vacina viva é estimular tanto a resposta humoral quanto a resposta celular, via linfócitos T CD8. A desvantagem é o perigo de causar uma infecção crônica no animal, resultando em uma transmissão vertical persistente. No caso das vacinas mortas, esta infecção persistente não ocorre. Entretanto, sua fabricação envolve muitos desafios como a seleção de um imunógeno apropriado e, talvez o mais importante, métodos para fazer com que o material antigênico estimule a resposta imune adequada. A ativação da resposta mediada por células é o principal objetivo. Assim, muitos estudos focam na escolha dos antígenos imunodominantes que são reconhecidos pelos linfócitos T (HEMPHILL *et al.*, 2000).

A meta de muitos laboratórios é identificar quais antígenos são alvos do sistema imune e quais estão envolvidos na sobrevivência dos protozoários dentro da célula hospedeira (JENKINS, 2001).

Estudos sobre desenvolvimento de vacinas estão sendo realizados por laboratórios e centro de pesquisa, e atualmente no Brasil já existe uma vacina comercial disponível no mercado. A vacina Bovilis® Neoguard desenvolvida pela Intervet, contém taquizoítos inativados de *N. caninum* com o adjuvante SPUR. A seleção do adjuvante foi baseada na capacidade de SPUR estimular não apenas a resposta humoral, mas também a resposta mediada por células. Foi demonstrado que a vacina induz uma reação mínima no local da injeção, tornando-se um adjuvante seguro e eficaz (BIELSA *et al.*, 2004).

Bovilis® Neoguard foi avaliada em um estudo de campo e demonstrou ser eficaz na redução do índice geral de abortamentos. Com relação à segurança da vacina, não foram descritos efeitos adversos no local de aplicação da vacina e nem outros efeitos colaterais como redução do rendimento de leite ou alterações no comportamento das vacas (BIELSA *et al.*, 2004).

Existem informações conflitantes com relação à imunização de animais com taquizoítas inteiros. ANDRIANARIVO *et al* (1999) não obtiveram sucesso na prevenção da transmissão congênita; já ROMERO *et al* (2004) verificaram uma eficácia razoável, podendo esta ferramenta ser utilizada para reduzir a taxa de aborto em rebanhos com alto índice.

LIDDELL *et al.* (1999) obtiveram uma proteção completa da transmissão vertical de *Neospora caninum* em camundongos imunizados com taquizoítas inteiros antes da cobertura.

NISCHIKAWA *et al.* (2001), mostraram que camundongos imunizados com o vírus da vaccinia recombinante ou cães imunizados com o herpes vírus canino expressando SRS2 obtiveram uma resposta imune específica para *Neospora caninum*. E a imunização, antes da cobertura, de fêmeas de camundongos com o VV-SRS2 recombinante conferiu uma significativa proteção da transmissão congênita.

Diversos pesquisadores estão testando imunizações através de plasmídeos contendo Nc-GRA6 e Nc-GRA7 com o intuito de obter altos níveis de proteção contra a transmissão congênita (JENKINS, 2001).

Diversos clones de DNA de proteínas granulares (GRA2, GRA6 e GRA7) (HEMPHILL *et al.*, 1998) e proteínas de superfície (SRS2 e SAG1) (HEMPHILL *et al.*, 1997; HOWE *et al.*, 1998) têm sido descritos.

Sabe-se que a imunomodulação que ocorre na mãe para facilitar a gestação pode favorecer a multiplicação do parasita. Assim, o principal desafio dos pesquisadores é tentar elaborar uma estratégia de controle imunológica contra a neosporose para entender a resposta imune crítica que é efetiva contra o protozoário *N. caninum* e intervir para inverter o balanço hospedeiro-parasita a favor do hospedeiro sem comprometer a gestação (HEMPHILL *et al.*, 2000).

IMUNIDADE DO POTRO E IMUNIDADE PASSIVA

4.11 INTRODUÇÃO

A imunidade do potro recém-nascido depende da ingestão do colostro (imunidade passiva), pois ele nasce praticamente agamaglobulinêmico, sendo susceptível a infecção por diversos microorganismos do meio ambiente. Assim, as imunoglobulinas presentes no colostro são cruciais na determinação da sobrevivência destes animais (LeBLANC, 1990).

4.12 IMUNIDADE DO POTRO

A placenta eqüina é caracterizada como epiteliocorial difusa com seis camadas de células separando as circulações materno e fetal, incluindo o endotélio materno e fetal, tecido conectivo materno e fetal, epitélio uterino, células trofoblásticas, e quatro membranas basais (FLOOD, 1993). Assim, não ocorre a passagem transplacentária de imunoglobulinas em cavalos durante a gestação.

Aos 180 dias de gestação, os linfócitos B estão presentes no feto e podem produzir e secretar imunoglobulinas, principalmente IgM e IgG. Pequenas quantidades de IgM (8-20 mg/dl) e traços de IgG (<15 mg/dl) são detectáveis no soro de potros recém-nascidos antes da ingestão de colostro, sendo considerados de origem endógena (LeBLANC, 1990). A presença de quantidades significativas de IgG no soro de potros neonatos antes da ingestão colostrálica é altamente sugestivo de exposição *in utero* ao antígeno após os 180 dias de gestação (COOK *et al.*, 2001).

COOK *et al.* (2001) realizaram diagnóstico sorológico para *S. neurona* em 33 amostras de soro de potros antes da ingestão colostrálica, não encontrando nenhum animal positivo. Já LOCATELLI-DITTRICH *et al.* (2006) detectaram dois potros (2/9) recém-nascidos pré-colostrálicos positivos para *Neospora sp.*, evidenciando a exposição ao protozoário *in útero* após os 180 dias de gestação.

O potro é imunocompetente ao nascimento, entretanto, níveis apreciáveis de imunoglobulinas não são atingidos até os 2-3 meses de idade. Se a exposição antigênica e estimulação ocorrem imediatamente após o nascimento, uma resposta imune primária na forma de IgG autógena irá ser detectável cerca de duas semanas de idade (McGUIRE e CRAWFORD, 1973).

Durante as 4-8 primeiras semanas de vida, a proteção imunológica do potro se dá através dos anticorpos maternos colostrais. As concentrações séricas de imunoglobulinas são menores entre um e dois meses de vida, devido ao catabolismo dos anticorpos maternos. Os níveis endógenos vagarosamente aumentam, mas ainda não são apropriados até uns 4 a 8 meses de vida (LeBLANC, 1990).

4.13 IMUNIDADE PASSIVA

O componente mais importante da imunidade passiva são as imunoglobulinas colostrais.

A glândula mamária concentra seletivamente imunoglobulinas do sangue imediatamente antes do parto como resultado de mudanças nos níveis de progesterona e estrógeno. Os níveis de imunoglobulinas no colostro podem ser de 2 a 4 vezes maiores que os do soro. Isto é evidenciado por uma significativa queda nos níveis de globulinas séricas das éguas cerca de duas semanas antes da amamentação. O mecanismo desta concentração seletiva é desconhecido, e a concentração de imunoglobulinas no colostro das éguas é variável. A secreção de colostro é de curta duração, durando menos que 24 horas pós-parto para muitas éguas. As éguas produzem em média de 1,5 a 2 litros de colostro (LeBLANC, 1990). A taxa de secreção de colostro não tem sido bem documentada e parece variar muito entre as éguas, de acordo com a reprodução, idade, status nutricional, e facilidade de ordenha (LAVOIE *et al.*, 1989).

As imunoglobulinas predominantes no colostro são IgG (1500-5000 mg/dl) e IgGT (500-2500 mg/dl), com níveis menores de IgM (100-350 mg/dl), IgA (500-1500 mg/dl), e imunoglobulinas agregantes (AI). A IgGb é a mais abundante subclasse de IgG no colostro. A concentração de IgA aumenta durante a lactação e é a imunoglobulina predominante no leite aos 16 dias pós-parto. Os níveis das outras imunoglobulinas rapidamente declinam quando cessa a secreção de colostro (VALENTE *et al.*, 2003).

O potro deve ingerir o colostro dentro das primeiras 24 horas de vida, preferencialmente durante as primeiras 6 horas. A absorção é máxima após o nascimento, mas é progressivamente reduzida acima das 24 horas (TIZARD, 2000).

A avaliação da transferência passiva de imunidade pode ser feita de forma rápida e prática pela concentração da proteína total no soro sanguíneo dos neonatos, pois os seus valores se elevam após iniciadas as mamadas em função da absorção das imunoglobulinas. Este método permite determinar as falhas na transferência passiva de imunidade e, conseqüentemente, a necessidade de se administrar colostro ou outras fontes de imunoglobulinas para proteger a cria e assegurar a sua sobrevivência nas primeiras semanas de vida (VALENTE *et al.*, 2003).

O metabolismo e a quantidade de proteínas presentes no soro de animais neonatos pode sofrer influência de diversos fatores, entre os quais deve-se destacar a mamada do colostro e a idade. Ao nascimento, principalmente potros e bezerros, exibem baixos teores protéicos e após receberem o colostro, apresentam um aumento no total das proteínas devido à absorção intestinal de macromoléculas, incluídas as imunoglobulinas. A seguir, inicia-se uma gradativa diminuição das taxas séricas de proteínas, decorrente do catabolismo das imunoglobulinas adquiridas passivamente do colostro materno, até verificar-se uma estabilização que reflete a produção endógena de imunoglobulinas pelo neonato (VALENTE *et al.*, 2003).

4.13.1 Metabolismo dos Anticorpos Maternos

Os níveis de anticorpos maternos no potro declinam rapidamente nas primeiras quatro semanas de vida e são normalmente mínimos aos seis meses de idade. As primeiras imunoglobulinas presentes no colostro são IgG e IgG (T), com meia-vida respectivamente de 23 e 20 dias. A imunoglobulina IgM materna desaparece muito rápido, geralmente aos 16 dias de vida (MACDOUGALL, 1975).

Muitos estudos têm sido realizados em potros para determinar a cinética do metabolismo dos anticorpos específicos para certas doenças. A taxa de declínio parece variar entre os potros individualmente e entre os diferentes agentes infecciosos. A queda dos anticorpos maternos pode ser observada através do tempo através da utilização de métodos que resultam na quantificação do título de anticorpos. A Tabela 1 contém informações sobre o tempo de desaparecimento dos anticorpos maternos para algumas doenças específicas no cavalo (COOK, 2001).

TABELA 1 - Período de tempo de permanência dos anticorpos maternos para algumas doenças eqüinas

Anticorpos Específicos	Duração dos Anticorpos	Referências
Anemia Infecciosa Eqüina	2 meses	McGuire & Crawford, 1973
	2-6 meses	Burns, 1974
Encefalite Eqüina	2-3 meses	Gibbs et al., 1988
	20 dias	Ferguson et al., 1979
Influenza Eqüina	2-4 semanas	Liu et al., 1985
	3-6 meses	Van Maanen et al., 1992
Herpesvírus Equino	1 mês	McGuire & Crawford, 1973
<i>Clostridium tetani</i>	2,5 meses	Liu et al., 1982
	6 meses	Rossdale & Scarnell, 1961
	17 meses	McGuire & Crawford, 1973
Arterite Eqüina	7 meses	Hullinger et al., 1998
<i>Sarcocystis neurona</i>	9 meses	Alexander & Mason, 1941

Fonte: COOK, 2001

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ÁREA GEOGRÁFICA PARA OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue foram obtidas de um haras localizado em São José dos Pinhais, Paraná, região metropolitana de Curitiba. A criação do haras destina-se a reprodução, compondo-se de animais da raça Puro Sangue Inglês, de elevado valor econômico, com restrição do acesso de outros animais às instalações, rações e piquetes.

A escolha desta propriedade ocorreu principalmente devido ao histórico de perdas reprodutivas sem um diagnóstico conclusivo, e a evidência da exposição destes animais ao protozoário *Neospora sp.*, por um estudo prévio realizado nos anos de 2003 e 2004.

5.2 COLHEITAS DAS AMOSTRAS SANGUÍNEAS

As colheitas de sangue foram realizadas, inicialmente, em 10 éguas gestantes no 8º, 9º, 10º e 11º meses de gestação, e de seus 10 respectivos descendentes previamente à ingestão do colostro, e no 1º, 2º, 3º, 4º e 5º meses de vida. As éguas foram divididas em dois grupos: um com histórico de perdas reprodutivas (éguas que apresentaram, em algum momento da vida reprodutiva, aborto, placentite e/ou reabsorção) e outro sem histórico de perdas reprodutivas.

Destas 10 éguas, uma abortou e três tiveram descendentes que foram a óbito no primeiro mês de vida, sendo assim necessário acrescentar no estudo mais quatro éguas gestantes. Logo, no total foram analisadas 14 éguas gestantes e 10 potros. Devido ao ocorrido, foi perdida a uniformidade dos grupos de éguas com e sem histórico de perdas reprodutivas.

O material proveniente dos óbitos não foi encaminhado ao laboratório e incluído no estudo em virtude da sua não comunicação imediata.

As amostras de sangue foram colhidas mensalmente da veia jugular em tubos sem anticoagulante, centrifugadas a 2.000 rpm por 10 minutos, separadas em alíquotas e congeladas a -20° C, para a sua conservação e manutenção. Semanalmente, pequenos grupos de alíquotas eram descongeladas para a análise sorológica.

5.3 CULTIVO CELULAR

Esta técnica foi utilizada para proporcionar a multiplicação do protozoário *N. caninum* *in vitro* e para mantê-los viáveis e em quantidade suficiente para a posterior confecção das lâminas de Imunofluorescência Indireta (IFI) para o diagnóstico sorológico.

Inicialmente foram cultivadas as células Vero (células de rim de macaco) para posterior inoculação dos protozoários. As células foram cultivadas em meio de crescimento Eagle suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10% de caldo triptose fosfato, 100U/mL de penicilina G potássica, 100?g/mL de sulfato de estreptomicina e 1,25 ?g/mL de anfotericina B.

Os frascos de cultivo celular foram mantidos em estufa com 5% de CO₂ e a 37°C e observados no microscópio invertido para avaliação do crescimento celular e formação da monocamada.

5.4 CULTIVO DE *Neospora caninum*

Após a formação da monocamada celular, a cepa de referência NC-1, isolada de cão (Dubey *et al.*, 1988), que estava congelada em nitrogênio líquido, foi descongelada e inoculada nas células Vero com monocamada de 24 horas.

Estes frascos foram mantidos em meio Eagle e em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Foram observados diariamente no microscópio invertido quanto à coloração do meio, e a possíveis contaminações por bactérias ou leveduras. A leitura dos frascos objetivou avaliar a multiplicação dos parasitas *in vitro*, os efeitos citopáticos causados na monocamada de células Vero. As transferências dos parasitas foram realizadas periodicamente, em intervalos de tempo e diluições de acordo com a multiplicação dos protozoários e a infecção da monocamada de células.

5.5 REAÇÃO DA IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA (IFI)

A reação de IFI é a metodologia de referência estabelecida para pesquisa de anticorpos de *N. caninum*, considerada um teste padrão. O método da IFI detecta principalmente os anticorpos direcionados aos antígenos da superfície celular dos taquizoítas inteiros de *N. caninum* fixados nos orifícios da lâmina de IFI.

5.5.1 Preparo das Lâminas de IFI

As lâminas de IFI foram preparadas com taquizoítas da cepa NC-1 (cepa referência) de *N. caninum* obtidos do cultivo *in vitro* e fixados nas lâminas de IFI de acordo com o protocolo a seguir:

- a) Retirar o meio de cultivo das garrafas infectadas com os taquizoítas. Lavar a monocamada com PBS;
- b) Transferir a suspensão para um tubo de Falcon. Passar a suspensão em agulha (25x6) e seringa, três vezes, para romper as células e filtrar em filtro de 5 μ m para remover os restos celulares;
- c) Centrifugar a suspensão por 10 minutos, a 1.000 rpm, na temperatura de 6°C;
- d) Remover o sobrenadante e ressuspender o sedimento com 1,0 ml de PBS;
- e) Contar os protozoários em câmara de Neubauer;
- f) Número de taquizoítas/ml = (número médio de taquizoítas/quadrado grande da câmara) x 10^4 x fator de diluição;
- g) Centrifugar por 10 minutos, a 1.000 rpm, na temperatura de 6°C. Descartar o sobrenadante. Repetir a lavagem com PBS e centrifugar novamente;
- h) Diluir o inóculo com PBS (pH 7,2) para uma quantidade de $1,0 \times 10^6$ taquizoítas/ml;
- i) Limpar as lâminas previamente com álcool etílico 70%;
- j) Depositar 20 μ l da suspensão em cada orifício da lâmina de IFI;
- k) Secar as lâminas na estufa a 37°C;
- l) Manter as lâminas a -20°C. O prazo de utilização das lâminas é de 6 meses.

5.5.2 Técnica da Imunofluorescência Indireta

Ocorreram dois tipos de resultados sorológicos, uma vez que dois diferentes valores de cut-off (ponto de corte) foram adotados. As amostras séricas das éguas gestantes foram consideradas positivas nas diluições 1:50 e 1:100. As amostras séricas dos potros pré-colostrais foram consideradas positivas na diluição 1:16, e as amostras séricas dos potros pós-colostrais foram consideradas positivas nas diluições 1:50 e 1:100. Na presença de amostras reagentes, estas eram diluídas sucessivamente até a titulação final.

O conjugado anti-IgG de equino (Sigma?) foi utilizado na diluição 1:100. Os soros controles positivos e negativos foram utilizados na diluição 1:50.

As amostras positivas apresentaram reações de fluorescência em toda a superfície do taquizoíta (fluorescência total). Aquelas em que a fluorescência compreendeu apenas uma porção do taquizoíta foram consideradas negativas (fluorescência apical).

- a) Em cada lâmina, além dos soros testes, foram incluídos os soros controles positivo e negativo;
- b) Identificar as lâminas na parte polida e anotar as amostras em protocolo controle;
- c) Diluir as amostras de soro com PBS (pH 7,2);
- d) Retirar as lâminas do congelador;
- e) Secar sob ventilação, por 10 minutos;
- f) Colocar as lâminas em banho de acetona, por 10 minutos, no congelador;
- g) Secar;
- h) Colocar 25?l de cada amostra de soro diluído nos orifícios (poço) da lâmina;
- i) Incubar as lâminas por 30 minutos, a 37°C, em câmara úmida;
- j) Lavar com PBS, por 10 minutos, nas cubas;
- k) Lavar com água destilada;
- l) Secar;
- m) Colocar o conjugado específico (25?l/poço);
- n) Incubar as lâminas por 30 minutos, a 37°C, em câmara úmida;
- o) Lavar com PBS, por 10 minutos, nas cubas;
- p) Lavar com água destilada, por 5 minutos;
- q) Secar;
- r) Colocar glicerina 90% (tamponada com PBS), entre as duas fileiras de orifícios e colocar uma lamínula;
- s) Examinar as lâminas no microscópio de imunofluorescência;
- t) Amostras positivas são as que apresentam fluorescência completa.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Neste estudo, o método estatístico aplicado foi o teste do qui-quadrado (χ^2).

Objetivando verificar a relação dos resultados sorológicos entre mães (éguas) e filhos (potros), as seguintes análises estatísticas foram realizadas:

1. Associação entre soropositividade das éguas gestantes ao protozoário *Neospora sp.* e o histórico de perda reprodutiva;
2. Associação entre a soropositividade/soronegatividade ao protozoário *Neospora sp.* das éguas e de seus descendentes (em qualquer mês de gestação e de vida);
3. Associação entre soropositividade ao protozoário *Neospora sp.* da mãe no 11º mês de gestação e de seus descendentes no 1º mês de vida;
4. Associação entre a égua apresentar títulos = 1:200 para o protozoário *Neospora sp.* e seus descendentes apresentarem títulos = 1:50;
5. Associação entre a égua apresentar títulos = 1:200 para o protozoário *Neospora sp.* e seus descendentes apresentarem títulos = 1:100;
6. Associação entre a égua apresentar títulos = 1:200 para o protozoário *Neospora sp.* e seus descendentes apresentarem títulos = 1:200;
7. Associação entre a égua apresentar títulos = 1:200 para o protozoário *Neospora sp.* e seus descendentes irem a óbito.

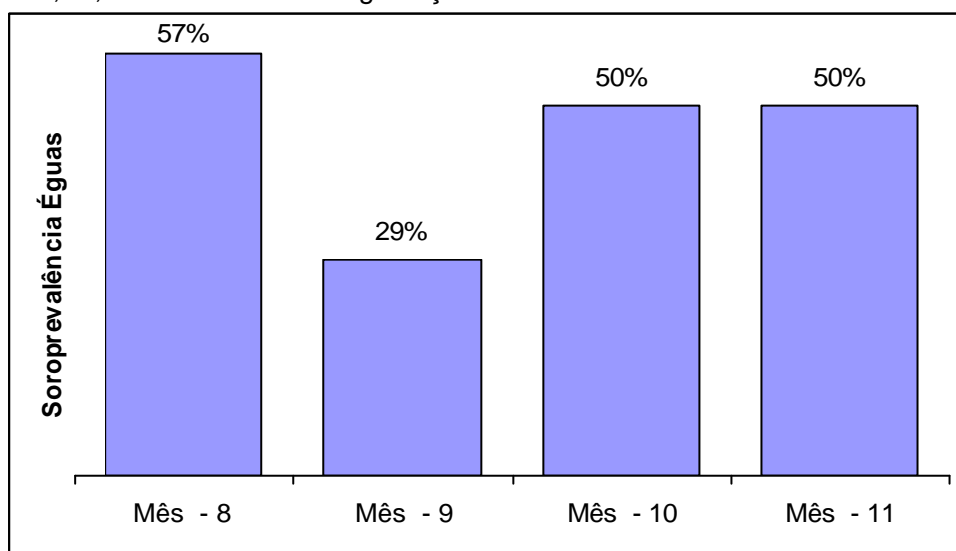
6 RESULTADOS

6.1 SOROPREVALÊNCIA DAS ÉGUAS E DOS POTROS

6.1.1 Titulação 1:50 das éguas

No 8° mês de gestação, as análises realizadas pela IFI revelaram que 57% (8/14) das éguas foram soropositivas ao protozoário *Neospora sp.* No 9° mês de gestação, a soroprevalência foi de 29% (4/10); seguindo-se de 50% no 10° e 11° mês de gestação (Figura 1). Assim, o 8° mês foi o que apresentou a maior soroprevalência e o 9° mês a menor soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora sp.*

FIGURA 1: Soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora sp.* a partir da diluição 1:50 de todas as éguas no 8°, 9°, 10° e 11° meses de gestação.



Analisando-se o 8°, 9°, 10° e 11° meses de gestação, das 14 éguas analisadas, 12 (12/14 = 86%) foram soropositivas em pelo menos um mês de gestação. Destas 12 soropositivas, três (25%) obtiveram títulos de 1:50, duas (17%) títulos de 1:100, cinco (42%) títulos de 1:200 e duas (17%) títulos de 1:400. A taxa de soroconversão no 9° mês foi de 0%, seguindo-se de 85,71% e 42,85% no 10° e 11° mês respectivamente (Tabela 2).

TABELA 2: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* das éguas no 8°, 9°, 10° e 11° meses de gestação a partir da diluição 1:50.

ÉGUAS	8° MÊS	9° MÊS	10° MÊS	11° MÊS
E1	NEG	NEG	1:50	NEG
E2	NEG	NEG	1:50	1:100
E3	1:200	1:50	1:50	NEG
E4	NEG	NEG	NEG	NEG
E5	NEG	NEG	1:200	1:200
E6	1:100	NEG	NEG	1:50
E7	1:50	1:50	NEG	1:200
E8	1:50	1:50	NEG	1:400
E9	NEG	NEG	1:200	1:50
E10	NEG	NEG	NEG	NEG
E11	1:50	NEG	1:50	NEG
E12	1:50	1:200	NEG	NEG
E13	1:200	NEG	1:400	1:50
E14	1:50	NEG	NEG	NEG

No 11º mês de gestação apenas sete éguas foram soropositivas (50%), das quais três (43%) apresentaram títulos 1:50, uma (14%) título 1:100, duas (29%) títulos 1:200, e uma (14%) 1:400. Destas sete éguas soropositivas no último mês de gestação, dois (29%) de seus potros, após a ingestão colostrálica, obtiveram título, e três potros (43%) morreram no primeiro mês de vida (Tabela 4 e Figura 3).

De todas as éguas soropositivas em pelo menos um mês de gestação, uma égua (8%) abortou, três de seus potros foram a óbito no 1º mês de vida, um potro foi negativo em todos os cinco primeiros meses de vida, e o restante dos potros se tornaram soropositivos em épocas distintas: dois a partir do primeiro mês (2/12), um a partir do segundo mês (1/12), dois a partir do terceiro mês (2/12) e dois a partir do quarto mês.

6.1.1.1 Soroprevalência das éguas com e sem histórico de perdas reprodutivas

Das oito éguas sem histórico de perdas reprodutivas, apenas uma (13%) permaneceu soronegativa em todos os meses de gestação e dois de seus potros foram a óbito com um mês de vida. Quanto à soroprevalência, o 11º mês representou a maior taxa (63%) e o 9º mês a menor taxa (38%) (Tabela 5).

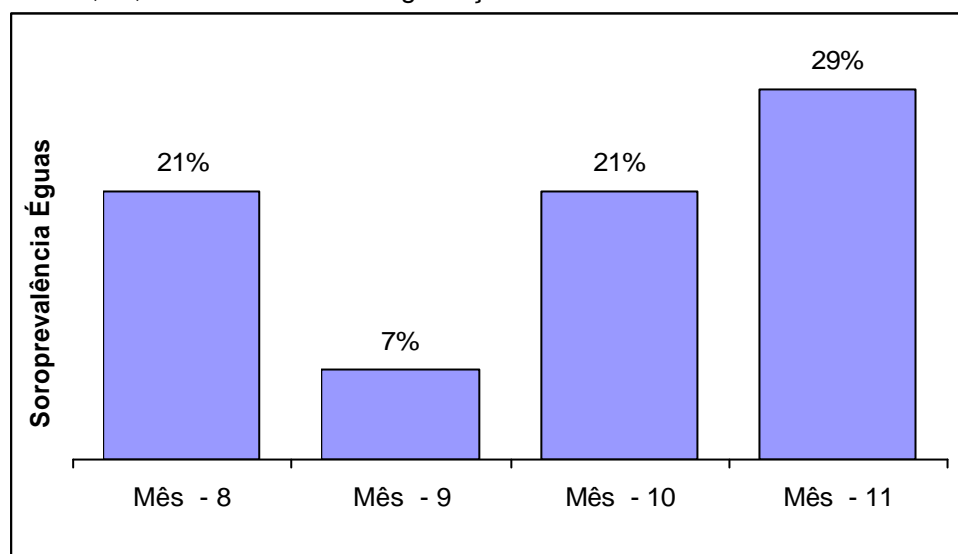
Das seis éguas com histórico de perdas reprodutivas, cinco (83%) foram soropositivas em pelo menos um mês de gestação, sendo que uma égua (17%) abortou e um de seus potros foi a óbito no 1º mês de vida. Neste mesmo grupo, observou-se que o 8º mês foi o que apresentou a maior soroprevalência (66,6%) e o 9º mês a menor soroprevalência (16,6%) (Tabela 6).

As éguas com histórico de perdas reprodutivas apresentaram uma soroprevalência de 83% e as sem histórico de perdas reprodutivas tiveram uma soroprevalência de 87%. Com o objetivo de verificar associação entre soropositividade ao protozoário *Neospora sp.* e histórico de perdas reprodutivas em éguas, foi aplicado o método estatístico qui-quadrado. A diferença obtida entre os dois grupos de éguas não foi estatisticamente significativa, tendo assim uma relação de independência entre soropositividade ao protozoário *Neospora sp.* e perda reprodutiva eqüina.

6.1.2 Titulação 1:100 das éguas

No 8º mês de gestação, as análises realizadas pela IFI revelaram que 21% (3/14) das éguas foram soropositivas ao protozoário *Neospora sp.* No 9º mês de gestação, a soroprevalência foi de 7% (1/10); seguindo-se de 21% (3/14) no 10º mês e 29% (4/14) no 11º mês de gestação. Assim, o 11º mês apresentou a maior taxa de soroprevalência e o 9º mês a menor taxa (Figura 2).

FIGURA 2: Soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora sp.* a partir da diluição 1:100 de todas as éguas no 8º, 9º, 10º e 11º meses de gestação.



Analisando-se o 8º, 9º, 10º e 11º meses de gestação, das 14 éguas analisadas, nove (9/14 = 64%) foram soropositivas em pelo menos um mês de gestação. Destas nove soropositivas, duas (22%) obtiveram títulos de 1:100, cinco (56%) títulos de 1:200 e duas (22%) títulos de 1:400. A taxa de soroconversão no 9º mês foi de 100% (1/1), seguindo-se de 100% (3/3) e 75% (3/4) no 10º e 11º mês respectivamente (Tabela 3).

TABELA 3: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* das éguas no 8º, 9º, 10º e 11º meses de gestação a partir da diluição 1:100.

ÉGUAS	8º MÊS	9º MÊS	10º MÊS	11º MÊS
E1	NEG	NEG	NEG	NEG
E2	NEG	NEG	NEG	1:100
E3	1:200	NEG	NEG	NEG
E4	NEG	NEG	NEG	NEG
E5	NEG	NEG	1:200	1:200
E6	1:100	NEG	NEG	NEG
E7	NEG	NEG	NEG	1:200
E8	NEG	NEG	NEG	1:400
E9	NEG	NEG	1:200	NEG
E10	NEG	NEG	NEG	NEG
E11	NEG	NEG	NEG	NEG
E12	NEG	1:200	NEG	NEG
E13	1:200	NEG	1:400	NEG
E14	NEG	NEG	NEG	NEG

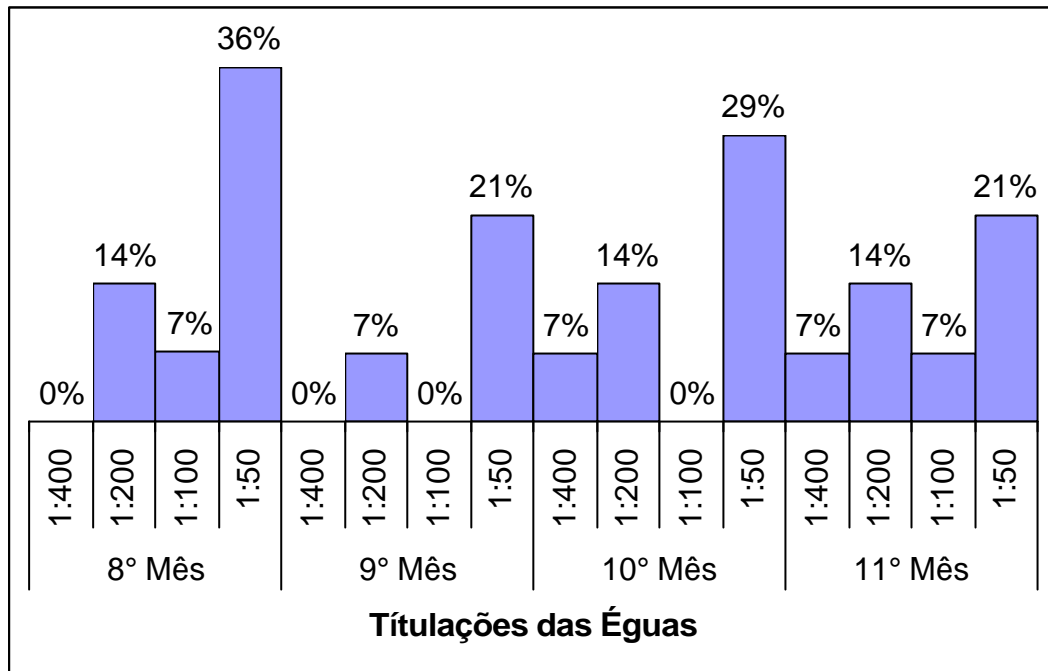
No 11° mês de gestação apenas quatro éguas foram soropositivas (29%), das quais uma (25%) apresentou título 1:100, duas (50%) títulos de 1:200 e uma (25%) título de 1:400. Destas quatro éguas soropositivas no último mês de gestação, um (25%) de seus potros, após a ingestão colostrálica, obteve título e dois (50%) morreram no primeiro mês de vida (Tabela 4 e Figura 3).

De todas as éguas soropositivas em pelo menos um mês de gestação, três de seus potros foram a óbito no 1° mês de vida, seis potros foram negativos em todos os cinco meses de vida, e o restante dos potros se tornaram soropositivos em épocas distintas: dois a partir do primeiro mês (2/12), um a partir do segundo mês (1/12) e um a partir do terceiro mês (1/12).

TABELA 4 – Soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora sp.* conforme as titulações no 8°, 9°, 10° e 11° meses de gestação das éguas.

Éguas por Período de Gestação	Animais Soropositivos	Animais Soronegativos	Soroprevalência
Éguas 8° mês	5/14 (1:50)	6/14	35,71%
	1/14 (1:100)		7,14%
	2/14 (1:200)		14,28%
	0/14 (1:400)		0
Éguas 9° mês	3/14 (1:50)	10/14	21,42%
	0/14 (1:100)		0
	1/14 (1:200)		7,14%
	0/14 (1:400)		0
Éguas 10° mês	4/14 (1:50)	7/14	28,57%
	0/14 (1:100)		0
	2/14 (1:200)		14,28%
	1/14 (1:400)		7,14%
Éguas 11° mês	3/14 (1:50)	7/14	21,42%
	1/14 (1:100)		7,14%
	2/14 (1:200)		14,28%
	1/14 (1:400)		7,14%

FIGURA 3: Soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora sp.* nas diferentes titulações no 8°, 9°, 10° e 11° meses de gestação das éguas.



6.1.2.1 Soroprevalência das éguas com e sem histórico de perdas reprodutivas

Das oito éguas sem histórico de perdas reprodutivas, seis (75%) foram soropositivas e dois de seus potros foram a óbito com um mês de vida. Quanto a soroprevalência, o 11° mês foi o que apresentou a maior taxa (50%) e no 9° mês não foram detectados anticorpos anti-*Neospora sp.* (Tabela 5).

Das seis éguas com histórico de perdas reprodutivas, apenas três (50%) foram soropositivas em pelo menos um mês de gestação, sendo que um de seus potros foi a óbito no 1° mês de vida. A soroprevalência maior obtida foi no 10° mês (33%) e a menor no 11° mês onde não foram detectados anticorpos (Tabela 6).

As éguas com histórico de perdas reprodutivas apresentaram uma soroprevalência de 50% e as sem histórico de perdas reprodutivas tiveram uma soroprevalência de 75%. Com o objetivo de verificar associação entre soropositividade ao protozoário *Neospora sp.* e histórico de perdas reprodutivas em éguas, foi aplicado o método estatístico qui-quadrado. A diferença obtida entre os dois grupos de éguas não foi estatisticamente significativa, tendo assim uma relação de independência entre soropositividade ao protozoário *Neospora sp.* e perda reprodutiva eqüina.

TABELA 5 - Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* das éguas sem histórico de perdas reprodutivas nos últimos quatro meses de gestação e de seus respectivos potros nos primeiros cinco meses de vida.

Éguas sem Histórico de Perdas Reprodutivas	Éguas 8° mês	Éguas 9° mês	Éguas 10° mês	Éguas 11° mês	Potros Nascidos de Mães sem Hist. de Perdas Reprodutivas	Potros Pré-colostrais	Potros 1° mês	Potros 2° mês	Potros 3° mês	Potros 4° mês	Potros 5° mês
E1	NEG	NEG	1:50	NEG	PE1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
E2	NEG	NEG	1:50	1:100	PE2	NEG	NEG	NEG	NEG	1:50	1:50
E3	1:200	1:50	1:50	NEG	PE3	NEG	NEG	1:100	1:50	NEG	NEG
E4	NEG	NEG	NEG	NEG	PE4	NEG	1:100	NEG	NEG	NEG	NEG
E5	NEG	NEG	1:200	1:200	PE5	NEG	1:400	1:50	NEG	1:50	NEG
E6	1:100	NEG	NEG	1:50	PE6	NEG	NEG	NEG	1:50	NEG	NEG
E7	1:50	1:50	NEG	1:200	PE7	NEG	Óbito				
E8	1:50	1:50	NEG	1:400	PE8	NEG	Óbito				

TABELA 6 - Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* das éguas com histórico de perdas reprodutivas nos últimos quatro meses de gestação e de seus respectivos potros nos primeiros cinco meses de vida.

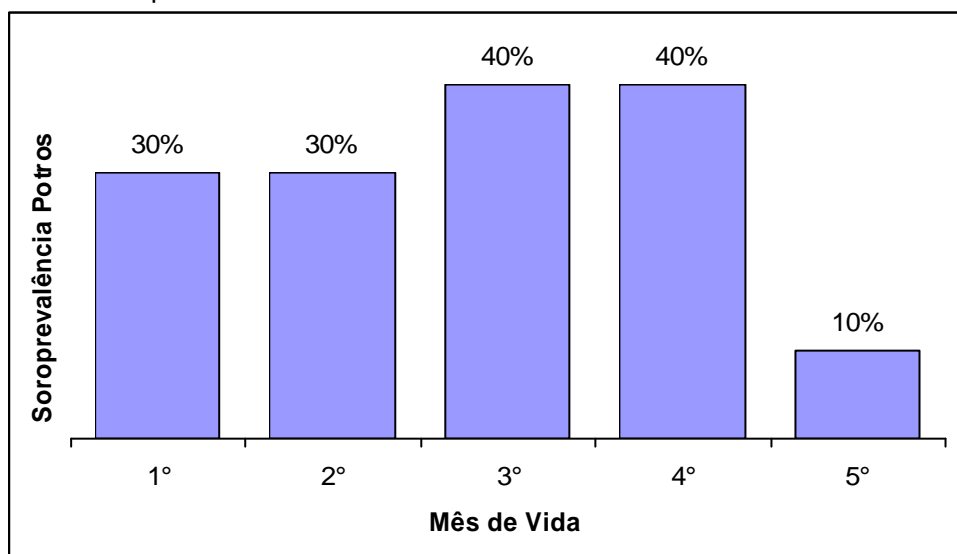
Éguas com Histórico de Perdas Reprodutivas	Éguas 8° mês	Éguas 9° mês	Éguas 10° mês	Éguas 11° mês	Potros Nascidos de Mães com Hist. de Perdas Reprodutivas	Potros Pré-colostrais	Potros 1° mês	Potros 2° mês	Potros 3° mês	Potros 4° mês	Potros 5° mês
E9	NEG	NEG	1:200	1:50	PE9	NEG	1:50	1:50	NEG	NEG	1:50
E10	NEG	NEG	NEG	NEG	PE10	NEG	NEG	NEG	1:100	NEG	NEG
E11	1:50	NEG	1:50	NEG	PE11	NEG	NEG	NEG	1:50	1:50	NEG
E12	1:50	1:200	NEG	NEG	PE12	NEG	NEG	NEG	NEG	1:50	NEG
E13	1:200	NEG	1:400	1:50	PE13	NEG	Óbito				
E14	1:50	NEG	NEG	NEG	PE14	NEG	Aborto				

6.1.3 Titulação 1:50 dos potros

As amostras pré-colostrais realizadas pela IFI foram todas negativas.

No 1° e 2° meses de vida, a soroprevalência obtida foi de 30% (3/10); no 3° e 4° foi de 40% (4/10); e no 5° mês foi de 10% (1/10) (Figura 4).

FIGURA 4: Soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora sp.* a partir da diluição 1:50 de todos os potros durante os primeiros cinco meses de vida.



Observando-se o 1°, 2°, 3°, 4° e 5° meses de vida, dos 10 potros analisados, nove (90%) foram soropositivos em pelo menos um mês de vida. Destes nove, cinco (56%) tiveram títulos de 1:50, três (33%) títulos de 1:100 e um (11%) apresentou titulação 1:400 no primeiro mês de vida. As taxas de soroconversões foram: 2° mês - 33%; 3° mês - 75%; 4° mês - 75%; e 5° mês - 0% (Tabela 7).

TABELA 7: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* dos potros no 1°, 2°, 3°, 4° e 5° meses de vida a partir da diluição 1:50.

POTROS	Pré-colostro	1° MÊS	2° MÊS	3° MÊS	4° MÊS	5° MÊS
PE1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
PE2	NEG	NEG	NEG	NEG	1:50	1:50
PE3	NEG	NEG	1:100	1:50	NEG	NEG
PE4	NEG	1:100	NEG	NEG	NEG	NEG
PE5	NEG	1:400	1:50	NEG	1:50	NEG
PE6	NEG	NEG	NEG	1:50	NEG	NEG
PE9	NEG	1:50	1:50	NEG	NEG	NEG
PE10	NEG	NEG	NEG	1:100	NEG	NEG
PE11	NEG	NEG	NEG	1:50	1:50	NEG
PE12	NEG	NEG	NEG	NEG	1:50	NEG

Os meses em que ocorreram maiores titulações foram o primeiro, 1:100 (cuja mãe foi negativa no 8°, 9°, 10° e 11° mês de gestação) e 1:400 (cuja mãe teve títulos de 1:200 no 10° e 11° mês de gestação); o segundo, 1:100 (cuja mãe apresentou títulos de 1:200 no 8° mês e 1:50 no 9° e 10° meses de gestação); e o terceiro mês de vida, 1:100 (cuja mãe não apresentou titulação em quaisquer dos quatro últimos meses de gestação) (Tabela 9 e Figura 6).

Das sete éguas soropositivas no 11° mês de gestação, dois (29%) de seus potros apresentaram anticorpos no 1° mês de vida após a ingestão de colostro e três (43%) foram a óbito no 1° mês de vida. Das 12 éguas soropositivas em pelo menos um mês de gestação, uma (8%) abortou, três (25%) de seus potros foram a óbito com um mês de vida, um potro (8%) permaneceu soronegativo em todos os cinco meses de vida e o restante (58%) apresentaram anticorpos nos diferentes títulos (cinco com títulos 1:50, um com títulos 1:100 e um com títulos 1:400).

Foram realizadas análises estatísticas (qui-quadrado) com o intuito de verificar as seguintes correlações: mãe ser soropositiva ao protozoário *Neospora sp.* e o filho também, em qualquer mês de gestação e de vida; mãe ser soropositiva no 11° mês de gestação e o filho no 1° mês de vida; e mãe ter maior titulação ($\geq 1:200$) e o filho titulação $\geq 1:50$. Estas análises resultaram em uma associação de independência, ou seja, a condição sorológica da mãe não influencia, ou influencia pouco, na condição sorológica de seu descendente.

Das duas éguas soronegativas em todos os quatro últimos meses de gestação, seus respectivos potros apresentaram títulos 1:100, um no 1° mês e outro no 3° mês de vida.

O 4° e o 5° meses de vida representaram uma diminuição dos níveis de anticorpos, visto que a maior titulação observada foi 1:50. No 5° mês verificou-se uma soroprevalência de apenas 10% (1/10) (Figura 6).

Quanto à permanência dos anticorpos maternos, observou-se que o 5° mês apresentou uma diminuição significativa dos níveis séricos. Assim, este mês representa o início da perda da influência da imunidade passiva para o protozoário *Neospora sp.* (Figuras 4 e 6).

De todos os potros soropositivos em pelo menos um mês de vida, nenhum apresentou sinais clínicos de neosporose.

6.1.3.1 Soroprevalência dos potros nascidos de mães com e sem histórico de perdas reprodutivas

Das oito éguas sem histórico de perdas reprodutivas, cinco de seus potros apresentaram títulos de anticorpos (dois 1:50, dois 1:100 e um 1:400) anti-*Neospora sp.*, e dois potros morreram no primeiro mês de vida (Tabela 5).

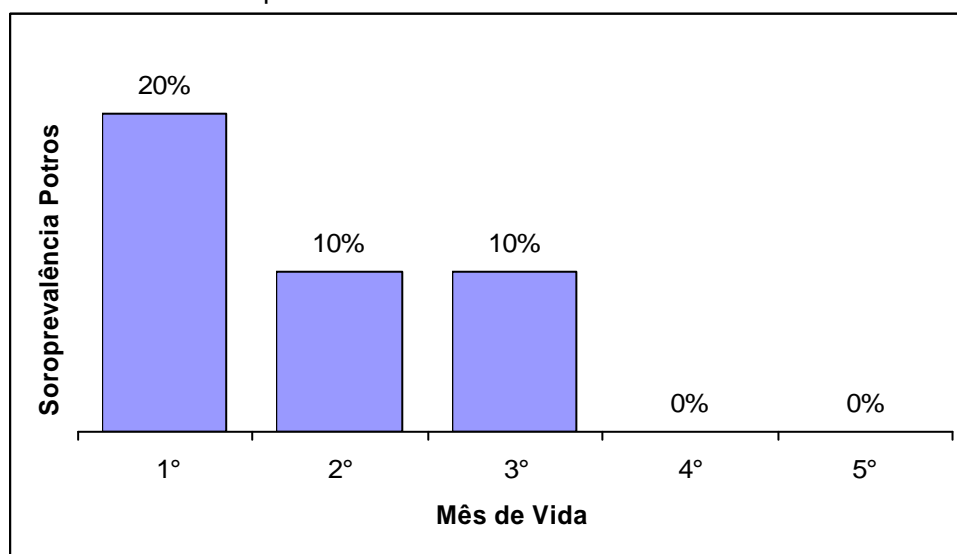
Das seis éguas com histórico de perdas reprodutivas, quatro de seus potros apresentaram títulos de anticorpos (três 1:50 e um 1:100) anti-*Neospora sp.*, um potro morreu no 1º mês de vida e uma égua (16,6%) abortou (Tabela 6).

6.1.4 Titulação 1:100 dos potros

As amostras pré-colostrais realizadas pela IFI foram todas negativas.

No 1º mês de vida a soroprevalência obtida foi de 20% (2/10), no 2º e 3º meses foi de 10% (1/10), e no 4º e 5º meses não foram detectados anticorpos específicos para *Neospora sp* (0/10) (Figura 5).

FIGURA 5: Soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora sp.* a partir da diluição 1:100 de todos os potros durante os cinco primeiros meses de vida.



Observando-se o 1º, 2º, 3º, 4º e 5º meses de vida, dos 10 potros analisados, quatro (40%) foram soropositivos em somente um mês de vida (dois no 1º mês, um no 2º mês e um no 3º mês). Destes quatro, três tiveram títulos 1:100 (1º, 2º e 3º meses), e um 1:400 no primeiro mês de vida (Tabela 8).

TABELA 8: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* dos potros no 1°, 2°, 3°, 4° e 5° meses de vida a partir da diluição 1:100

POTROS	Pré-colostro	1° MÊS	2° MÊS	3° MÊS	4° MÊS	5° MÊS
PE1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
PE2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
PE3	NEG	NEG	1:100	NEG	NEG	NEG
PE4	NEG	1:100	NEG	NEG	NEG	NEG
PE5	NEG	1:400	NEG	NEG	NEG	NEG
PE6	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
PE9	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
PE10	NEG	NEG	NEG	1:100	NEG	NEG
PE11	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
PE12	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

O mês em que ocorreu maior titulação foi o primeiro: 1:400, cuja mãe apresentou títulos de 1:200 no 10° e 11° meses de gestação (Tabela 9 e Figura 6).

Das quatro éguas soropositivas no 11° mês de gestação, um de seus potros apresentou anticorpos e dois foram a óbito com um mês de vida. Das nove éguas soropositivas em pelo menos um mês de gestação, três de seus potros foram a óbito no primeiro mês de vida, quatro potros permaneceram soronegativos em todos os cinco meses de vida e o restante apresentou anticorpos nos seguintes títulos: um com título 1:100, e um com título 1:400.

Foram realizadas análises estatísticas (qui-quadrado) com o intuito de verificar as seguintes correlações: mãe ser soropositiva ao protozoário *Neospora sp.* e o filho também, em qualquer mês de gestação e de vida; mãe ser soropositiva no 11° mês de gestação e o filho no 1° mês de vida; mãe ter maior titulação (\neq 1:200) e o filho titulação =1:100; mãe ter maior titulação (=1:200) e o filho também (=1:200); mãe ter maior titulação (=1:200) e o filho vir a óbito. Estas análises resultaram em uma associação de independência, ou seja, a condição sorológica da mãe não influencia, ou influencia pouco, na condição sorológica e na saúde de seu descendente.

Das cinco éguas soronegativas nos quatro últimos meses de gestação, apenas dois de seus potros foram negativos em todos os cinco primeiros meses de vida, dois foram soropositivos na diluição 1:100, um no 1° e outro no 3° mês de vida, e uma égua (20%) abortou.

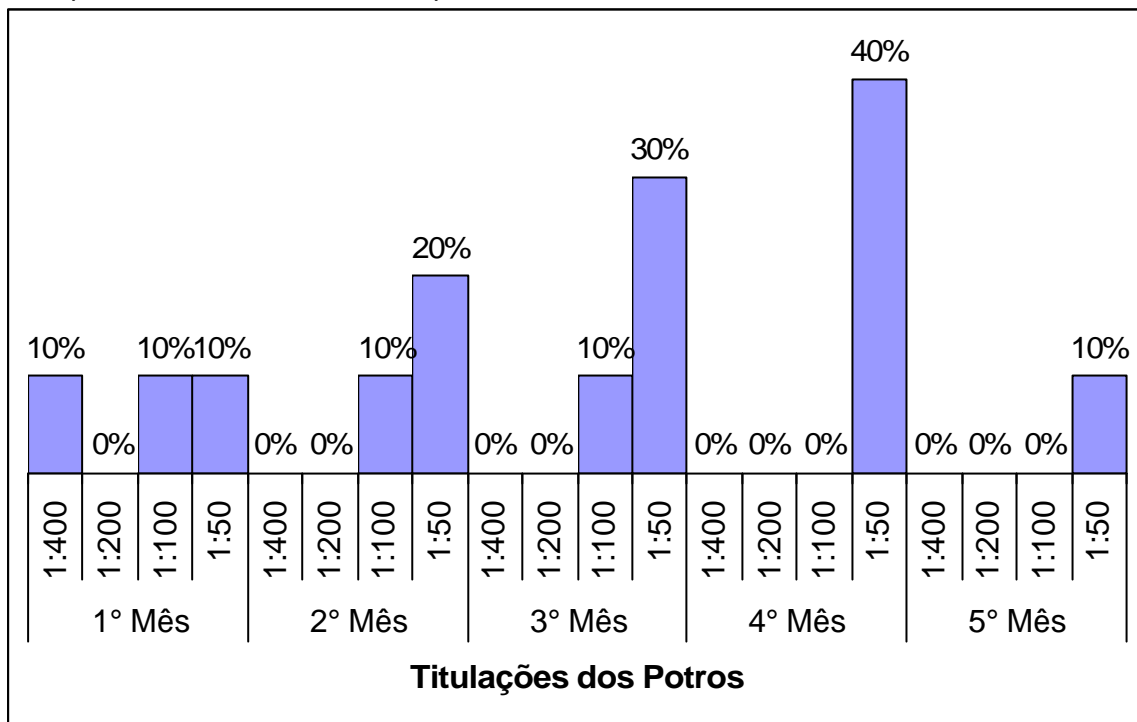
No 4° e 5° meses de vida não foram detectados níveis séricos de anticorpos para *Neospora sp.* Assim, estes meses representaram o início da queda significativa da influência da imunidade passiva para o protozoário *Neospora sp* (Figuras 5 e 6).

De todos os potros soropositivos em pelo menos um mês de vida, nenhum apresentou sinais clínicos de neosporose.

TABELA 9: Soroprevalência dos anticorpos anti-*Neospora* sp. conforme as titulações dos potros pré-colostrais e no 1°, 2°, 3°, 4° e 5° meses de vida.

Potros por Idade	Animais Soropositivos	Animais Soronegativos	Soroprevalência
Pré-colostró	0/10	10/10	0
1° mês	1/10(1:50)	7/10	10%
	1/10(1:100)		10%
	0/10(1:200)		0
	1/10(1:400)		10%
2° mês	2/10(1:50)	7/10	20%
	1/10(1:100)		10%
	0/10(1:200)		0
	0/10(1:400)		0
3° mês	3/10(1:50)	6/10	30%
	1/10(1:100)		10%
	0/10(1:200)		0
	0/10(1:400)		0
4° mês	4/10(1:50)	6/10	40%
	0/10(1:100)		0
	0/10(1:200)		0
	0/10(1:400)		0
5° mês	1/10(1:50)	9/10	10%
	0/10(1:100)		0
	0/10(1:200)		0
	0/10(1:400)		0

FIGURA 6: Soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora sp.* nas diferentes titulações durante os cinco primeiros meses de vida dos potros.



6.1.4.1 Soroprevalência dos potros nascidos de mães com e sem histórico de perdas reprodutivas

Das oito éguas sem histórico de perdas reprodutivas, três de seus potros apresentaram títulos de anticorpos (dois 1:100 no 1º e 2º meses, e um 1:400 no 1º mês) anti-*Neospora sp.*, e dois potros morreram no primeiro mês de vida (Tabela 5).

Das seis éguas com histórico de perdas reprodutivas, um de seus potros apresentou título de anticorpos (1:100 no 3º mês de vida) anti-*Neospora sp.*, um potro morreu no primeiro mês de vida e uma égua (16,6%) abortou (Tabela 6).

6.2 MONITORAMENTO SOROLÓGICO DAS ÉGUAS E DOS POTROS

6.2.1 Titulação 1:50 das éguas

Quanto à cinética dos anticorpos no 8º, 9º, 10º e 11º meses de gestação, verificou-se uma acentuada flutuação dos níveis séricos (Figuras 3 e 7), onde muitas éguas converteram de soronegativo para soropositivo, de soropositivo para soronegativo e, algumas novamente converteram de soronegativo para soropositivo.

Das oito éguas soropositivas no 8º mês de gestação, quatro (50%) permaneceram soropositivas e quatro (50%) converteram soronegativamente no 9º mês de gestação. Das seis éguas soronegativas no 8º mês de gestação, todas (100%) permaneceram soronegativas no 9º mês. Das quatro éguas soropositivas no 9º mês de gestação, apenas uma (25%) permaneceu soropositiva no mês subsequente, e das dez éguas soronegativas no 9º mês de gestação, seis (60%) converteram soropositivamente no mês subsequente. No 10º mês de gestação, das sete éguas soropositivas, quatro (57%) permaneceram soropositivas no mês subsequente, e, das sete éguas soronegativas, três (43%) converteram soropositivamente no 11º mês de gestação. Assim, o principal mês de conversão soropositiva foi o 10º mês e o principal mês de conversão soronegativa foi o 9º mês (Tabela 2).

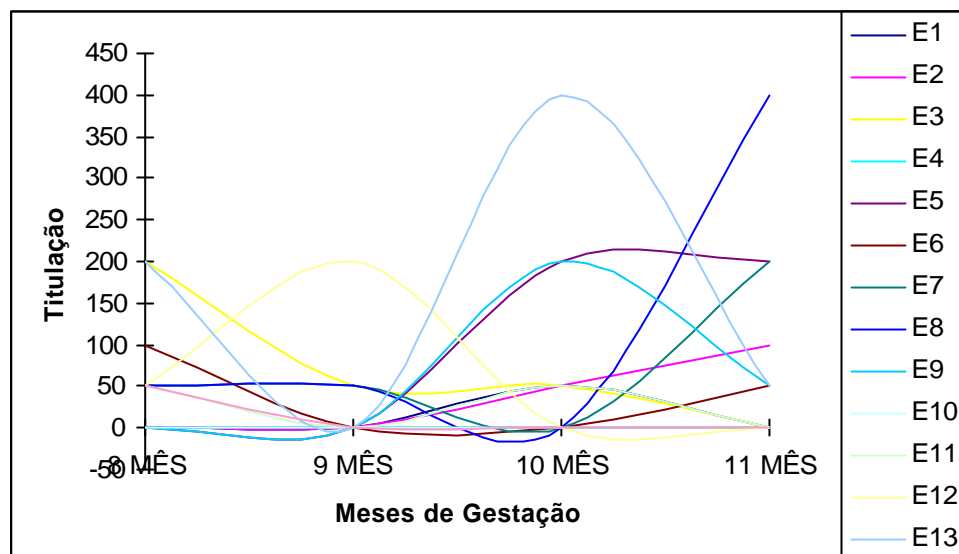
6.2.2 Titulação 1:100 das éguas

Quanto à cinética dos anticorpos no 8º, 9º, 10º e 11º meses de gestação, verificou-se uma baixa flutuação dos níveis séricos (Figuras 3 e 7).

Das três éguas soropositivas no 8º mês de gestação, duas (67%) converteram soronegativamente e permaneceram soronegativas até o 11º mês e uma (33%) soronegativou no mês subsequente, convertendo soropositivamente no 10º mês e convertendo novamente para soronegativo no 11º mês. Das 11 éguas soronegativas no 8º mês de gestação, apenas uma (9%) converteu soropositivamente no 9º mês. A única égua soropositiva no 9º mês de gestação soronegativou (100%) no mês subsequente e permaneceu assim até o último mês de gestação. Das 13 éguas soronegativas no 9º mês, três (23%) converteram soropositivamente no 10º mês de gestação. Neste mês, das três éguas soropositivas, duas (67%) soronegativaram no 11º mês e uma (33%) permaneceu soropositiva. Assim, o 10º e o 11º meses de gestação foram os que apresentaram maiores conversões soropositivas, e o 8º mês foi o que apresentou maiores conversões soronegativas (Tabela 3).

Os gráficos (Figuras 9 à 22) referentes ao monitoramento mensal dos anticorpos das éguas durante os quatro últimos meses de gestação estão apresentados no anexo.

FIGURA 7: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* das éguas no 8°, 9°, 10° e 11° meses de gestação.



6.1.1 Titulação 1:50 dos potros

Quanto a cinética dos anticorpos nos primeiros cinco meses de vida verificou-se uma moderada flutuação dos níveis séricos (Figuras 6 e 8).

Dos três potros soropositivos no 1° mês de vida, um (33%) soronegativou, e dos sete potros soronegativos, um (14%) converteu soropositivamente no mês subsequente. No 2° mês de vida, dos três potros soropositivos, dois (67%) soronegativaram, e dos sete soronegativos, três (43%) converteram soropositivamente no 3° mês. Neste último mês, dos quatro potros soropositivos, três (75%) soronegativaram, e dos seis soronegativos, três (50%) converteram soropositivamente no mês subsequente. No 4° mês de vida, dos quatro potros soropositivos, três (75%) soronegativaram, e dos seis animais soronegativos, nenhum (0%) soropositivou no 5° mês. Os principais meses de conversões soropositivas foram o 3° e o 4°, e o principal mês de conversão soronegativa foi o 5° mês de vida (Tabela 7).

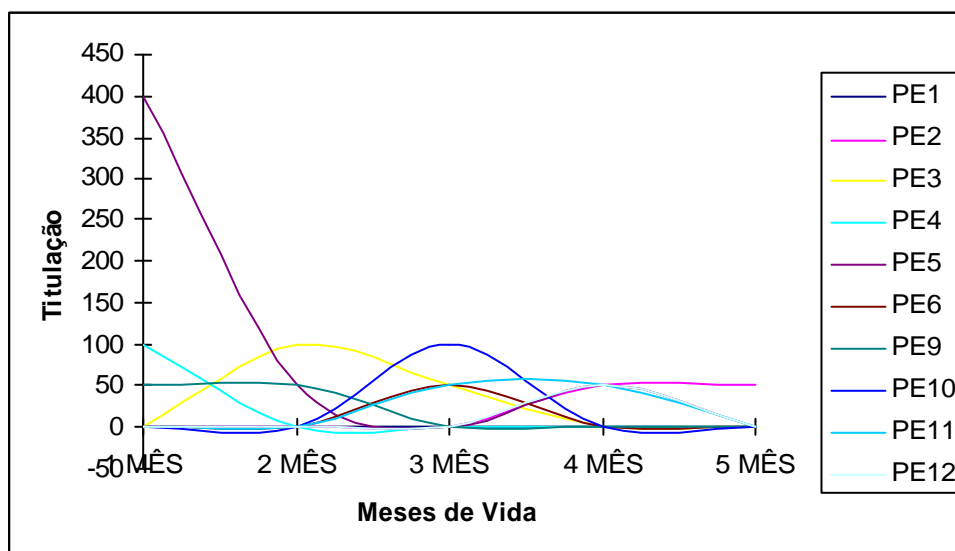
6.2.4 Titulação 1:100 dos potros

Quanto a cinética dos anticorpos nos primeiros cinco meses de vida não foi verificada flutuação dos níveis séricos (Gráficos 6 e 8).

Dos dois potros soropositivos no 1º mês de vida, ambos (100%) soronegativaram permanecendo assim até o 5º mês de vida, e dos oito potros soronegativos, apenas um (13%) converteu soropositivamente no mês subsequente. No 2º mês de vida, o único potro soropositivo soronegativou no mês subsequente e permaneceu (100%) assim até o 5º mês, e dos nove soronegativos, apenas um (11%) converteu soropositivamente no 3º mês. Neste último mês, o único potro soropositivo soronegativou (100%) no 4º mês e permaneceu assim até o 5º mês, e dos nove soronegativos, nenhum (0%) converteu soropositivamente no 4º e 5º meses. Os principais meses de conversões soropositivas foram o 2º e o 3º, e os principais meses de conversões soronegativas foram o 4º e 5º (Tabela 8).

Os gráficos (Figuras 23 à 32) referentes ao monitoramento mensal dos anticorpos dos potros durante os cinco primeiros meses de vida estão apresentados no anexo.

FIGURA 8: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* dos potros no 1º, 2º, 3º, 4º e 5º meses de vida.



7 DISCUSSÃO

O método sorológico de IFI (Imunofluorescência Indireta) utilizado para o diagnóstico de infecção por *Neospora sp.* demonstrou a presença do protozoário na população de equinos da região de São José dos Pinhais, Paraná.

A soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora sp.* das éguas nos quatro últimos meses de gestação foi de 86% na diluição 1:50. Na diluição 1:100, ela diminuiu para 64%.

Para os potros, a soroprevalência nos cinco primeiros meses de vida foi de 90% na diluição 1:50, diminuindo para 40% na diluição 1:100.

PITEL *et al.* (2001), CIARAMELLA *et al.* (2004) e LOCATELLI-DITTRICH *et al.* (2006) também verificaram uma diminuição na soroprevalência quando a diluição aumentou de 1:50 para 1:100.

Neste estudo foram utilizadas as diluições 1:50 e 1:100 como as mínimas a serem consideradas positivas em uma amostra, sendo adotada por muitos autores (CHEADLE *et al.*, 1999; GUPTA *et al.*, 2002; McDOLE e GAY, 2002; CIARAMELLA *et al.*, 2004; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2006 e VILLALOBOS *et al.*, 2006).

Considerar amostras positivas a partir da diluição 1:50 resulta no aumento da sensibilidade diagnóstica do método de IFI. Para VARDELEON *et al.* (2001), um benefício de se aumentar a sensibilidade é que um cavalo infectado, ou potencialmente infectado, pode ser identificado, como no caso de duas éguas soropositivas com baixo título (1:50) que transmitiram aos seus descendentes o protozoário *Neospora sp.*, sendo verificado através da detecção de anticorpos séricos nas amostras de soro pré-colostrais (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2006).

Entretanto, deve-se considerar que o aumento da sensibilidade diagnóstica também pode dar resultados falso-positivos provenientes de reações cruzadas com outros protozoários semelhantes (VARDELEON *et al.*, 2001; KYAW *et al.*, 2005 e JAKUBEK *et al.*, 2006).

Assim, recomenda-se primeiramente utilizar os métodos de ELISA ou IFI com o objetivo de triagem diagnóstica e, das amostras reagentes, aplicar um método mais específico, como o Western Blot, que identificará proteínas específicas dos protozoários *N. caninum* e *N. hughesi* (VARDELEON *et al.*, 2001; JAKUBEK *et al.*, 2006 e VILLALOBOS *et al.*, 2006).

Até o presente momento não existem estudos que avaliam a soroprevalência mensal de anticorpos anti-*Neospora sp.* de éguas gestantes e de potros após o nascimento.

Na verificação mensal da soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora sp.* em éguas gestantes e em seus respectivos potros, considerando amostras positivas na diluição 1:50, o 8º mês de gestação compreendeu na maior soroprevalência e o 9º mês na menor soroprevalência. Para os potros, o 3º e 4º meses de vida foram os de maior soroprevalência, e o 5º mês de vida o de menor soroprevalência.

Considerando as amostras de éguas positivas na diluição 1:100, o 11º mês compreendeu na maior soroprevalência e o 9º mês na menor soroprevalência. Para os potros, o 1º mês de vida foi o que apresentou a maior soroprevalência e o 4º e 5º meses compreenderam na menor soroprevalência.

COOK *et al.* (2001) acompanharam o tempo médio de diminuição da influência dos anticorpos maternos anti-*Sarcocystis neurona* dos potros do nascimento (incluindo amostras pré-colostrais e de 24 horas após ingestão de colostro) até os nove meses de vida, sendo que das éguas gestantes as amostras foram colhidas apenas no momento do parto. Eles observaram que todos os potros filhos de éguas soropositivas foram soropositivos nas amostras colhidas nas 24 horas após a ingestão colostrar, e os meses seguintes corresponderam em uma diminuição gradativa dos anticorpos maternos.

Em bovinos, HÄSLER *et al.* (2006) detectaram um aumento significativo nos níveis séricos de anticorpos anti – *N. caninum* no último mês de gestação. Estudos anteriores revelaram que a maior parte dos bovinos que transmitiram a infecção aos seus descendentes tiveram um aumento nos níveis séricos de anticorpos anti – *N. caninum* durante a gestação; e as vacas que não transmitiram a infecção a sua prole não tiveram um marcante aumento nos anticorpos séricos (PARE *et al.*, 1997; GUY *et al.*, 2001).

Sabe-se que o exame sorológico de bovinos com e sem histórico de abortos é utilizado para avaliar se os abortos podem ser atribuídos à neosporose. Se o parasita contribui para os abortos, a soroprevalência das vacas soropositivas e com histórico de aborto deverá ser significativamente maior que a de vacas soropositivas sem aborto (DUBEY *et al.*, 2002).

Neste estudo não foi observada associação entre soropositividade ao protozoário *Neospora sp.* e histórico de perdas reprodutivas em éguas. O protozoário *Neospora sp.* não foi o agente primário causal das perdas reprodutivas.

Existem poucos estudos relacionando a presença de anticorpos anti-*Neospora sp.* e a perda reprodutiva em eqüinos. VILLALOBOS *et al.* (2006) demonstraram uma associação positiva entre a presença de anticorpos anti-*Neospora sp.* e perda fetal em eqüinos. Já McDOLE e GAY (2002), PITEL *et al.* (2003b); DUARTE *et al.* (2004) e LOCATELLI-DITTRICH *et al.* (2006) não detectaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de éguas com e sem histórico de perdas reprodutivas.

De acordo com McDOLE e GAY (2002), se a soropositividade ao *Neospora sp.* nos eqüinos está associada com aborto, esta conseqüência apresenta menor magnitude quando comparado aos bovinos. Para PITEL *et al.* (2003b), esta conseqüência se deve provavelmente às diferenças de placentação entre as duas espécies.

O protozoário *Neospora caninum* é reconhecido como a maior causa de abortos e perdas neonatais em bovinos de vários países (ANDERSON *et al.*, 2000; DUBEY e SCHARES, 2006). Nos eqüinos, as consequências desta infecção são pouco conhecidas e não se sabe ao certo se *N. caninum*, *N. hughesi*, ou ambos os protozoários infectam estes animais (HOANE *et al.*, 2006).

Apesar do protozoário *Neospora sp.* ter sido detectado em fetos eqüinos nos EUA e França, as informações ainda são limitadas com relação à associação entre infecções por *Neospora sp.* e abortos (DUBEY e PORTERFIELD, 1990; PRONOST *et al.*, 1999). LOCATELLI-DITTRICH (2002), no Paraná, detectou anticorpos para *Neospora sp.* em eqüinos de um haras com histórico de surto de abortos, e isolou duas cepas de *Neospora sp.* de feto eqüino, EQNC/PR1 e EQNC/PR2.

Neste estudo, as análises sorológicas de IFI realizadas em potros pré-colostrais foram todas negativas. Assim, a transmissão vertical do protozoário *Neospora sp.* não foi verificada na população estudada.

COOK *et al.* (2001) também não verificaram a ocorrência de transmissão vertical em amostras séricas de potros pré-colostrais nascidos de éguas soropositivas e soronegativas para o protozoário *S. neurona*.

Existem poucos trabalhos com eqüinos relacionando a eficiência da transmissão vertical de *Neospora sp.* LOCATELLI-DITTRICH *et al.* (2006) detectaram uma baixa eficiência da transmissão vertical onde verificaram anticorpos anti-*Neospora sp.* em amostras séricas de apenas dois potros antes da ingestão de colostro.

Outros estudos detectaram taquizoítas de *Neospora sp.* em fetos e em placentas de éguas, evidenciando a transmissão vertical do protozoário na espécie eqüina (DUBEY e PORTERFIELD, 1990; DUBEY *et al.*, 1990; PRONOST *et al.*, 1999; PITEL *et al.*, 2003b; LOCATELLI-DITTRICH, 2002).

A placenta da égua é do tipo epiteliocorial difusa, assim, as imunoglobulinas maternas não são transmitidas ao feto durante a gestação. Aos 180 dias de gestação o potro já é capaz de secretar pequenas quantidades de imunoglobulinas endógenas. Assim, um potro pré-colostral positivo significa que ele foi exposto, via congênita, ao protozoário após estes 180 dias (LeBLANC, 1990).

Em bovinos, estudos utilizando amostras séricas pré-colostrais revelaram que 81-95% das vacas infectadas com *Neospora caninum* transmitem a infecção aos seus descendentes (ANDERSON *et al.*, 1997., SCHARES *et al.*, 1998 e DIJKSTRA *et al.*, 2001).

Entretanto, o achado de bezerros infectados com baixos títulos de anticorpos séricos pré-colostrais e bezerros nascidos de vacas infectadas sem anticorpos séricos pré-colostrais, convertendo soropositivamente somente em idade mais avançada, indica que a sorologia pré-colostral pode não ser um método eficaz para identificar bezerros com infecção congênita (HIETALA e THURMOND, 1999; SAGER *et al.*, 2001; KYAW *et al.*, 2005).

Em eqüinos, possivelmente, a transmissão vertical de *Neospora sp.* é baixa, diferentemente do que ocorre em bovinos onde este modo de transmissão é o principal mantenedor da doença no rebanho (PITEL *et al.*, 2003b).

Essa menor eficiência de transmissão nos eqüinos quando comparado aos bovinos foi verificada por McDOLE e GAY (2002) e PITEL *et al.* (2003), onde concluíram que ela se deve principalmente às diferenças de placentação existentes entre as duas espécies.

Quanto à transmissão passiva dos anticorpos maternos anti-*Neospora sp.*, verificou-se uma baixa eficiência. Somente três potros das 12 éguas soropositivas foram soropositivos no 1º mês de vida e durante os quatro meses seguintes existiram conversões de soronegativo para soropositivo, e vice-versa, flutuações dos níveis séricos de anticorpos e até ausência de titulação.

A absorção máxima das imunoglobulinas ocorre nas primeiras 24 horas de vida do potro e seu declínio segue após estas 24 horas (LeBLANC, 1990). Assim, esta baixa eficiência pode ser explicada, já que as amostras de sangue dos potros no primeiro mês de vida foram coletadas aproximadamente da segunda a quarta semana de vida.

Há também a variação individual dos potros frente a absorção passiva dos anticorpos maternos e seu metabolismo, assim como também a variação individual das éguas, onde cada uma tem uma eficiência particular na transmissão passiva dos anticorpos (COOK *et al.*, 2001).

Até o presente momento não existem estudos que avaliam a eficiência da transmissão passiva dos anticorpos maternos anti-*Neospora sp.* em eqüinos e nem sobre sua frequência de transmissão e taxa de declínio através do tempo.

COOK *et al.* (2001) detectaram uma eficiência de 100% da transmissão passiva dos anticorpos maternos anti-*S. neurona* nas amostras colhidas 24 horas após iniciadas as mamadas. Todos os potros nascidos de mães soropositivas a este protozoário se tornaram soropositivos após a ingestão de colostro.

A análise do metabolismo dos anticorpos maternos específicos para determinadas doenças deve ser quantificada para verificar sua taxa de declínio através do tempo (COOK, 2001).

Neste estudo não foram utilizados métodos quantitativos específicos, apenas observou-se o período de tempo em que os potros se tornaram soronegativos para o protozoário *Neospora sp.*

Os meses que iniciaram o declínio da influência dos anticorpos maternos foram o 5º mês de vida, quando interpretada na diluição 1:50, e o 4º mês de vida, quando interpretada na diluição 1:100.

Para COOK *et al.* (2001), o tempo médio de duração das imunoglobulinas maternas para o protozoário *S. neurona* foi de 4,2 meses, dentro de uma escala de 1 a 9 meses de vida.

A análise sorológica entre mães e filhos pode fornecer informações se a infecção é predominantemente transmitida verticalmente no rebanho bovino (THURMOND *et al.*, 1997).

COOK *et al.* (2001), que realizaram o diagnóstico sorológico de *S. neurona* através da técnica de Western Blot, observaram extrema similaridade entre os padrões de bandas de mães e filhos. Situação esperada, já que os anticorpos presentes nos potros são os mesmos existentes nas suas respectivas mães.

As análises estatísticas realizadas para verificar a associação entre soropositividade de mãe e filho, e soropositividade de mãe e óbito de filho, nas diluições 1:50 e 1:100, resultaram em uma relação de independência, ou seja, a condição sorológica da mãe não interfere, ou interfere pouco na condição sorológica e na saúde de seu descendente.

A relação de independência encontrada neste trabalho pode ser explicada por diversos fatores: característica de recrudescência da infecção, resultando em transmissões esporádicas e inconstantes; algumas éguas consideradas positivas a baixos títulos poderiam somente ter sido expostas ao protozoário, não resultando em uma infecção propriamente dita; a característica de instabilidade dos anticorpos séricos, já observada por alguns autores (SAGER *et al.*, 2001; KYAW *et al.*, 2005; HÄSLER *et al.*, 2006), gerando uma instabilidade de transmissão; a eficiência da transmissão passiva dos anticorpos anti-*Neospora sp.* em eqüinos pode ser baixa e/ou a concentração passada é pequena, não sendo assim detectado pelos métodos sorológicos convencionais; e/ou a existência de reações cruzadas a protozoários semelhantes e resultados falso-positivos ou falso-negativos, necessitando adotar, além da técnica de IFI, um método mais específico, como o Western Blot / Imunoblot.

A neosporose é uma doença causada pelos protozoários *N. caninum* e *N. hughesi*. Nos eqüinos, a forma clínica da doença caracteriza -se por aborto, doença neonatal e encefalomielite. *Neospora hughesi* foi recentemente descoberto como agente causador da MEP, além do *S. neurona* (MARSH *et al.*, 1998; CHEADLE *et al.*, 1999; DUBEY *et al.*, 2001).

A maioria dos casos de neosporose eqüina são atribuídos ao protozoário *N. caninum*, entretanto, permanece incerto se os dois protozoários, *N. caninum* e *N. hughesi*, estão envolvidos ou somente o *N. hughesi* é o responsável pela doença nos eqüinos (DUBEY e PORTERFIELD, 1990; MARSH *et al.*, 1998).

A neosporose clínica não foi observada neste trabalho, apesar de ter ocorrido um aborto e três mortes de potros com um mês de vida. As causas das mortes e do aborto não puderam terem sido investigadas, entretanto, todas as quatro éguas relacionadas a essas mortes foram soropositivas a partir da diluição 1:50, e três delas foram soropositivas a partir da diluição 1:100.

Não existem estudos relacionando a possibilidade de cavalos clinicamente sadios e soropositivos de desenvolverem a neosporose clínica.

VARDELEON *et al.* (2001) não verificaram sinais clínicos compatíveis com neosporose e nem lesões post-mortem de um cavalo infectado experimentalmente com *N. caninum*. HAMIR *et al.* (1998) somente observaram a neosporose clínica em cavalos imunodeprimidos.

Em eqüinos não existem estudos que avaliam o comportamento dos níveis séricos de anticorpos anti-*Neospora sp.* através do tempo.

Neste trabalho, considerando amostras positivas na diluição 1:50, no monitoramento mensal de anticorpos das éguas no 8^o, 9^o, 10^o e 11^o meses de gestação, verificou-se uma acentuada flutuação dos níveis séricos. Aumentando a diluição para 1:100, a flutuação diminuiu consideravelmente.

No monitoramento mensal nos primeiros cinco meses de vida dos potros, a flutuação também foi verificada e foi maior nas amostras consideradas positivas a partir da diluição 1:50.

COOK *et al.* (2001) verificaram a conversão soropositiva de duas éguas gestantes inicialmente soronegativas para *Sarcocystis neurona*. No monitoramento dos potros neonatos verificaram uma correlação de 100% entre os resultados sorológicos de mães e filhos, com uma diminuição gradativa dos anticorpos maternos até os nove meses de vida sem existência de flutuações.

Sabe-se que após o aborto nos bovinos, os títulos de anticorpos das vacas geralmente são elevados. LOCATELLI-DITTRICH (2002) observou que os títulos das éguas que abortaram fetos infectados por *N. caninum* não foram altos. Nas vacas pode ocorrer uma instabilidade temporária na concentração de anticorpos de *N. caninum*, e mesmo um resultado sorológico negativo da mãe, não exclui a possibilidade do aborto. Uma soroconversão recente ao parasita também pode resultar em títulos mais baixos (SAGER *et al.*, 2001), como os encontrados por LOCATELLI-DITTRICH (2002), para as éguas, pois esta pode corresponder a fase de janela imunológica.

Permanece incerto o motivo pelo qual as éguas e os potros deste estudo se tornaram negativos e, alguns novamente soropositivos, durante o acompanhamento sorológico.

Em bovinos, os níveis de anticorpos específicos para *N. caninum* podem persistir durante toda a vida do animal mas podem também flutuar, estando muitas vezes abaixo do limite de detecção dos testes sorológicos (DUBEY e SCHARES, 2006).

Nestes animais, a flutuação dos níveis séricos de anticorpos anti-*Neospora sp.* pode ser observada durante a gestação próximo do aborto ou no momento do parto (HIETALA e THURMOND, 1999; SAGER *et al.*, 2001; KYAW *et al.*, 2005 e HÄSLER *et al.*, 2006).

HIETALA e THURMOND (1999), SAGER *et al.* (2001) e HÄSLER *et al.* (2006) verificaram uma instabilidade dos níveis séricos de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas gestantes. SCHARES *et al.* (1998) e KYAW *et al.* (2005) observaram conversões soronegativas de vacas gestantes inicialmente soropositivas.

Os níveis séricos de anticorpos anti-*N. caninum* podem diminuir abaixo do limite de detecção em testes menos sensíveis, ocasionando resultados falso-negativos. Assim, alguns animais mesmo estando infectados podem não desenvolver anticorpos suficientes, ou os anticorpos não são detectados pelos testes sorológicos (CONRAD *et al.*, 1993; ANDREOTTI *et al.*, 2003 e DUBEY e SCHARES, 2006).

Alguns indivíduos não são capazes de sintetizar anticorpos detectáveis contra o parasita, talvez devido a uma imunotolerância inata ou adquirida. HIETALA e THURMOND (1999) verificaram que alguns bezerros nascidos de vacas infectadas soroconverteram somente aos dois anos de idade; e SAGER *et al.* (2001), observaram que nem todos os bezerros nascidos de vacas soropositivas foram soropositivos nas amostras pré-colostrais, embora eles tenham sido infectados congenitamente; e fetos positivos pela PCR para *N. caninum* nasceram de vacas soronegativas.

As fêmeas de rebanhos bovinos com infecção endêmica apresentam uma resposta maior de anticorpos anti-*N. caninum* quando comparado às fêmeas pertencentes a rebanhos com infecções recentes (DUBEY e SCHARES, 2006).

KYAW *et al.* (2005) sugeriram que a conversão soronegativa pode ocorrer no momento do parto nas vacas infectadas cronicamente, e que a verdadeira taxa de transmissão vertical pode ser menor do que nos estudos anteriores. Além do mais, bezerros infectados congenitamente podem ter títulos de anticorpos muito baixos, indicando que os valores de cut-off devem ser diminuídos.

HIETALA e THURMOND (1999) acreditam que bovinos infectados congenitamente adquirem uma infecção persistente, tendo uma persistência de anticorpos específicos para *N. caninum*. Já os animais que adquirem a infecção após o nascimento, as respostas aos anticorpos são transitórias, apresentando picos a cada nova exposição ao protozoário. Assim, um bovino exposto ao protozoário *N. caninum* apresentará uma resposta de anticorpos que poderá diminuir se ele não for estimulado imunogenicamente por uma exposição repetida ou por uma infecção persistente.

A instabilidade temporária da concentração de anticorpos de *N. caninum*, em bovinos adultos limita a utilização da sorologia no diagnóstico, principalmente nos casos dos animais soronegativos. O resultado sorológico negativo da mãe não exclui a possibilidade de aborto por *Neospora*. Assim, é importante retestar as amostras com testes sorológicos mais específicos, como o Western Blot (ANDREOTTI *et al.*, 2003; HÄSLER *et al.*, 2006).

A sorologia tem sido utilizada frequentemente como a única ferramenta para estudos epidemiológicos de *N. caninum* associado a problemas de abortos, e muitos autores presumem que uma maior correlação existe entre a soropositividade e a presença persistente do parasita nos animais afetados. Entretanto, para a investigação diagnóstica de casos de abortos, a sorologia sozinha é insuficiente. Como exemplo cita-se um estudo de SAGER *et al.* (2001), em que das 210 vacas que abortaram, 92 foram sorologicamente positivas ao *N. caninum*, mas somente 42 dos fetos abortados foram positivos pelo PCR, ou seja, *N. caninum* pode ser detectado em menos que a metade dos abortos de vacas soropositivas. Assim, o diagnóstico de aborto associado ao *N. caninum* requer a demonstração do parasita ou o DNA do parasita associado a lesões patológicas características (DUBEY e SCHARES, 2006).

Estudos adicionais sobre a prevalência dos parasitas *N. caninum* e *N. hughesi* em populações eqüinas são necessários antes de apreciar os reais impactos destas espécies de protozoários na saúde eqüina. A estimativa de prevalência da infecção nos animais é o passo inicial para selecionar as estratégias de controle de aborto e problemas neurológicos. O diagnóstico de neosporose depende de uma combinação entre o histórico, sinais clínicos e dados laboratoriais (DUBEY *et al.*, 2002; DUBEY e SCHARES, 2006).

Este trabalho visou contribuir com a escassa literatura de neosporose em eqüinos. No Brasil são freqüentes os casos de abortos e doenças neurológicas sem um diagnóstico definitivo, e a neosporose não é incluída como rotina nos exames laboratoriais.

No Brasil, os poucos estudos de neosporose eqüina se referem aos estudos de soroprevalência em populações saudáveis e com histórico de perdas reprodutivas (DUBEY *et al.*, 2000; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2006; HOANE *et al.*, 2006; VILLALOBOS *et al.*, 2006). Apenas um estudo compreendeu na análise da transmissão vertical (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2006), e somente LOCATELLI-DITTRICH (2002) isolou cepas do protozoário *Neospora sp.* de éguas que abortaram.

Um dado relevante obtido pelo trabalho executado é que o agente *Neospora sp.* está presente na população eqüina e que novas pesquisas devem ser prosseguidas. Os Médicos Veterinários devem estar atentos para esta doença emergente.

8 CONCLUSÕES

1. Anticorpos anti-*Neospora sp.* foram detectados nas amostras séricas de éguas gestantes e de seus respectivos potros da região de São José dos Pinhais-PR, Brasil. As soroprevalências encontradas permitem sugerir a inclusão deste protozoário no diagnóstico diferencial de doenças neurológicas e reprodutivas.
2. As melhores idades gestacionais para se realizar o diagnóstico sorológico (IFI) de éguas gestantes é o 8º mês (cutt-off 1:50) e o 11º mês (cutt-off 1:100), devendo-se repetir o exame no caso de resultados negativos em virtude da existência de possíveis flutuações dos anticorpos séricos.
3. Para os potros, a melhor idade para se realizar o diagnóstico sorológico (IFI) inicia-se a partir do 4º e 5º meses de vida, período a partir do qual a influência materna está diminuída.
4. Não houve associação entre soropositividade ao protozoário *Neospora sp.* e histórico de perdas reprodutivas em éguas. Assim, o protozoário *Neospora sp.* pode não ser o principal agente causal de perdas reprodutivas em eqüinos.
5. A transmissão vertical de *Neospora sp.* em eqüinos é baixa, dado a inexistência de anticorpos nas amostras séricas pré-colostrais.
6. A transmissão passiva dos anticorpos maternos anti-*Neospora sp.* não ocorre de forma freqüente nos eqüinos, já que no 1º mês de vida apenas três potros foram soropositivos.
7. A não associação entre soropositividade de mães e filhos limitou a utilização da sorologia no estudo da análise de transmissão.
8. Houve instabilidade dos níveis séricos de anticorpos anti-*Neospora sp.* nas éguas avaliadas.
9. A presença de intensa instabilidade dos níveis de anticorpos nas amostras séricas de éguas e potros prejudicou a interpretação das análises sorológicas. Assim, a utilização de testes mais específicos possibilitaria acurar melhor esses resultados.

9 REFERÊNCIAS

- ANDERSON, M.L.; BLANCHARD, P.; BARR, B.C.; DUBEY, J.P.; HOFFMAN, R.L.; CONRAD, P.A. *Neospora* infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.198, p.241-244, 1991.
- ANDERSON, M.L.; REYNOLDS, J.P.; ROWE, J.D.; SVERLOW, K.W.; PACKHAM, A.E.; BARR, B.C.; CONRAD, P.A. Evidence of vertical transmission of *Neospora sp.* infection in dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.210, p.1169-1172, 1997.
- ANDERSON, M.L.; ANDRIANARIVO, A.G.; CONRAD, P.A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.60-61, p.417-431, 2000.
- ANDREOTTI, R.; LOCATELLI-DITTRICH, R.L.; SOCCOL, V.T.; PAIVA, F. **Diagnóstico e controle da neosporose em bovinos**. Campo Grande: Embrapa, (Documentos 136), 2003. 51p.
- ANDRIANARIVO, A.G.; CHOROMANSKI, L.; McDONAUGH, S.P.; PACKHAM, A.E.; CONRAD, P.A. Immunogenicity of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoites preparation formulated with different adjuvants. **International Journal for Parasitology**, 29, p.1613-1625. 1999.
- BARR, B.C.; ROWE, J.D.; SVERLOW, K.W.; BONDURANT, R.H.; ARDANS, A.A.; OLIVER, M.N.; CONRAD, P.A. Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.6, p.207-215. 1994.
- 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. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v.87, n.3, p.612-618, 2001.
- BENTZ, B.G.; GRANSTROM, D.E.; STAMPER, S. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in a country of southeastern Pennsylvania. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.210, p.517-518, 1997.
- BIELSA, J.M.; ROMERO, J.J.; HEUER, C. Controle da neosporose em bovinos com Bovilis Neoguard: a experiência de campo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n.1, 2004.
- BJERKAS, L., MOHN, S.F., PRESTHUS, J. Unidentified cystforming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift fuer Parasitenkunde**, Berlin, 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**, Schaumburg, v.208, p.1441-1444, 1996.
- BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.29, p.1497-1507, 1999.
- BLYTHE, L.L., GRANSTROM, D.E., HANSON, D.E., WALKER, L.L., BARTLETT, J., STAMPER, S. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in Oregon. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.210, p.517-518, 1997.

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 Parasitology**, v.18, n.12, p.546-552, 2002.

CHEADLE, M.A.; LINDSAY, D.S.; ROWE, S.; DYKSTRA, C.C.; WILLIAMS, M.A.; SPENCER, J.A.; TOIVIO-KINNUCAN, M.A.; LENZ, S.D.; NEWTON, J.C.; ROLSMA, M.D.; BLAGBURN, B.L. Prevalence of antibodies to *Neospora sp.* in horses from Alabama and characterization of an isolate recovered from a naturally infected horse. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.29, p.1537-1543, 1999.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M.; CORTESE, L.; PIANTEDOSI, D.; SANTORO, D.; Di LORIA, A.; RIGATO, R. Seroprevalence of *Neospora spp.* in asymptomatic horses in Italy. **Veterinary Parasitology**, v.123, p.11-15, 2004.

COHEN, N.D.; MACKAY, R.J. Interpreting immunoblot testing of cerebrospinal fluid for equine protozoal myeloencephalitis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Trenton, v.19, p.1176-1181, 1997.

CONRAD, P.A.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M.; ROWE, J.; BONDURANT, R.; TUTER, G.; BREITMEYER, R.; PALMER, C.; THURMOND, M.; ARDANS, A.; DUBEY, J.P.; DUHAMEL, G.; BARR, B. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.5, p.572-578, 1993.

COOK, A.G. **Interpretation of the detection of antibodies to *Sarcocystis neurona* in the serum and CSF of young horses.** Blacksburg, 2001. Masters – Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University.

COOK, A.G.; BUECHNER-MAXWELL, V.; MORROW, J.K.; WARD, D.L.; PARKER, N.A.; DASCANIO, J.J.; LEY, W.B.; COOPER, W. Interpretation of the detection of *Sarcocystis neurona* antibodies in the serum of young horses. **Veterinary Parasitology**, v.95, p.187-195, 2001.

DAFT, B.M.; BARR, B.C.; COLLINS, N.; SVERLOW, K. *Neospora* encephalomyelitis and polyradiculoneuritis in an aged mare with Cushing's disease. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v.29, p.240-243, 1997.

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H.W.; EYSKER, M.; WOUDA, W. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.209-215, 2001.

DUARTE, P.C.; CONRAD, B.C.; BARR, W.; DAVID WILSON, G.L.; FERRARÓS, A.E.; PACKHAM, T.E.; CARPENTER, I.A.; GARDNER. Risk of transplacental transmission of *Sarcocystis neurona* and *Neospora hughesi* in California horses. **The Journal of Parasitology**, v.90, p.1345-1351, 2004.

DUBEY, J.P.; CARPENTER, J.L.; SPEECER, C.A.; TOPPER, M.J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.192, n.10, p.1269-1285, 1988a.

DUBEY, J.P.; HATTEL, A.L.; LINDSAY, D.S.; TOPPER, M.J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.193, p.1259-1263, 1988b.

DUBEY, J.P.; LEATHERS, C.W.; LINDSAY, D.S. *Neospora caninum* – like protozoon associated with fatal myelitis in newborn calves. *The Journal of Parasitology*, Lawrence, v.75, p.146-148, 1989.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v.50, p.1578-1579, 1989a.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Transplacental *Neospora caninum* infection in cats. *The Journal of Parasitology*, Lawrence, v.75, p.765-771, 1989b.

DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.2, p.230-233. 1990.

DUBEY, J.P.; HARTLEY, W.J.; LINDSAY, D.S.; TOPPER, M.J. Fatal congenital *Neospora caninum* infection in a lamb. **The Journal of Parasitology**, v.76, p.127-130, 1990.

DUBEY, J.P.; PORTERFIELD, M.L. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. **International Journal for Parasitology**, Lawrence, v. 76, p.732-734, 1990.

DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., ANDERSON, M.L., DAVIS, S.W., SHEN, S.K. Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.201, p.709-713, 1992.

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

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; ADAMS, D.S., GAY, J.M.; BASZLER, T.V.; BLAGBURN, B.L.; THULLIEZ, P. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.57, p.320-326. 1996.

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

DUBEY, J.P. Neosporosis – the first decade of research. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.29, p.1485-1488, 1999a.

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

DUBEY, J.P.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; KWOK, O.C.; SHEN, S.K.; GAMBLE, H.R. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horses in North America. **The Journal of Parasitology**, v.85, p.968-969, 1999a.

DUBEY, J.P.; VENTURINI, M.C.; VENTURINI, L.; MCKINNEY, J.; PECORARO, M. Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses from Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.86, n.1, p.59-62, 1999b.

DUBEY, J.P., KERBER, C.E., GRANSTROM, D.E. Serologic Prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in horses in Brazil. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.215, p.970-972, 1999c.

DUBEY, J.P.; LIDDEL, S.; MATTSON, D.; SPEER, C.A.; HOWE, D.K.; JENKINS, M.C. Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v.87, n.2, p.345-353, 2001.

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.; SPEECER, 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**, Oxford, v.32, p. 926-946, 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.

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

FLOOD, P.F. Fertilization, early development, and the establishment of the placenta. In: _____. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993. p.473-485.

GRAY, M.L., HARMON, B.G., SALES, L., DUBEY, J.P. Visceral neosporosis in a 10-years-old horse. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.8, p.130-133, 1996.

GUY, C.S.; WILLIAMS, D.J.L.; KELLY, D.F.; McGARRY, J.W.; GUY, F.; BJÖRKMAN, C.; SMITH, R.F.; TREES, A.J. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. **Veterinary Records**, v.149, p.443-449, 2001.

GUPTA, G.D.; LAKRITZ, J.; KIM, J.H.; KIM, D.Y.; KIM, J.K.; MARSH, A.E. Seroprevalence of *Neospora*, *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from Jeju island, South Korea. **Veterinary Parasitology**, v.106, p.193-201, 2002.

HAMIR, A.N.; MOSER, G.; GALLIGAN, D.T.; DAVIS, S.W.; GRANSTROM, D.E.; DUBEY, J.P. Immunohistochemical study to demonstrate *Sarcocystis neurona* in equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.5, p.418-422, 1993.

HAMIR, A.N.; TORNQUIST, S.J.; GERROS, T.C.; TOPPER, M.J.; DUBEY, J.P. *Neospora caninum*-associated equine protozoal myeloencephalitis. **Veterinary Parasitology**, v.79, p.269-274, 1998.

HÄSLER, B.; HERNANDEZ, J.A.; REIST, M.; SAGER, H.; STEINER-MORET, C.; STAUBLI, D.; STÄRK, K.D.C.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum*: Serological follow-up in dairy cows during pregnancy. **Veterinary Parasitology**, v.137, p.222-230, 2006.

HEMPHILL, A.; FUCHS, N.; SONDA, S.; GOTTSTEIN, B.; HENTRICH, B. Identification and partial characterization of a 36 KDa surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. **Veterinary Parasitology**, v.115, p.371-380, 1997.

HEMPHILL, A.; GAJINDRAN, N.; SONDA, S.; FUCHS, N.; GOTTSTEIN, B.; HENTRICH, B. Identification and characterization of a dense granule-associated protein in a *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.429-438, 1998.

HEMPHILL, A.; FUCHS, N.; SONDA, S.; HEHL, A. The antigenic composition of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1175-1188, 1999.

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B.; CONRATHS, F.J.; MEERSCHMAN, F.D.; ELLIS, J.T.; INNES, E.A.; McALLISTER, M.M.; ORTEGA-MORA, L.M.; TENTER, A.M.; TREES, A.J.; UGGLA, A.; WILLIAMS, D.J.L.; WOUDA, W. An European perspective on *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.30, p.877-924, 2000.

HIETALA, S.K.; THURMOND, M.C. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.29, p.1669-1676, 1999.

HOANE, J.S.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; RIBEIRO, M.G.; BORGES, A.S.; YAI, L.E.O.; AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; BONESI, G.L.; HOWE, D.K. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora spp.* infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. **Veterinary Parasitology**, v.136, p.155-159, 2006.

HOFFMANN, D.C.S.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; LAGROTERIA, D.C.; PIZZOL, J.D. Diagnóstico sorológico de neosporose em eqüinos e sua possível associação com abortos. In: EVINCI – EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12, Curitiba, 2004. **Resumo**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2004. p. 8.

HOWE, D.K., CRAWFORD, A.C., LINDSAY, D., SIBLEY, L.D. The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infect. Immun.** v.66, p.5322-5328. 1998.

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

INNES, E.A.; ANDRIANARIVO, A.G.; BJÖRKMAN, C.; WILLIAMS, D.J.L.; CONRAD, P.A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, v.18, n.11, p.497-504, 2002.

JAKUBEK, E.B.; LUNDÉN, A.; UGGLA, A. Seroprevalences of *Toxoplasma gondii* and *Neospora sp.* infections in Swedish horses. **Veterinary Parasitology**, v.138, p.194-199, 2006.

JENKINS, M.C. Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v.101, p.291-310, 2001.

JENSEN, L.; JENSEN, T.K.; LIND, P.; HENRIKSEN, S.A.; UGGLA, A.; BILLE-HANSEN, V. Experimental porcine neosporosis. **Acta Pathology Microbiology Immunology Scand**, v.106, p.475-482, 1998.

KIM, J.P.; PARK, J.Y.; SEO, H.S.; OH, H.G., NOH, J.W.; KIM, J.H.; KIM, D.Y.; YOUN, H.J. *In vitro* antiprotozoal effects of artemisin on *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v.103, p. 53-63, 2002.

KWON, H.J., KIM, J.H.; KIM, M.; LEE, J.K.; HWANG, W.S.; KIM, D.Y. Anti-parasitic activity of depudecin on *Neospora caninum* via the inhibition of histone deacetylase. **Veterinary Parasitology**, v.112, p.269-276, 2003.

KYAW, T.; SUWIMONTURABUTR, J.; VIRAKUL, P.; LOHACHIT, C.; KALPRAVIDH, W. Seronegative conversion in four *Neospora caninum* – infected cows, with a low rate of transplacental transmission. **Veterinary Parasitology**, v.131, p.145-150, 2005.

LAVOIE, J.P.; SPENSLEY, M.S.; SMITH, B.P.; MIHALYI, J. Colostral volume and immunoglobulin G and M determinations in mares. **American Journal Veterinary Research**, v.50, p.466-470, 1989.

LeBLANC, M.M.. Immunologic considerations. In: _____. **Equine Clinical Neonatology**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1990. p.275-294.

LIDDELL, S., JENKINS, M.C., COLLICA, C.M., DUBEY, J.P. Prevention of vertical transfer of *Neospora caninum* in BALB/c mice by vaccination. **The Journal of Parasitology**, v.85, p.1072-1075, 1999.

LINDSAY, D.S., RIPPEY, N.S., POWE, T.A., SARTIN, E.A., DUBEY, J.P., BLAGBURN, B.L. Abortion, fetal death, and stillbirth in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. **American Journal of Veterinary Research**, v.56, p.1176-1180, 1995.

LINDSAY, D.S., STEINBERG, H., DUBIELZIG, R.R., SEMRAD, S.D., KONKLE, D.M., MILLER, P.E., BLAGBORN, B.L. Central nervous system neosporosis in a foal. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.8, p.507-510, 1996.

LINDSAY, D.S., BUTLER, J.M.; BLAGBURN, B.L. Efficacy of decoquinate against *Neospora caninum* tachyzoites in cell cultures. **Veterinary Parasitology**, n.68, p.35-40, 1997.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; DUNCAN, R.B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.82, n.4, p.327-333, 1999.

LINDSAY, D.S. Neosporosis: an emerging protozoal disease of horses. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v.33, n.2, p. 116-118, 2001. **The Journal of Parasitology**, v.85, p.1072-1075, 1999.

LOCATELLI-DITTRICH, R. **Diagnóstico sorológico, isolamento, cultivo e caracterização molecular de *Neospora caninum* em bovinos leiteiros e em eqüinos no Estado do Paraná, Brasil**. Curitiba, 2002. 184p. Tese de Doutorado - Setor de Tecnologia – Universidade Federal do Paraná.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; DITTRICH, J.R.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; ANTUNES, J.; PINCKNEY, R.D.; DECONTO, I.; HOFFMANN, D.C.S.; THOMAZ-SOCCOL. Investigation of *Neospora sp.* and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Parana state, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.135, p.215-221, 2006.

MACDOUGALL, D.F. Immunoglobulin metabolism in the neonatal foal. **J. Reprod. Fert. Suppl**, v.23, p.739-742, 1975.

MARSH, A.E.; BARR, B.C.; MADIGAN, J.; LAKRITZ, J.; NORDHAUSEN, R.; CONRAD, P.A. Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.209, p.1907-1913, 1996.

MARSH, A.E.; BARR, B.C.; PACKHAM, A.E.; CONRAD, P.A. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **The Journal of Parasitology**, v.84, p.983-991, 1998.

MARSH, A.E.; HOWE, D.K.; WANG, G.; BARR, B.C.; CANNON, N.; CONRAD, P.A. Differentiation of *Neospora hughesi* from *Neospora caninum* based on their immunodominant surface antigen, SAG1 and SRS2. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.29, p.1575-1582, 1999.

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.; BJÖRKMAN, C.; ANDERSON-SPREECHER, 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.

McDOLE, M.G.; GAY, J.M. Seroprevalence of antibodies against *Neospora caninum* in diagnostic equine serum samples and their possible association with fetal loss. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.105, p.257-260, 2002.

McGUIRE, T.C., CRAWFORD, T.B. Passive immunity in the foal: measurement of immunoglobulin classes and specific antibody. **American Journal of Veterinary Research**, v.34, p. 1299-1303, 1973.

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**, Washington, D.C., v.8, n.4, p.811-816, 2001.

PACKHAM, A.E.; CONRAD, P.A.; WILSON, W.D.; JEANES, L.V.; SVERLOW, K.W.; GARDNER, I.A.; DAFT, B.M.; MARSH, A.E.; BLAGBURN, B.L.; FERRARO, G.L.; BARR, B.C. Qualitative evaluation of selective tests for detection of *Neospora hughesi* antibodies in serum and cerebrospinal fluid of experimentally infected horses. **Journal of Parasitology**, v.88(6), p.1239-1246, 2002.

PARÉ, J., THURMOND, M., HIETALA, S. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfwood mortality. **Canadian Journal Veterinary Research**, Ottawa, v.60, p.133-139, 1996.

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

PETERS, M.; LÜTKEFELS, E.; HECKEROTH, A.R.; SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence of *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dog and cattle. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.31, n.10, p.1144-1148, 2001.

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

PITEL, P.H.; LINDSAY, D.S.; CAURE, S.; ROMAND, S.; PRONOST, S.; GARGALA, G.; MITCHELL, S.M.; HARY, C.; THULLIEZ, P.; FORTIER, G.; BALLE, J.J. Reactivity against *Sarcocystis neurona* and *Neospora sp.* by serum antibodies in healthy French horses from two farms with previous equine protozoal myeloencephalitis-like cases. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.111, n.1, p. 1-7, 2003a.

PITEL, P. H.; ROMAND, S.; PRONOST, S.; FOUCHER, N.; GARGALA, G.; MAILLARD, K.; THULLIEZ, P.; COLLOBERT-LAUGIER, C.; TAINURIER, D.; FORTIER, G.; BALLE, J. J. Investigation of *Neospora sp.* antibodies in aborted mares from Normandy, France. **Veterinary Parasitology**, v.118, p.1-6, 2003b.

PRONOST, S.; PITEL, P.H.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; COLLOBERT, C.; FORTIER, G. *Neospora caninum*: first case in France in an aborted equine fetus. **Pratique Veterinaire Equine**, Norgent-Sur-Marne, v.31, p.111-114, 1999.

QUINN, H.E.; ELLIS, J.T.; SMITH, N.C. *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? **Trends in Parasitology**, v.18, p.391-394, 2002.

ROMERO, J.J.; PÉREZ, E.; FRANKENA, K. Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican 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.; AUDIGÉ, L.; GOTSTEIN, 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.

SCHARES, G.; PETERS, M.; WURM, R.; BÄRWALD, A.; CONRATHS, F.J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. **Veterinary Parasitology**, v.80, p.87-98, 1998.

SHIVAPRASAD, H.L.; ELY, R.; DUBEY, J.P. A *Neospora*-like protozoon found in an aborted bovine placenta. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.34, p.145-148, 1989.

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

TIZARD . In: _____. **Veterinary Immunology: An Introduction**. Philadelphia: Saunders, 2000. 482p.

THURMOND, M.C., HIETALA, S.K., BLANCHARD, P.C. Herd – based diagnosis of *Neospora caninum* induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and post natal transmission. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.9, p. 44-49, 1997.

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**, Oxford, v.28, p.1467-1472, 1998.

VALENTE, M.; UNANIAN, M.M.; SELAIVE-VILLAVROEL, A.B. Avaliação da transferência passiva da imunidade através da proteína total sanguínea, em potros da raça Árabe. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.55, 2003.

VARDELEON, D.; MARSH, A.E.; THORNE, J.G.; LOCH, W.; YOUNG, R.; JOHNSON, P.J. Prevalence of *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from various geographical locations. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.95, n.2-4, p.273-282, 2001.

VILLALOBOS, E.M.C.; UENO, T.E.H.; SOUZA, S.L.P.; CUNHA, E.M.S.; LARA, M.C.C.S.H.; GENNARI, S.M.; SOARES, R.M. Association between the presence of serum antibodies against *Neospora spp.* and fetal loss in equines. **Veterinary Parasitology**, 2006.

WALSH, C.P.; DUNCAN, R.B.; ZAJAC, A.M.; BLAGBURN, B.L.; LINDSAY, D.S. *Neospora hughesi*: Experimental infections in mice, gerbils and dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 92, n.2, p. 119-128, 2000.

WALSH, C.P.; VEMULAPALLI, R.; SRIRANGANATHAN, N.; ZAJAC, A.M.; JENKINS, M.C.; LINDSAY, D.S. Molecular comparison of the dense granule proteins GRA6 e GRA7 of *Neospora hughesi* and *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**. v.31, p.253-258, 2001.

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

WILLIAMS, D.J.; GUY, C.S.; SMITH, R.F.; GUY, F.; McGARRY, J.W.; MCKAY, J.S.; TREES, A.J. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, v.33, p.1059-1065, 2003.

WREN, G. Abortion in cattle: BVDV and *Neospora*. **Bovine Veterinarian**, Shawnee Mission, p.12-17, 1999.

YOUN, H.J.; LAKRITZ, J.; KIM, D.Y.; ROTTINGHAUS, G.E.; MARSH, A.E. Anti-protozoal efficacy of medicinal herb extracts against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, n.116, p.7-14, 2003.

10 ANEXOS

FIGURA 9: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* da Égua 1.

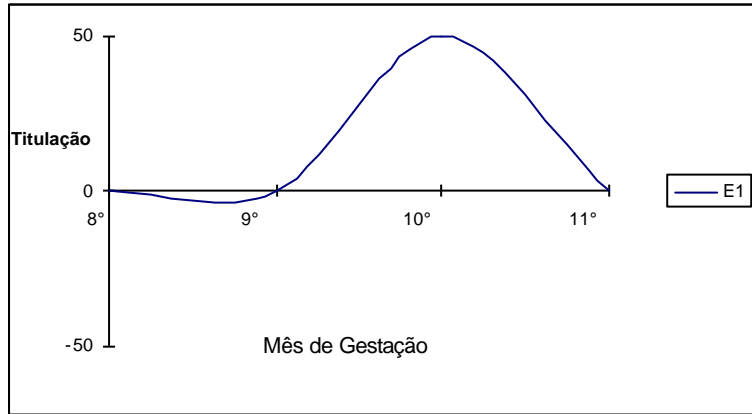
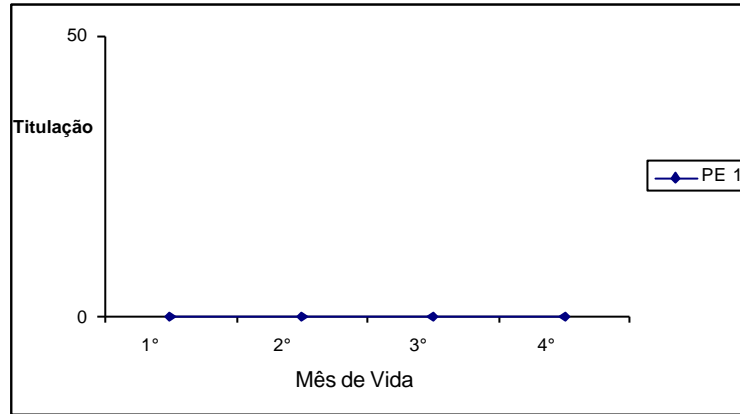


FIGURA 10: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* do Potro filho da Égua 1.



OBS: Égua sem histórico de perdas reprodutivas.

FIGURA 11: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* da Égua 2.

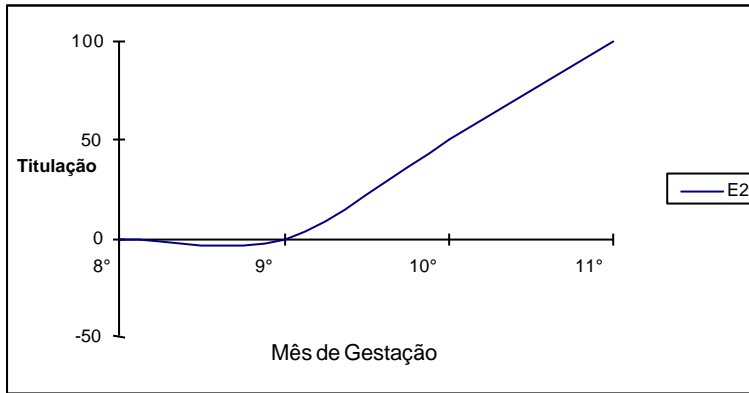
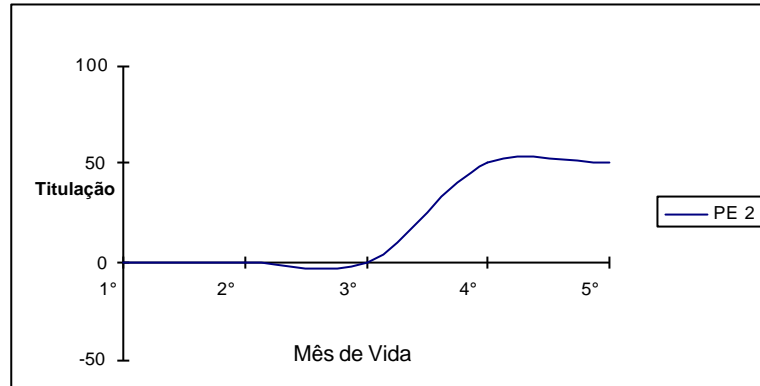
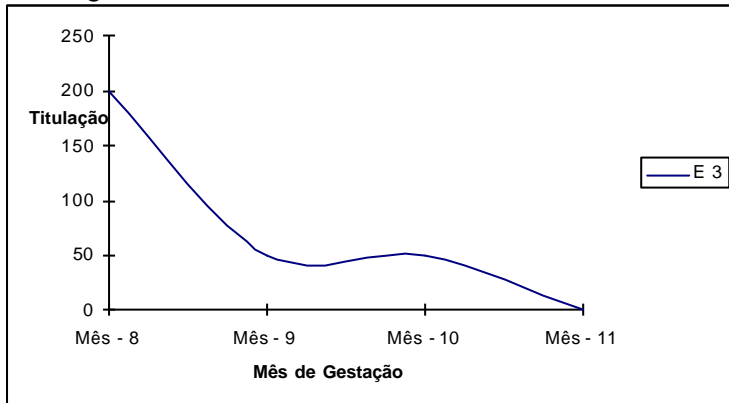


FIGURA 12: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* do Potro filho da Égua 2.



OBS: Égua sem histórico de perdas reprodutivas.

FIGURA 13: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* da Égua 3.



OBS: Égua sem histórico de perdas reprodutivas.

FIGURA 14: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* do Potro filho da Égua 3.

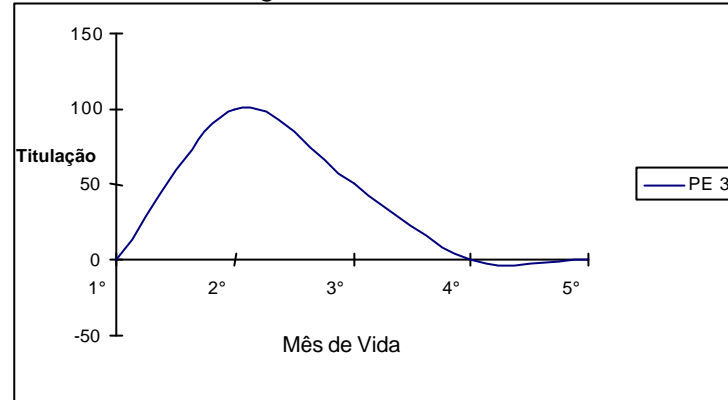


FIGURA 15: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* da Égua 4.

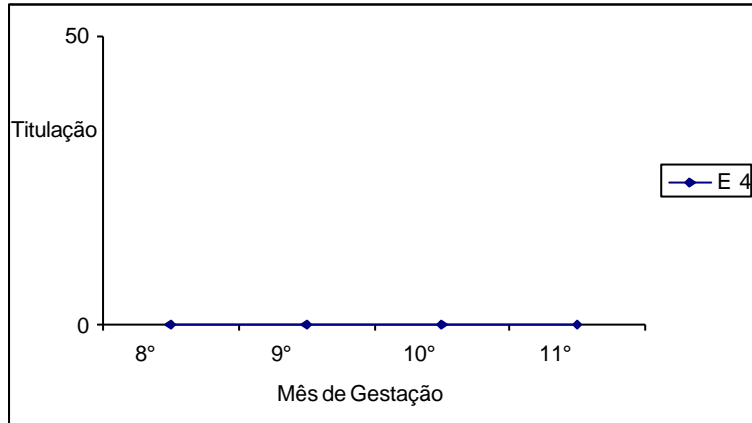
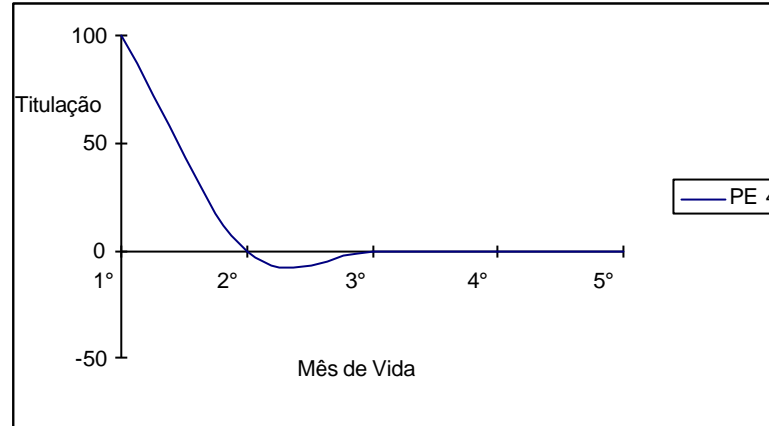


FIGURA 16: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* do Potro filho da égua 4.



OBS: Égua sem histórico de perdas reprodutivas.

FIGURA 17: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* da Égua 5.

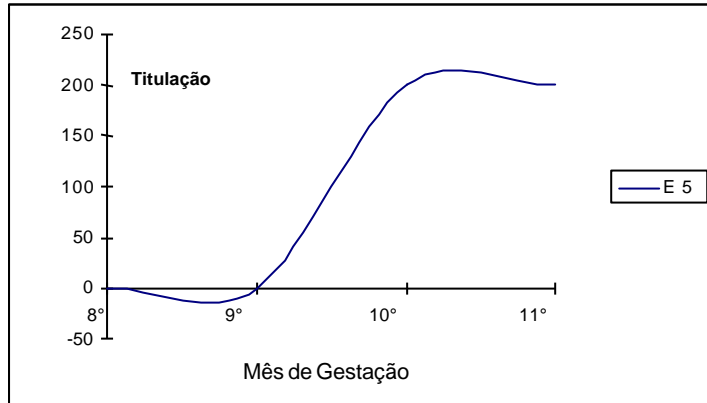
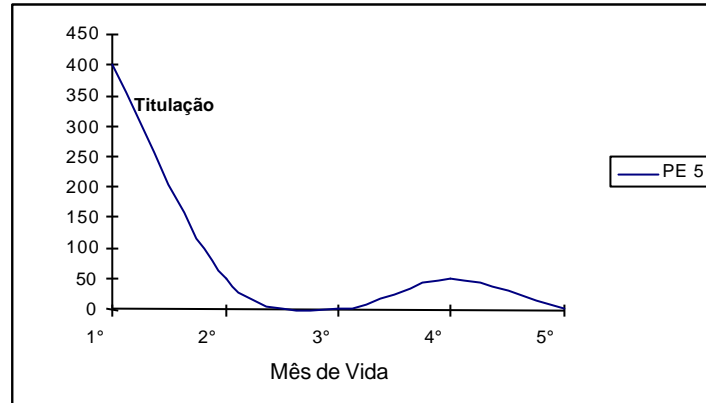


FIGURA 18: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* do Potro filho da Égua 5.



OBS: Égua sem histórico de perdas reprodutivas.

OBS:

FIGURA 19: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* da Égua 6.

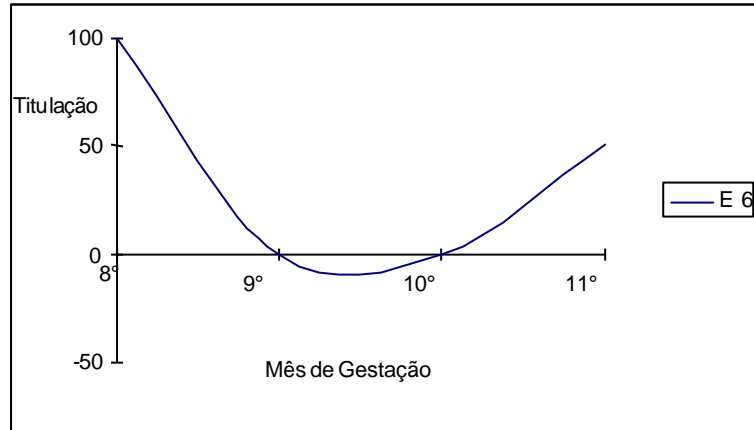
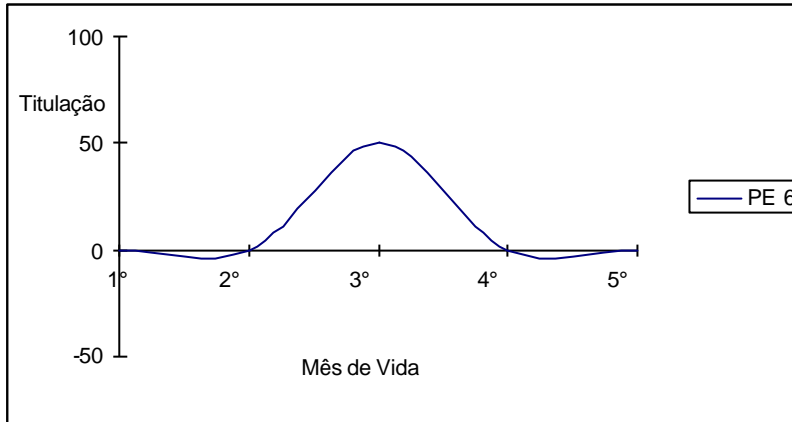
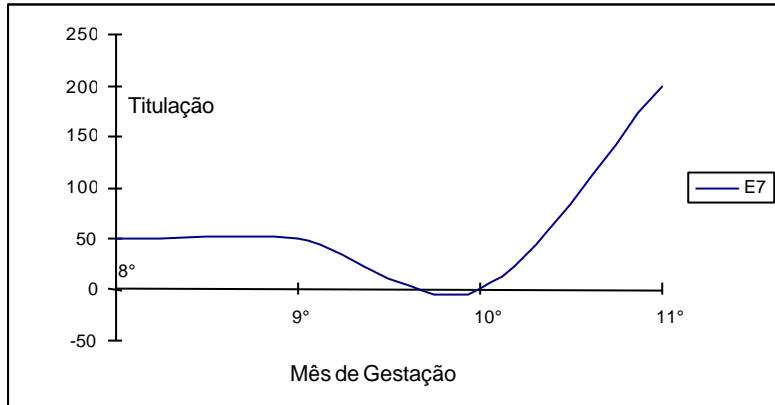


FIGURA 20: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* do Potro filho da Égua 6.



OBS: Égua sem histórico de perdas reprodutivas.

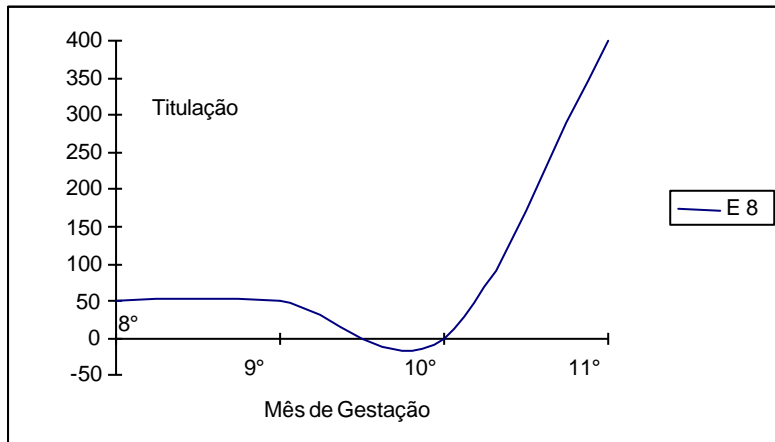
FIGURA 21: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* da Égua 7.



OBS: Égua sem histórico de perdas reprodutivas.

POTRO FILHO DA ÉGUA 7 FOI A ÓBITO.

FIGURA 22: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* da Égua 8.



OBS: Égua sem histórico de perdas reprodutivas.

POTROFILHO DA ÉGUA 8 FOI A ÓBITO.

FIGURA 23: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* da Égua 9.

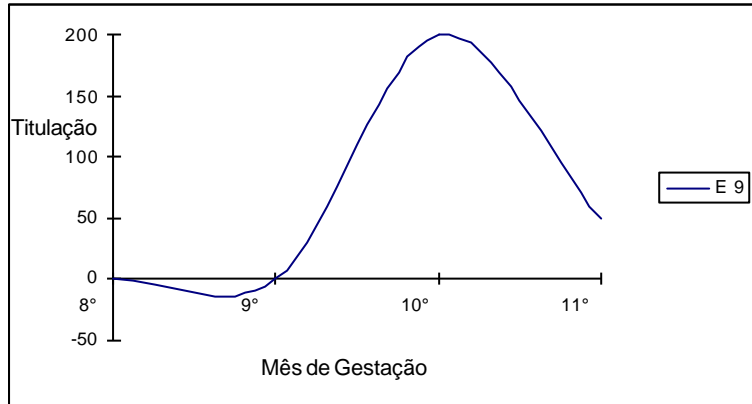
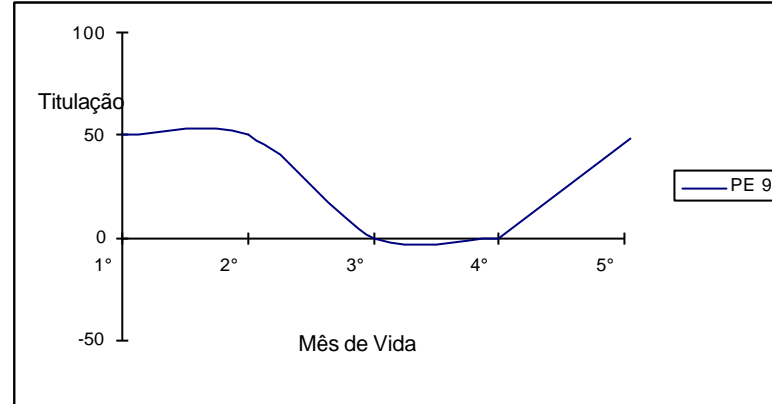


FIGURA 24: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* do Potro filho da Égua 9.



OBS: Égua com histórico de perdas reprodutivas.

FIGURA 25: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp* da Égua 10.

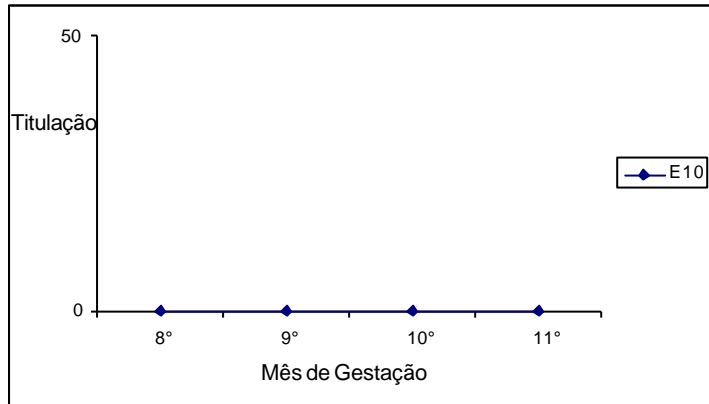
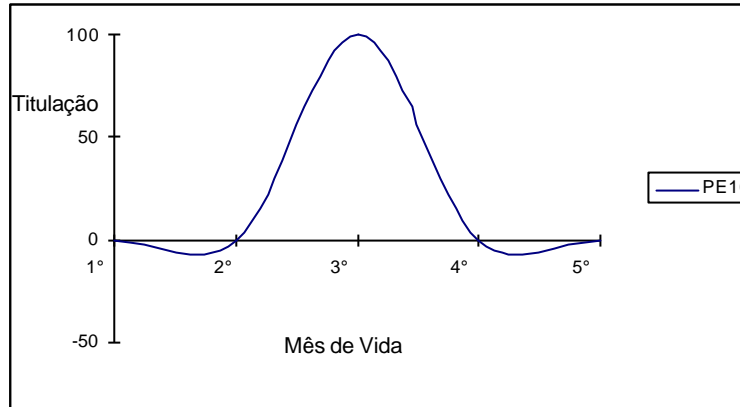


FIGURA 26: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp* do Potro filho da Égua 10.



OBS: Égua com histórico de perdas reprodutivas.

FIGURA 27: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* da Égua 11.

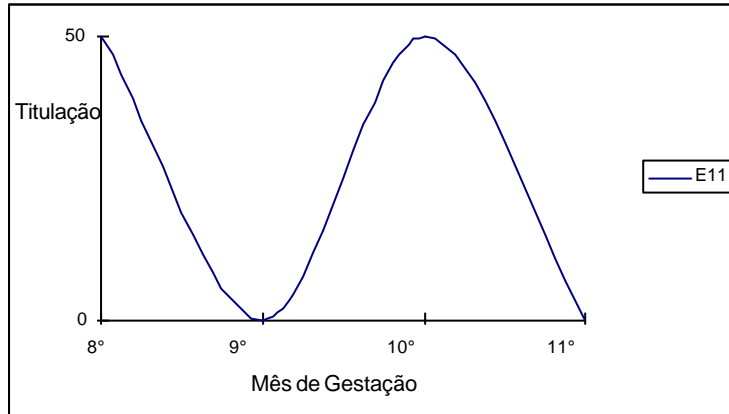
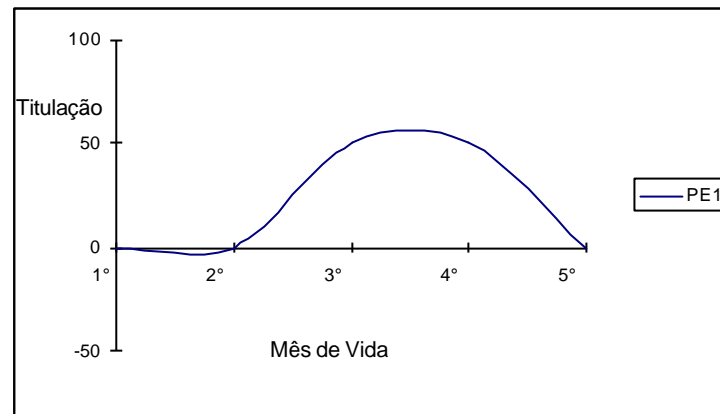


FIGURA 28: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* do Potro filho da égua 11.



OBS: Égua com histórico de perdas reprodutivas.

FIGURA 29: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* da Égua 12.

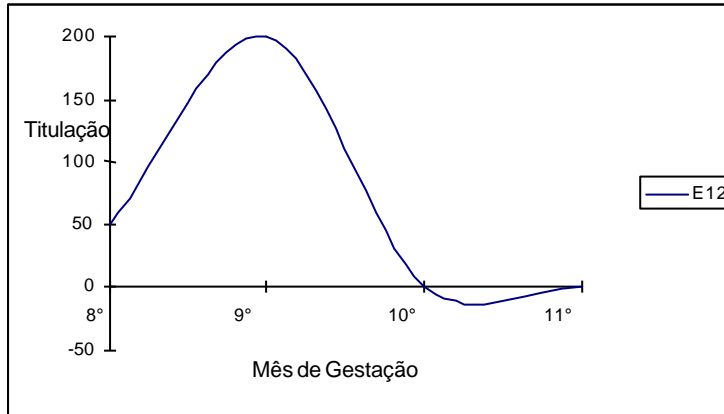
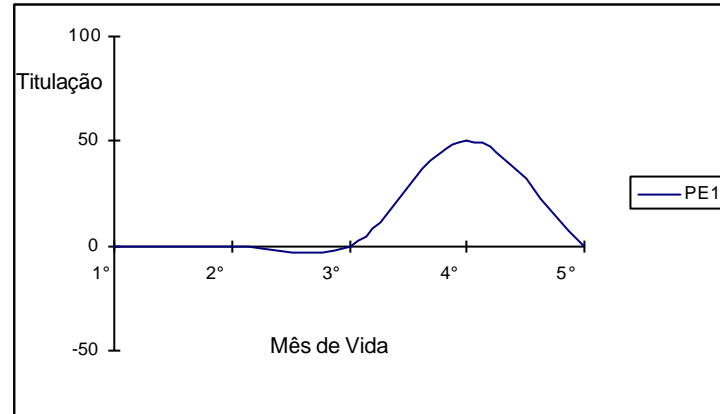
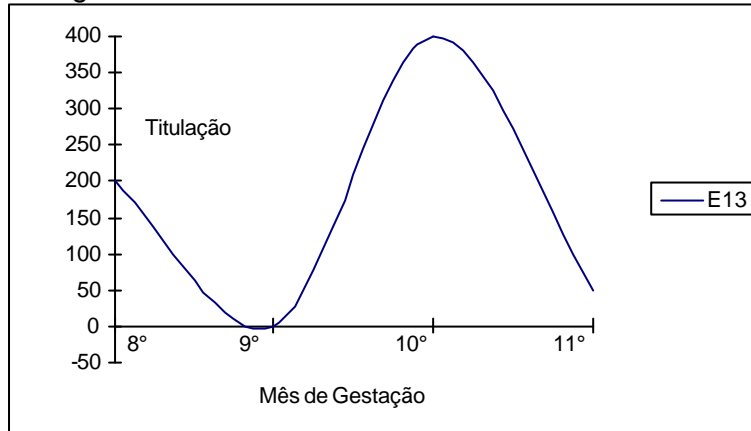


FIGURA 30: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* do Potro filho da égua 12.



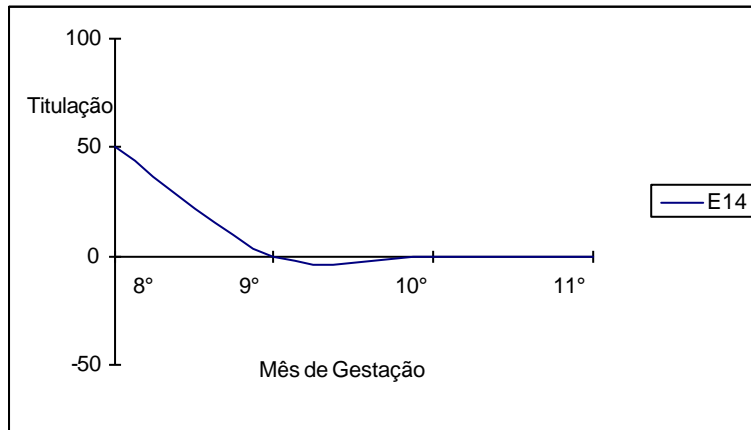
OBS: Égua com histórico de perdas reprodutivas.

FIGURA 31: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* da Égua 13.



OBS: Égua com histórico de perdas reprodutivas.

FIGURA 32: Resultados sorológicos anti-*Neospora sp.* da Égua 14.



OBS: Égua com histórico de perdas reprodutivas.

POTRO FILHO DA ÉGUA 13 FOI A ÓBITO.

ÉGUA ABORTOU.

