

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NICOLLE FRIDLUND PLUGGE

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE NEOSPOROSE EM
POPULAÇÕES DE CÃES SADIOS E COM SINAIS NEUROLÓGICOS
DA MICRORREGIÃO DE CURITIBA**

CURITIBA

2008

NICOLLE FRIDLUND PLUGGE

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE NEOSPOROSE EM POPULAÇÕES
DE CÃES SADIOS E COM SINAIS NEUROLÓGICOS DA
MICRORREGIÃO DE CURITIBA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração Patologia Animal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

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

CURITIBA

2008

TERMO DE APROVAÇÃO

Nome: NICOLLE FRIDLUND PLUGGE

Título: DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE NEOSPOROSE EM POPULAÇÕES DE
CÃES SADIOS E COM SINAIS NEUROLÓGICOS DA MICRORREGIÃO DE
CURITIBA

Dissertação apresentada e aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Professora Doutora Rosangela Locatelli Dittrich
Orientadora e Presidente – Departamento de Medicina Veterinária, UFPR.

Doutor Renato Andreotti
Primeiro Examinador – Embrapa Gado de Corte – Campo Grande/MS

Professor Doutor Fabiano Montiani Ferreira
Segundo Examinador – Departamento de Medicina Veterinária, UFPR.

Professor Geraldo Camilo Alberton
Membro suplente – Departamento de Medicina Veterinária, UFPR.

Curitiba, 22 de fevereiro de 2008

*Ao meu filho Felipe, pelos momentos em que estive
ausente.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo conforto em todas as horas.

Ao meu marido Fábio, por seu companheirismo, amor e admiração.

Ao meu pai, por ter me ensinado os valores nobres da vida e por me inspirar a ser cada dia melhor.

À minha mãe, pela luta diária.

Aos meus sogros, pelo apoio incondicional em todos os momentos.

À professora Rosângela, por todo ensinamento, dedicação, ajuda, confiança e compreensão que me ofereceu ao longo destes quatro anos de trabalho. Minha eterna amizade e admiração.

À Universidade Federal do Paraná, instituição de grande valor que me deu a oportunidade de aprendizado e de conquistar grande parte dos meus sonhos. Meu motivo de orgulho.

Ao Hospital Veterinário da UFPR, pelas portas sempre abertas.

Ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, que desde a graduação me possibilitou crescimento profissional. Muita saudade.

Aos Centros de Controle de Zoonoses de Pinhais e São José dos Pinhais, à colega de Mestrado Michele Salmon Frehse, pela disponibilidade de amostras para realização desta pesquisa.

À ONG Associação do Amigo Animal, que realiza um belíssimo trabalho com animais abandonados e merece todo o nosso reconhecimento.

Ao Centro Diagnóstico Marcus Enrietti, em especial às Médicas Veterinárias Rosária, Mara e Cidinha, pelos ensinamentos e colaboração no preparo das lâminas de RIFI.

À Clínicão, Clinivet e demais Clínicas Veterinárias, pelo encaminhamento de amostras e pelo empenho em salvar vidas.

Ao professor Fabiano Montiani Ferreira, pelas idéias, elogios, críticas e pela contribuição científica.

Às amigas, Solange A. Marconcin e Palloma Rose pela amizade e a ajuda todos estes anos.

À Marta, pelo seu exemplo de mulher.

À Lia, Louise, Adriana e Olair, colegas de laboratório e amigos em todas as horas.

Aos animais, seres inocentes que nos mostram que é possível amar incondicionalmente.

“O segredo é não correr atrás das borboletas... é cuidar do jardim para que elas venham até você”.

Mário Quintana

RESUMO

A neosporose emergiu na última década como uma séria doença, acometendo várias espécies animais, em especial bovinos e cães. O protozoário *Neospora caninum* é considerado hoje como importante causa de aborto em bovinos de muitos países e pode causar graves alterações neuromusculares em cães, levando o animal a óbito. Relatos de casos de neosporose canina e cães soropositivos têm sido descritos no mundo inteiro, e associações entre prováveis fatores de risco para a infecção são objetos de inúmeras pesquisas. O presente estudo teve como objetivo determinar a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em cães saudáveis, domiciliados e errantes, das regiões urbana e periurbana de Curitiba e de áreas rurais do Estado do Paraná, para investigar a epidemiologia do parasita nas diferentes populações caninas analisadas. Devido à inespecificidade e similaridade dos sinais neurológicos observados na neosporose e na toxoplasmose, outro objetivo do trabalho foi verificar a presença de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em cães com sinais neurológicos, atendidos em hospitais e clínicas veterinárias de Curitiba, e oriundos de regiões metropolitanas da cidade, para se determinar a real participação destes protozoários na etiologia das doenças neurológicas caninas. Os resultados obtidos de cães sadios confirmaram a presença de *N. caninum* nas populações estudadas (18,17%) e demonstraram a importância da neosporose subclínica nas regiões analisadas, assim como a associação de risco entre ambiente rural e a presença de anticorpos anti-*N. caninum* ($R_p=2,0$). Com os resultados sorológicos obtidos de cães com sinais neurológicos, concluiu-se que a infecção pelos protozoários *N. caninum* (11,56%) e *T. gondii* (21,08%) esteve presente nestes animais e que a sorologia para ambos os parasitas deve ser rotineiramente solicitada em casos de cães com alterações neurológicas, mesmo quando se tem uma forte suspeita de cinomose ou outra doença do sistema nervoso central, devido à similaridade dos sinais clínicos observados nesses casos e a possibilidade de co-infecção nos animais.

PALAVRAS-CHAVE: *Neospora caninum*, neosporose, cães, RIFI, toxoplasmose, sinais neurológicos

ABSTRACT

Neosporosis has emerged in the last decade as a serious disease, affecting various animal species, especially cattle and dogs. The protozoan *Neospora caninum* is nowadays considered the main cause of abortion in cattle in many countries and may cause severe neuromuscular alterations in dogs, leading to the animal's death. Seropositive dogs and cases of canine neosporosis have been reported in many countries and the relation between probable risk factors is the object of many studies. The aim of the present study was to determine the presence of anti-*N. caninum* antibodies in healthy stray and domiciled dogs from the urban area and outskirts of Curitiba, and Paraná State's rural areas, to investigate the parasite's epidemiology in the different dog populations in the area. Due to the unspecificity and similarity of the neurological signs observed in neosporosis and toxoplasmosis, another aim of this work was to verify the presence of anti-*N. caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dogs with neurological signs, from hospitals and veterinary clinics of Curitiba and its metropolitan area, in order to determine the real role of these protozoa in the etiology of canine neurological diseases. The results confirmed the presence of *N. caninum* (18,17%) in the studied dog populations and showed the importance of subclinical neosporosis in healthy dogs that carry the protozoan in this area, as well as the risk association between rural environment and the presence of anti-*N. caninum* antibodies (Rp=2,0). With the serologic results obtained from dogs with neurological signs, it was concluded that the infection by *N. caninum* (11,56%) e *T. gondii* (21,08%) protozoa is present in these animals and the serology for both parasites should be routinely run in cases of dogs with neurological alterations, even when there is a strong suspicion of cinomosis or another central nervous system disease, due to the similarity of the clinical signs observed in these cases and the possibility of co-infection in these animals.

KEYWORDS: *Neospora caninum*, dogs, IFAT, toxoplasmosis, neurological signs

LISTA FIGURAS

FIGURA 1 –	CICLO BIOLÓGICO DE <i>N. caninum</i>	23
FIGURA 2 –	PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>Neospora caninum</i> E ANTI- <i>Toxoplasma gondii</i> EM SOROS DE CÃES COM SINAIS NEUROLÓGICOS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL, CONFORME LOCAL DE COLETA DAS AMOSTRAS.....	94
FIGURA 3 –	PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>N. caninum</i> E ANTI- <i>T. gondii</i> EM SOROS DE CÃES COM SINAIS NEUROLÓGICOS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL, CONFORME TIPO DE CRIAÇÃO.....	94
FIGURA 4 –	PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>N. caninum</i> EM CÃES COM SINAIS NEUROLÓGICOS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA, CONFORME A TITULAÇÃO FINAL, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.....	95
FIGURA 5 –	PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>T. gondii</i> EM CÃES COM SINAIS NEUROLÓGICOS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA, CONFORME A TITULAÇÃO FINAL, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.....	95
FIGURA 6 –	PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>N. caninum</i> e ANTI- <i>T. gondii</i> EM CÃES COM SINAIS NEUROLÓGICOS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA, CONFORME A TITULAÇÃO FINAL, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.....	96
FIGURA 7 –	COMPARAÇÃO ENTRE AS PREVALÊNCIAS DE ANTICORPOS PARA <i>N. caninum</i> e <i>T. gondii</i> EM CÃES COM SINAIS NEUROLÓGICOS CONFORME A TITULAÇÃO FINAL, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.....	96
FIGURA 8 –	PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>N. caninum</i> EM CÃES SADIOS URBANOS E PERIURBANOS DE CURITIBA E DE ÁREA RURAL DO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL CONFORME A REGIÃO.....	97
FIGURA 9 –	PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>N. caninum</i> EM CÃES SADIOS ERRANTES E DOMICILIADOS DA REGIÃO URBANA E PERIURBANA DE CURITIBA, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL, CONFORME O TIPO DE CRIAÇÃO.....	97
FIGURA 10 -	CÃO SOROPOSITIVO PARA <i>N. caninum</i> . TAQUIZOÍTAS OBSERVADOS EM LÂMINA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA, AUMENTO DE 400x.....	100

FIGURA 11 - CÃO SOROPOSITIVO PARA <i>N. caninum</i> . TAQUIZOÍTAS OBSERVADOS EM LÂMINA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA, AUMENTO DE 400x.....	100
FIGURA 12 - EFEITO CITOPÁTICO CAUSADO POR <i>N. caninum</i> EM CULTIVO DE CÉLULAS VERO, AUMENTO DE 200x.....	101
FIGURA 13 - <i>Neospora caninum</i> EM MULTIPLICAÇÃO INTRACELULAR E ÁREAS COM EFEITO CITOPÁTICO CAUSADO POR <i>N. caninum</i> EM CULTIVO DE CÉLULAS VERO, AUMENTO DE 400x.....	101
FIGURA 14 - TAQUIZOÍTAS DE <i>N. caninum</i> EM CULTIVO CELULAR, AUMENTO DE 400X.....	102
FIGURA 15 - TAQUIZOÍTAS DE <i>N. caninum</i> EM CULTIVO CELULAR APÓS DESTRUIÇÃO DO TAPETE DE CÉLULAS VERO, AUMENTO DE 200X.....	102
FIGURA 16 - MAPA DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA COLETA DAS AMOSTRAS DE CÃES URBANOS E PERIURBANOS.....	103
FIGURA 17 - MAPA DE CASTRO E PALMEIRA (COLÔNIA WITTMARSUM) COLETA DAS AMOSTRAS DE CÃES RURAIS.....	104

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	FORMAS DE APRESENTAÇÕES DOS SINAIS NEUROLÓGICOS NA NEOSPOROSE CANINA.....	27
TABELA 2 –	APRESENTAÇÕES NÃO NEUROLÓGICAS DE NEOSPOROSE EM CÃES.....	27
TABELA 3 –	DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE NEOSPOROSE EM CÃES....	35
TABELA 4 -	TERAPIAS UTILIZADAS NA NEOSPOROSE CANINA.....	36
TABELA 5 –	PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>Neospora caninum</i> E ANTI- <i>Toxoplasma gondii</i> DETECTADOS PELA REAÇÃO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA (RIFI \geq 50) EM SOROS DE CÃES COM SINAIS NEUROLÓGICOS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.....	62
TABELA 6 –	PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>Neospora caninum</i> E ANTI- <i>Toxoplasma gondii</i> DETECTADOS PELA REAÇÃO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA EM SOROS DE CÃES COM SINAIS NEUROLÓGICOS ERRANTES E DOMICILIADOS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.....	63
TABELA 7 –	SOROPREVALÊNCIAS DE NEOSPOROSE E TOXOPLASMOSE EM CÃES COM SINAIS NEUROLÓGICOS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA, CONFORME TITULAÇÃO, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.....	63
TABELA 8 –	SINAIS CLÍNICOS OBSERVADOS EM CÃES SOROPOSITIVOS PARA <i>Neospora caninum</i> NAS DIFERENTES TITULAÇÕES, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.....	64
TABELA 9 –	SINAIS CLÍNICOS OBSERVADOS EM CÃES SOROPOSITIVOS PARA <i>Toxoplasma gondii</i> NAS DIFERENTES TITULAÇÕES, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.....	64
TABLE 10 –	SEROPREVALENCE FOR <i>N. caninum</i> IN SERA OF DOGS FROM URBAN AND PERIURBAN AREAS IN THE CURITIBA COUNTY, AND FROM RURAL AREAS IN PARANÁ STATE, SOUTHERN BRAZIL.....	84
TABLE 11 –	SEROPREVALENCE OF ANTI- <i>Neospora caninum</i> ANTIBODIES IN DOMICILED AND STRAY DOGS FROM URBAN AND PERIURBAN AREAS OF CURITIBA, PARANÁ STATE, BRAZIL..	84

LISTA DE SIGLAS

HI	–	Hospedeiro Intermediário
HD	–	Hospedeiro Definitivo
IgG	–	Imunoglobulina G
RIFI	–	Reação de Imunofluorescência Indireta
IHC	–	Imunohistoquímica
PCR	–	Reação da Polimerase em Cadeia
CK	–	Creatinoquinase
AST	–	Aspartato Amino Transferase
CSF	–	Líquido Cefalorraquidiano
DNA	–	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	–	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
MEG	–	Meningoencefalopatia Granulomatosa
SNC	–	Sistema Nervoso Central
VO	–	Via Oral
SC	–	Subcutânea
ALT	–	Alanino Amino Transferase
FA	–	Fosfatase Alcalina
HV	–	Hospital Veterinário
UFPR	–	Universidade Federal do Paraná
CCZ	–	Centro de Controle de Zoonoses
CNPq	–	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
PR	–	Paraná
ONG	–	Organização Não Governamental
IFAT	–	Indirect Fluorescent Antibody Test
Rpm	–	Rotações por minuto
PBS	–	Solução Tampão Fosfatada
Rp	–	Razão das Prevalências
SP	–	São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 CLASSIFICAÇÃO DE <i>Neospora sp.</i>	18
3.2 FORMAS DO CICLO DE VIDA DE <i>Neospora caninum</i>	18
3.3 MECANISMOS DE INFECÇÃO DE <i>Neospora caninum</i>	19
3.3.1 Transmissão horizontal.....	20
3.3.2 Transmissão vertical ou transplacentária.....	21
3.3.3 Transmissão lactogênica.....	22
3.3.4 Ciclo biológico de <i>N. caninum</i>	22
3.4 SOROPREVALÊNCIA DE <i>Neospora caninum</i> EM CÃES.....	24
3.5 SINAIS CLÍNICOS DE NEOSPOROSE EM CÃES.....	25
3.6 DIAGNÓSTICO DE NEOSPOROSE EM CÃES.....	28
3.6.1 Diagnóstico sorológico de neosporose pela RIFI (reação de imunofluorescência indireta) e ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)....	30
3.6.2 Diagnóstico parasitológico de neosporose.....	32
3.6.2.1 Exame de fezes.....	32
3.6.2.2 Exame histopatológico.....	33
3.6.2.3 Exame imunohistoquímico.....	34
3.6.2.4 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).....	34
3.6.3 Diagnóstico diferencial.....	35
3.7 TRATAMENTO DA NEOSPOROSE CANINA.....	35
3.8 TOXOPLASMOSE EM CÃES.....	37
3.8.1 Diagnóstico de toxoplasmose em cães.....	39
REFERÊNCIAS	41

CAPÍTULO I – PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-<i>Neospora caninum</i> E ANTI-<i>Toxoplasma gondii</i> EM CÃES COM SINAIS NEUROLÓGICOS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL..	57
RESUMO.....	57
ABSTRACT.....	58
1 INTRODUÇÃO.....	59
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	60
2.1 ANIMAIS.....	60
2.2 COLETA DE SANGUE E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	60
2.3 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI).....	61
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
3 RESULTADOS.....	61
4 DISCUSSÃO.....	65
5 CONCLUSÃO.....	70
6 AGRADECIMENTOS.....	70
REFERÊNCIAS.....	71
CAPÍTULO II – PREVALENCE OF <i>Neospora caninum</i> ANTIBODIES IN STRAY AND DOMICILED DOGS FROM URBAN, PERIURBAN AND RURAL AREAS FROM PARANÁ STATE, SOUTHERN BRAZIL.....	80
ABSTRACT.....	80
RESUMO.....	80
1 INTRODUCTION.....	81
2 MATERIAL AND METHODS.....	82
2.1 STUDY AREA AND SAMPLING.....	82
2.2 BLOOD COLLECTION.....	82
2.3 SEROLOGY FOR <i>N. caninum</i>	83
2.4 STATISTICAL ANALYSIS.....	83
3 RESULTS.....	83
4 DISCUSSION.....	85
5 ACKNOWLEDGEMENTS.....	87
REFERÊNCIAS.....	88
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
PERSPECTIVAS.....	92
ANEXOS.....	94

1 INTRODUÇÃO GERAL

Desde a primeira observação de um novo parasita em cães na Noruega (BJERKAS *et al.*, 1984) e a descrição de um novo gênero e espécie, *Neospora caninum* (DUBEY *et al.*, 1988), a neosporose emergiu como uma séria doença, acometendo, em especial, bovinos e cães (GENNARI, 2004). Na última década despontou como principal doença reprodutiva de bovinos do mundo inteiro e atualmente é considerada como uma importante causa de aborto em rebanhos leiteiros e de corte (TREES *et al.*, 1999; ANDERSON *et al.*, 2000; DUBEY, 2003; DUBEY *et al.*, 2006; GAY, 2006).

Neospora caninum é um parasita intracelular obrigatório que permanece nos rebanhos bovinos durante várias gerações como uma infecção crônica, sendo transmitido por via transplacentária ao feto (SCHARES *et al.*, 1998). A introdução do protozoário no rebanho foi explicada quando McALLISTER *et al.* (1998) descreveram a presença de oocistos não esporulados nas fezes de cães que ingeriram cistos de *N. caninum*. Esta descoberta permitiu identificar o cão como hospedeiro definitivo do parasita, além do seu papel como hospedeiro intermediário, pela presença das formas de taquizoítas e cistos teciduais. Desde 2004, após a descoberta de que os coiotes também são hospedeiros definitivos de *N. caninum* (GONDIM *et al.*, 2004), vários estudos têm demonstrado a existência de um ciclo silvestre da neosporose que precisa ser investigado (YAI *et al.*, 2003; CAÑON-FRANCO *et al.*, 2004; GENNARI, 2004; VITALIANO *et al.*, 2004; ROSYPAL e LINDSAY, 2005).

Cães soropositivos para *N. caninum* já foram identificados em vários países, inclusive no Brasil (CABRAL *et al.*, 1999; MEIRA SANTOS *et al.*, 1999; BELO *et al.*, 1999, GENNARI *et al.*, 2002; CAÑON-FRANCO *et al.*, 2003; AZEVEDO *et al.*, 2005, JESUS *et al.*, 2006). Resultados sorológicos vêm demonstrando que cães oriundos de propriedades rurais apresentam maior soroprevalência quando comparados com cães de regiões urbanas e periurbanas (SÁNCHEZ *et al.*, 2003; FERNANDES *et al.*, 2004). A forte associação epidemiológica entre a presença de cães soropositivos e a ocorrência de neosporose bovina indica que a transmissão via oocistos contribui para manter a infecção nos rebanhos (Mc ALLISTER, 1999; SÁNCHEZ *et al.*, 2003), contudo, o papel do cão na transmissão e manutenção da doença precisa ser mais

estudado, devido à escassez de informações sobre a frequência e intensidade de eliminação de oocistos no ambiente.

A neosporose clínica em cães já foi relatada em vários países, incluindo Estados Unidos, Canadá, Japão, Costa Rica, Uruguai, Austrália, Argentina, Nova Zelândia e Europa. Os casos mais graves de neosporose canina ocorreram em filhotes com infecção congênita (DUBEY e LINDSAY, 1996), porém sabe-se que animais de qualquer idade podem desenvolver clinicamente a doença. Os principais sinais observados são alterações neuromusculares, que podem levar ao óbito.

No Brasil, o primeiro isolamento de *N. caninum* de cão foi realizado por GONDIM *et al.* (2001), de um animal que possuía sinais indicativos da doença. No Paraná, o protozoário foi isolado de fetos bovinos e de bezerros de rebanhos leiteiros com históricos de abortos endêmicos (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2004).

Hoje, o que se observa é que a neosporose é pouco diagnosticada nas clínicas veterinárias, devido à similaridade com outras doenças neurológicas, a presença de infecções subclínicas nos cães e a falta de informações sobre a prevalência e a doença nos centros urbanos.

Considerando-se a importância da inclusão da neosporose no diagnóstico diferencial das doenças neurológicas em animais de companhia, este estudo determinou a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em cães sadios domiciliados e errantes, oriundos das regiões urbana e periurbana de Curitiba e de áreas rurais do Estado do Paraná, com a finalidade de estudar a epidemiologia do parasita nas diferentes populações caninas analisadas. Devido à inespecificidade e similaridade das alterações neurológicas observadas na neosporose e na toxoplasmose, outro objetivo do trabalho foi verificar a presença de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em cães com sinais neurológicos atendidos em hospitais e clínicas veterinárias de Curitiba e de regiões metropolitanas. Com os resultados pretende-se alertar os clínicos sobre a possível existência do protozoário nas regiões estudadas e a importância da inclusão da neosporose e toxoplasmose no diagnóstico diferencial das doenças neurológicas em cães.

Este trabalho está dividido em duas partes. A primeira parte constitui-se de revisão bibliográfica da neosporose canina, com alguns aspectos importantes de toxoplasmose, pela similaridade dos sinais clínicos observados nas duas infecções. A segunda parte está formada por dois artigos científicos apresentados em forma de capítulos, que foram escritos baseados nos resultados obtidos com o experimento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em cães sadios domiciliados e errantes das regiões urbana e periurbana de Curitiba e de áreas rurais do Estado do Paraná, estabelecendo-se a associação entre os prováveis fatores de risco para a infecção; e realizar o diagnóstico sorológico para *N. caninum* e *T. gondii* em cães que apresentam sinais neurológicos, para estabelecer a importância da inclusão da neosporose e da toxoplasmose no diagnóstico diferencial das doenças neurológicas caninas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 cultivar os protozoários *N. caninum* e *T. gondii* *in vivo* e *in vitro* para a confecção de lâminas de imunofluorescência indireta;

2.2.2 determinar a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em cães sadios domiciliados e errantes, urbanos e periurbanos de Curitiba e região metropolitana e de áreas rurais do Estado do Paraná, pela técnica de imunofluorescência indireta;

2.2.3 associar a presença de neosporose nas três populações caninas (urbana, periurbana e rural), de dois diferentes tipos de criação (domiciliado e errante) com fatores de risco potenciais;

2.2.4 realizar o diagnóstico sorológico de neosporose e de toxoplasmose em cães que apresentam sinais neurológicos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CLASSIFICAÇÃO DE *Neospora* sp.

O protozoário *Neospora* pertence ao phylum Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Eucoccidiida e família Sarcocystidae (DUBEY *et al.*, 1988). No gênero *Neospora* duas espécies são conhecidas, *Neospora caninum* (DUBEY *et al.*, 1988a), isolado de cérebro de cão, e *Neospora hughesi* (MARSH *et al.*, 1998; DUBEY *et al.*, 2001), isolado de cérebro e medula espinhal de eqüinos. *Neospora caninum* também infecta bovinos, ovinos, caprinos e cervos, causando encefalite e mortalidade neonatal (DUBEY e LINDSAY, 1996; DUBEY, 1999).

3.2 FORMAS DO CICLO DE VIDA DE *Neospora caninum*

Neospora caninum possui três formas de ciclo de vida já identificadas; os taquizoítas, os cistos com bradizoítas e os oocistos.

Os taquizoítas são ovóides, redondos ou em forma de meia lua, com núcleo na posição central ou terminal, medindo 3 a 7 μm x 1 a 5 μm , dependendo do estágio de crescimento e divisão, e do plano de corte dos tecidos (DUBEY e LINDSAY, 1996; DUBEY *et al.*, 2002). Os taquizoítas são considerados os organismos proliferativos, pois se multiplicam rapidamente por endodiogenia causando morte celular e disseminação da infecção. Sem uma resposta imunológica efetiva do hospedeiro, os taquizoítas podem continuar a se multiplicar, causando progressivamente destruição celular e levando o animal à morte. Com o início de uma resposta imune do hospedeiro, os taquizoítas diferenciam-se em bradizoítas e estabelecem um cisto tecidual persistente (BUXTON *et al.*, 2002).

Os bradizoítas são considerados os organismos de multiplicação lenta ou de latência e estão em grande número dentro de cistos teciduais. Os cistos de *N. caninum* geralmente são redondos ou ovais, podendo medir até 107 μm . Os bradizoítas são delgados, medem 6-8 μm x 1-2 μm , núcleo terminal a subterminal, e

com as mesmas organelas encontradas nos taquizoítas, mas com menor número de rotrias e mais grânulos de amilopectina (DUBEY e LINDSAY, 1996).

Enquanto os taquizoítas são encontrados em vários tipos de células e tecidos do hospedeiro intermediário, os cistos tissulares de *N. caninum* somente foram descritos no sistema nervoso central e periférico e na retina dos hospedeiros intermediários, com uma única exceção de um cisto solitário no músculo ocular de um potro (DUBEY e LINDSAY, 1996; LINDSAY *et al.*, 1996). DUBEY, KOESTNER E PIPER (1990) relataram a ocorrência de cistos de *N. caninum* na retina de quatro cães que adquiriram a doença via congênita. DUBEY *et al.* (1998) descreveram cistos tissulares de *N. caninum* em cérebro e lesões multifocais de miosite não supurativa com taquizoítas associados em sistema nervoso, coração e musculatura esquelética de cães com neosporose.

A última forma identificada de *N. caninum* foram os oocistos, após serem observados nas fezes de cães que ingeriram cérebros de camundongo com cistos de *N. caninum* (Mc ALLISTER *et al.*, 1998), e nas fezes de coiotes que ingeriram tecidos de bezerros infectados com o protozoário (GONDIM *et al.*, 2004). Os oocistos são eliminados nas fezes na forma não esporulada, medindo 10 a 11 µm de diâmetro, são esféricos a subesféricos, contém um esporonte central e não são infectivos. Após três dias no ambiente os oocistos esporulam e tornam-se infectivos para o hospedeiro (Mc ALLISTER *et al.*, 1998). Cada oocisto contém dois esporocistos, cada qual com quatro esporozoítas. Quando os oocistos são ingeridos por um hospedeiro intermediário, os esporozoítas infectivos são liberados no trato intestinal, penetram nas células e se transformam em taquizoítas, que se dividem rapidamente, lesando as células e disseminando a infecção (LINDSAY *et al.*, 1999).

3.3 MECANISMOS DE INFECÇÃO DE *Neospora caninum*

Os dois mecanismos de infecção conhecidos de *N. caninum* são a transmissão vertical ou infecção congênita e a transmissão horizontal ou infecção pós-natal (BASSO *et al.*, 2001). Os hospedeiros intermediários (HI) naturais já identificados são os cães, bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos, cervos (DUBEY e LINDSAY, 1996; DUBEY, 1999), búfalos (RODRIGUES *et al.*, 2004), ratos silvestres

(*Rattus norvegicus*) (HUANG *et al.*, 2004), e as raposas (ALMERIA *et al.*, 2002), contudo anticorpos já foram descritos em gatos, camelos, mão-pelada, e vários canídeos (DUBEY, 2003; MOORE, 2005). Os hospedeiros definitivos (HD) são os cães (Mc ALLISTER *et al.*, 1998; BASSO *et al.*, 2001) e os coiotes (GONDIM *et al.*, 2004).

3.3.1 Transmissão horizontal

Na transmissão horizontal, os cães e coiotes consomem os cistos de *N. caninum* dos tecidos do hospedeiro intermediário e eliminam oocistos nas fezes. Os hospedeiros intermediários infectam-se consumindo os oocistos esporulados (Mc ALLISTER, 1999). A infecção é mais freqüente em cães de áreas rurais (SAWADA *et al.*, 1998; WOUDA *et al.*, 1999; ANTONY e WILLIAMSON, 2003; SÁNCHEZ *et al.*, 2003; WANHA *et al.*, 2005; HORNOK *et al.*, 2006). Isto se deve ao fato de que os animais destas áreas têm maior contato com carne e vísceras infectadas, quando comparados aos cães domiciliados de áreas urbanas (MELO *et al.*, 2005). FERNANDES e colaboradores (2004) observaram diferenças nos valores de prevalência de anticorpos em cães de regiões urbana e rural, com maior ocorrência nos animais de áreas rurais. Resultados soroepidemiológicos sugerem uma forte associação entre os rebanhos bovinos infectados por *N. caninum* e a presença de cães soropositivos nas fazendas (SAWADA *et al.*, 1998; BASSO *et al.*, 2001a).

As fontes de infecção para os cães precisam ainda ser determinadas, mas placentas, fetos de bovinos e carcaças de bezerros infectados via congênita podem conter cistos viáveis de *N. caninum* e, conseqüentemente, infectar os cães (Mc ALLISTER, 1999). LOCATELLI-DITTRICH (2002) observou que cães alimentados com tecidos de bezerros com neosporose eliminaram nas fezes poucos oocistos não esporulados de *N. caninum*, e o período de eliminação foi de 16 dias (do 13º até o 29º dia após a ingestão das amostras). A esporulação dos oocistos ocorreu após um período de três dias, em amostras fecais mantidas em geladeira. Anticorpos IgG contra *N. caninum* no método da RIFI (título 1:50) não foram detectados nestes cães, antes e após 11, 18 e 38 dias das inoculações experimentais. Em infecção experimental, cães eliminaram oocistos após a ingestão de tecidos de bovinos

infectados com *N. caninum* (DIJKSTRA *et al.*, 2001, GONDIM *et al.*, 2002; GONDIM *et al.*, 2005) e oocistos também já foram isolados das fezes de cães naturalmente infectados (BASSO *et al.*, 2001, SLAPETA *et al.*, 2002). Cães com infecção natural podem eliminar oocistos durante um longo período em determinadas circunstâncias, ou voltar a eliminá-los após algum tempo (MC GARRY *et al.*, 2003), entretanto estudos mais detalhados são necessários para o entendimento da dinâmica de frequência e intensidade de eliminação de oocistos no ambiente pelo hospedeiro definitivo.

3.3.2 Transmissão vertical ou transplacentária

A transmissão vertical ou transplacentária pode ocorrer em vários hospedeiros, sendo esta via considerada como a principal forma de infecção em bovinos. Uma vaca cronicamente infectada pode transmitir a infecção ao feto por sucessivas gestações e pode apresentar um ou mais abortos durante a sua vida reprodutiva. As vacas infectadas são três a sete vezes mais suscetíveis ao aborto que as vacas não infectadas (DAVIDSON *et al.*, 1999; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2001). A transmissão transplacentária é de grande importância na disseminação de *N. caninum* nos rebanhos bovinos (ANTONY e WILLIAMSON, 2001). A maioria dos bezerros que nascem de mães infectadas são portadores da infecção e, uma vez infectado, o animal parece permanecer infectado por toda a vida (DUBEY, 2003), já que a maior parte das infecções congênitas resulta no nascimento de bezerros aparentemente saudáveis (ANTONY e WILLIAMSON, 2001). Dessa forma, o parasita pode permanecer no rebanho por muitas gerações, sem o envolvimento de um hospedeiro definitivo. No entanto, existem evidências que em abortos epidêmicos causados pelo protozoário, a fonte de infecção seja preferencialmente externa, e não uma reativação da infecção crônica nas vacas (Mc ALLISTER *et al.*, 1996; WOUDA *et al.*, 1999; Mc ALLISTER *et al.*, 2000). Estudos sorológicos demonstram que vacas que abortam durante um surto epidêmico, provavelmente adquiriram a infecção após o nascimento, devido à falta de associação entre soropositividade de mães e filhas (ANDREOTTI *et al.*, 2005). A transmissão horizontal

é um fator determinante para a estabilidade da prevalência da infecção em um rebanho (ANTONY e WILLIAMSON, 2001).

Na espécie eqüina, estudo realizado no Paraná demonstrou a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em amostras pré-colostrais de potros, sugerindo que o parasita pode ser transmitido pela via vertical ou transplacentária (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2006).

Cadelas infectadas subclínicamente também podem transmitir *N. caninum* para seus fetos e ninhadas sucessivas podem nascer infectadas. Não existem evidências de que haja predisposição racial ou de sexo para a neosporose canina (DUBEY e LINDSAY, 1996).

3.3.3 Transmissão lactogênica

A transmissão lactogênica de *N. caninum* já foi demonstrada experimentalmente em bezerros recém-nascidos, alimentados com taquizoítas adicionados ao colostro, mas não há evidências que isto ocorra naturalmente (DAVIDSON *et al.*, 2001). Cães que receberam colostro proveniente de vacas soropositivas, inoculado com taquizoítas, não eliminaram oocistos nas fezes (DIJKSTRA *et al.*, 2001).

3.3.4 Ciclo biológico de *N. caninum*

Na transmissão horizontal, os hospedeiros definitivos (cão e coiote) se infectam ingerindo cistos de *N. caninum* presentes em tecidos dos hospedeiros intermediários. No trato digestório do HD há formação de oocistos, que são liberados nas fezes na forma não esporulada. Após alguns dias no ambiente, os oocistos esporulam, tornam-se infectivos para o HI e contaminam a água, os alimentos e o solo. O HI se infecta através da ingestão de oocistos esporulados, que iniciam a multiplicação intracelular no organismo do hospedeiro na forma de taquizoítas.

Ocorre a formação de cistos com bradizoítas que ficam alojados nos tecidos do HI e serão ingeridos pelo HD, completando o ciclo.

Na transmissão vertical, os taquizoítas atingem a placenta e podem causar infecção fetal, levando à reabsorção, mumificação ou aborto, ou ainda dando origem a um animal sadio, portador assintomático ou com alterações clínicas devido à multiplicação do protozoário.

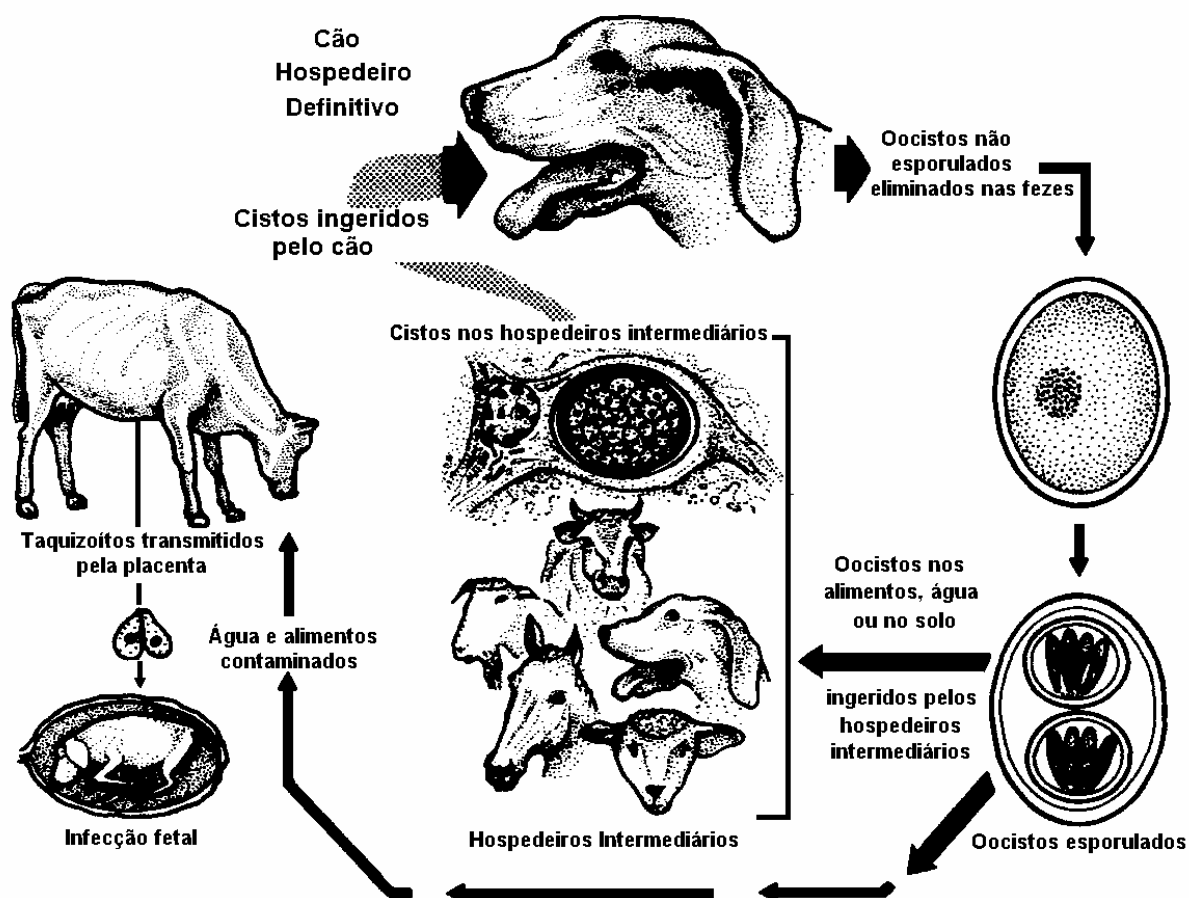


FIGURA 1 – CICLO BIOLÓGICO DE *N. caninum*
 FONTE: ADAPTADO DE DUBEY, J.P. (1999a)

3.4 SOROPREVALÊNCIA DE *N. caninum* EM CÃES

Vários estudos sobre a presença de prováveis fatores de risco, associação entre soropositividade à *N. caninum* com idade, raça, sexo ou origem do cão e levantamentos de soroprevalências em diversas regiões têm sido publicados nos últimos anos no mundo inteiro.

Muitas pesquisas já foram realizadas na Europa determinando a soroprevalência de *N. caninum* em cães em diferentes países e regiões do continente (RASMUSSEN E JENSEN, 1996; BARBER *et al.*, 1997; CRINGOLI *et al.*, 2002; ORTUNO *et al.*, 2002; WANHA *et al.*, 2005; HORNOK *et al.*, 2006; PARADIES *et al.*, 2007; VÁCLAVEK *et al.*, 2007). Anticorpos anti-*N. caninum* também já foram identificados na Turquia (COSKUN *et al.*, 2000) e Japão (SAWADA *et al.*, 1998). BARBER e colaboradores (1997) realizaram estudo de soroprevalência em 1.554 cães de cinco países e três continentes, detectando anticorpos anti-*N. caninum* na Austrália, Uruguai e África do Sul. Na América do Sul, estudos de soroprevalência em cães foram realizados na Argentina (BASSO *et al.*, 2001a), Chile (PATITUCCI *et al.*, 2001) e México (SÁNCHEZ *et al.*, 2003). No Brasil, anticorpos anti-*N. caninum* já foram detectados em vários Estados, incluindo São Paulo (BELO *et al.*, 1999; VARANDAS *et al.*, 2001; GENNARI *et al.*, 2002; BRESCIANI *et al.*, 2005; MORAES *et al.*, 2005), Minas Gerais (FERNANDES *et al.*, 2004), Rondônia (CAÑÓN-FRANCO *et al.*, 2003; AGUIAR *et al.*, 2006), Paraíba (AZEVEDO *et al.*, 2005), Goiás (BOAVENTURA *et al.*, 2005), Bahia (JESUS *et al.*, 2006), Maranhão (TEIXEIRA *et al.*, 2006) e Mato Grosso do Sul (ANDREOTTI *et al.*, 2006). No Estado do Paraná, estudos com cães rurais já demonstraram a presença de animais soropositivos à *N. caninum* nestas áreas (SOUZA *et al.*, 2002; GUIMARÃES Jr. *et al.*, 2004; ROMANELLI *et al.*, 2007).

Anticorpos anti-*N. caninum* já foram identificados em canídeos silvestres (CAÑÓN-FRANCO *et al.*, 2004; GONDIM, 2006), como o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), espécie comum no Brasil, e raposas (ALMERIA *et al.*, 2002); em gambás (*Didelphis marsupialis*) (YAI *et al.*, 2003) e em capivaras (*Hidrochoeris hidrochoeris*). Resultados sorológicos realizados no Brasil indicam que há possibilidade de que espécies de canídeos selvagens que habitam o ambiente brasileiro possam ser hospedeiras definitivas do agente (CAÑÓN-FRANCO, 2004; GENNARI, 2004; VITALIANO *et al.*, 2004; GONDIM, 2006).

3.5 SINAIS CLÍNICOS DE NEOSPOROSE EM CÃES

O primeiro relato de neosporose canina foi feito em 1984 por BJERKAS e colaboradores, em filhotes da raça Boxer que desenvolveram uma progressiva e fatal doença neurológica com paresia (BARBER e TREES, 1996). A doença inicialmente foi confundida com toxoplasmose, devido à similaridade dos sinais clínicos. Os protozoários *N. caninum* e *T. gondii* pertencem ao filo Apicomplexa e são muito semelhantes entre si, porém algumas pequenas diferenças antigênicas e estruturais permitem a distinção entre os dois parasitas (DUBEY *et al.*, 1988a). Outro fator fundamental para a diferenciação é a distinta biologia. *Neospora caninum* é considerado como uma importante causa de aborto em bovinos (DUBEY, 1999a), enquanto *T. gondii* é causador de uma zoonose cosmopolita capaz de acometer a maioria dos animais de sangue quente, incluindo domésticos e silvestres, (TENTER *et al.*, 2000) e em humanos pode causar perdas de visão e até a morte (DUBEY, 1999a)

Desde a identificação de *N. caninum* (DUBEY *et al.*, 1988), casos individuais ou pequenos grupos de casos de neosporose em cães têm sido descritos em muitos países, como Canadá (ODIN e DUBEY, 1993; BOYD *et al.*, 2005; CROOKSHANKS *et al.*, 2007); Inglaterra (KNOWLER e WHEELER, 1995); Austrália (McINNES *et al.*, 2006), EUA (JACKSON *et al.*, 1995; RUEHLMANN *et al.*, 1995; DUBEY *et al.*, 2005); Espanha (PUMAROLA *et al.*, 1996); Nova Zelândia (PATITUCCI *et al.*, 1997; REICHEL *et al.*, 1998); Itália (PASQUALI *et al.*, 1998); Alemanha (PETERS *et al.*, 2000); Brasil (GONDIM *et al.*, 2001) e Argentina (BASSO *et al.*, 2005). BARBER e TREES descreveram os aspectos clínicos de 27 casos de neosporose em cães europeus, de dois dias a sete anos de idade, e de 13 diferentes raças (BARBER e TREES, 1996).

Em cães com infecção natural os taquizoítas já foram encontrados no coração, pulmão, fígado, pele, rins, no cérebro e medula espinhal (DUBEY *et al.*, 1998a; PETERS *et al.*, 2000; GONDIM *et al.*, 2001; McINNES *et al.*, 2006). Animais de qualquer idade podem ser infectados e os sinais clínicos podem variar amplamente. A doença pode se manifestar na forma generalizada, com vários órgãos envolvidos, ou na forma localizada (DUBEY, 2003). Geralmente os casos mais severos de neosporose ocorrem em filhotes congenitamente infectados

(RUEHLMANN *et al.*, 1995; DUBEY e LINDSAY, 1996; RASMUSSEN E JENSEN, 1996, DUBEY, 1999a; DUBEY, 2003; DUBEY *et al.*, 2005). Estes cães jovens podem desenvolver paralisia dos membros pélvicos que evolui de forma progressiva (DUBEY e LINDSAY, 1996). BASSO e colaboradores (2005) observaram taquizoítas e cistos teciduais de *N. caninum* em cérebro de um cão da raça Boxer de dois meses de idade que apresentava paralisia progressiva, atrofia muscular e título 1:12.800 para o protozoário. No mesmo animal foram observados miosite no esôfago e musculatura estriada, e vários grupos de taquizoítas foram associados a estas lesões, indicando que a neosporose deve ser incluída no diagnóstico diferencial de megaesôfago em cães.

Os sinais neurológicos associados à neosporose dependem do órgão e tecidos parasitados (JACKSON *et al.*, 1995; DUBEY, 2003). Em geral, os membros pélvicos são mais severamente afetados do que os membros torácicos (DUBEY, 2003; DUBEY *et al.*, 2005) e freqüentemente se apresentam em hiperextensão rígida. Cães com paralisia de membros pélvicos podem permanecer alerta e sobreviver por vários meses (DUBEY e LINDSAY, 1996).

Os sinais mais freqüentes, além da hiperextensão rígida de um ou de ambos os membros pélvicos, paresia com ataxia e alterações proprioceptivas, incluem também fraqueza de membros (DUBEY *et al.*, 2007), atrofia muscular (BARBER e TREES, 1996, BASSO *et al.*, 2005), mialgia (especialmente do quadríceps e dos músculos lombares), cifoescoliose lombar, paresia uni ou bilateral dos membros torácicos, hemiparesia e quadriparesia, alterações de comportamento, cegueira central, tremores cefálicos, convulsões, dificuldade de deglutição, incontinência fecal e urinária, flacidez muscular e paralisia dos maxilares. São manifestações mais raras a depressão da consciência e as alterações em nervos cranianos, principalmente a anisocoria, os reflexos pupilares lentos, o nistagmo, a ptose e o estrabismo (KNOWLER e WHEELER, 1995; BARBER e TREES, 1996). Em cães com neosporose congênita já foram identificados cistos de *N. caninum* na retina (DUBEY *et al.*, 1990).

Na TABELA 1 estão identificados os principais sinais neurológicos observados em cães que desenvolvem a doença.

TABELA 1 – FORMAS DE APRESENTAÇÕES DOS SINAIS NEUROLÓGICOS NA NEOSPOROSE CANINA

PRINCIPAIS APRESENTAÇÕES	OUTRAS APRESENTAÇÕES
Alteração proprioceptiva e dos reflexos espinhais	Paresia membros torácicos (uni ou bilateral)
Atrofia muscular	Hemiparesia/quadriparesia
Mialgia, especialmente quadríceps e musculatura lombar	Ataxia/hipermetria
Cifoesciose lombar	Alteração de comportamento
Hiperextensão rígida de um ou ambos membros pélvicos	Cegueira central
	Tremores cefálicos
	Convulsões

FONTE: BARBER (1998)

Outras disfunções, mais comuns de serem observadas em animais adultos, são as dermatites, cardiomiosites e pneumonias, conforme descrito na TABELA 2. A neosporose pode se manifestar de forma localizada ou generalizada (BARBER e TREES, 1996), com todos os órgãos envolvidos, inclusive a pele (DUBEY *et al.*, 1988a; DUBEY *et al.*, 1995; BOYD *et al.*, 2005). Casos de neosporose cutânea foram descritos em cães com dermatite ulcerativa em Israel (PERL *et al.*, 1998), na Itália (POLI *et al.*, 1998) e na Hungria (HORNOK *et al.*, 2006). Na Austrália, McINNIS *et al.* (2006) isolaram *N. caninum* de lesão de pele em um cão. A neosporose cutânea, embora mais comum em adultos, pode ocorrer em cães de qualquer idade e a imunossupressão pode contribuir para o aparecimento desta manifestação clínica da doença (BOYD *et al.*, 2005; McINNIS *et al.*, 2006). Segundo DUBEY e LINDSAY (1996), enfermidades simultâneas não são comuns nos casos de neosporose, mas a imunossupressão natural ou iatrogênica pode exacerbar a infecção.

TABELA 2 – APRESENTAÇÕES NÃO NEUROLÓGICAS DE NEOSPOROSE EM CÃES

CONDIÇÃO	IDADE DE CASOS CONFIRMADOS	SINAIS OBSERVADOS
Miocardite	2 dias – 10 meses (e um adulto)	Morte súbita
Pneumonia	11 anos	Tosse, letargia, hipertermia
Dermatite	6-15 anos	Dermatite multifocal, hemorrágica, ulcerativa, necrótica, piogranulomatosa

FONTE: BARBER (1998)

Apesar da predisposição por sexo e raça não serem conhecidos, a maioria dos casos descritos ocorreram em cães das raças Labrador, Boxer, Greyhound, Golden Retrievers (GUIMARÃES Jr. e ROMANELLI, 2006, DUBEY e LINDSAY, 1996, BUXTON *et al.*, 2002) e Basset Hounds (DUBEY e LINDSAY, 1996, BUXTON *et al.*, 2002). Entretanto, a neosporose já foi confirmada em mais de 30 raças, incluindo Yorkshire Terrier, Cavalier King Charles Spaniel, West Highland White Terrier, Border Collie, Springer Spaniel, Husky, Great Dane, Bernese Mountain Dog, Irish Wolfhound (BARBER, 1998; CROOKSHANKS *et al.*, 2007), Kleiner Münsterländer (PETERS *et al.*, 2000), Pitt Bull Terrier (PASQUALI *et al.*, 1998); Collie (GONDIM *et al.*, 2001), Mastiff Napolitano (PUMAROLA *et al.*, 1996) e Beagle (DUBEY *et al.*, 2007).

No Brasil, o primeiro isolamento foi realizado por GONDIM e colaboradores (2001) de um cão de sete anos da raça Collie, que possuía sinais clínicos indicativos de neosporose. O animal apresentava incoordenação e paresia de membros, e apresentou títulos de 1600 na RIFI. O isolamento foi feito após a inoculação de fragmentos de cérebro do cão em gerbils e a confirmação através de imunohistoquímica (IHC) e reação da polimerase em cadeia (PCR).

Tanto as infecções clínicas quanto as subclínicas de neosporose em cães são importantes no estudo epidemiológico da doença e na manutenção do protozoário no ambiente e, portanto, devem ser investigadas. Nas áreas rurais, a possibilidade de eliminação de oocistos pelas fezes do cão pode se tornar um fator de risco para a ocorrência de infecção e abortos em bovinos (PARE *et al.*, 1998) e eqüinos (DUBEY, 2003), além de permitir o fechamento do ciclo do parasita.

3.6 DIAGNÓSTICO DE NEOSPOROSE EM CÃES

O diagnóstico da neosporose deve ser feito de forma criteriosa e completa, incluindo uma boa anamnese, histórico do animal, sinais clínicos, análises laboratoriais e, de acordo com o caso, exame *post mortem*.

Na avaliação do animal, o clínico deve pesquisar antecedentes familiares, possível contato do cão com bovino ou eqüino com histórico de abortos, acesso do animal à rua, possibilidade de caça a roedores ou animais silvestres, além dos

hábitos alimentares do cão, especialmente se há consumo de carne ou vísceras cruas. A possibilidade de infecção dos cães através da ingestão de leite cru de vacas infectadas também deve ser investigada. Durante o exame físico, devem ser observados se existem sinais clínicos que levem a suspeita de neosporose. O quadro sugestivo da doença nos cães é de alteração neurológica e polimiosite.

O diagnóstico laboratorial é realizado para confirmar uma infecção por *N. caninum* (HEMPHILL *et al.*, 2000), e pode ser feito através de exames sorológicos e parasitológicos.

Testes de rotina hematológica e bioquímica não são suficientes para confirmar o diagnóstico da doença (DUBEY e LINDSAY, 1996; BARBER e TREES, 1996), mas as atividades das enzimas creatinoquinase (CK) e aspartato amino transferase (AST) podem estar aumentadas nos casos de envolvimento muscular (BARBER e TREES, 1996; DUBEY e LAPPIN, 2006). Entretanto, a atividade da enzima CK pode estar elevada em muitos casos de miosite, independente da causa, e isto deve ser muito bem avaliado pelo clínico. Outro fator importante é a rapidez com que deve ser feita análise após a coleta da amostra, devido à CK ser extremamente lábil, alterando o resultado bioquímico.

A biópsia muscular é considerada um teste extremamente valioso para o diagnóstico de neosporose (DUBEY *et al.*, 1998). Taquizoítas de *N. caninum* podem ser visualizados em tecidos, fluidos ou amostras citopatológicas e devem ser distinguidos de *T. gondii* (DUBEY e LAPPIN, 2006). Os taquizoítas de ambos os parasitas são estruturalmente similares à microscopia óptica. Entretanto, podem ser diferenciados ultraestruturalmente por suas próprias, já que estas estruturas em *N. caninum* são eletrodensas e em *T. gondii* são eletrolucidas. Outra forma de distinção entre os dois protozoários é através da espessura da parede dos cistos teciduais. *Neospora caninum* possui a parede do cisto mais espessa ($\geq 1 \mu\text{m}$), quando comparado à *T. gondii* ($< 0,5 \mu\text{m}$) (DUBEY *et al.*, 1998).

Outro exame diagnóstico que pode auxiliar na identificação da doença é a análise do líquido cefalorraquidiano (CSF) do animal suspeito. Através deste exame, a contagem de células inflamatórias pode indicar uma condição inflamatória ou infecciosa, a visualização de taquizoítas pode sugerir encefalomielite protozoária (BARBER e TREES, 1996) e a presença de anticorpos anti-*N. caninum* é considerada diagnóstica (DUBEY e LINDSAY, 1996).

A sorologia para anticorpos anti-*N. caninum* é atualmente o teste diagnóstico mais utilizado para a identificação inicial de possíveis casos de neosporose. Porém, a presença de anticorpos isoladamente não é considerada diagnóstica para a doença, já que a maioria dos cães soropositivos permanece saudável. A biologia molecular tem sido muito útil nas pesquisas com *N. caninum* e atua na detecção do DNA do protozoário nos tecidos do hospedeiro intermediário e também nas fezes do hospedeiro definitivo (HILL *et al.*, 2001, GONDIM *et al.*, 2005), sendo considerada o exame diagnóstico mais específico de neosporose disponível.

O exame de fezes do cão ou coiole é utilizado para identificação da eliminação de oocistos pelo hospedeiro definitivo. O diagnóstico parasitológico de neosporose no cão é extremamente difícil devido à falta de informações sobre a frequência e intensidade de eliminação dos oocistos no ambiente, além da impossibilidade de distinção entre as formas de *N. caninum* e *Hammondia heydorni* eliminadas nas fezes do cão (HILL *et al.*, 2001, SHARES *et al.*, 2001; SLAPETA *et al.*, 2002) apenas pela visualização dos oocistos. Nestes casos, a técnica de PCR é fundamental para detecção do DNA do parasita nas fezes do hospedeiro definitivo e a confirmação do diagnóstico definitivo (HILL *et al.*, 2001; SLAPETA *et al.*, 2002).

3.6.1 Diagnóstico sorológico de neosporose através da RIFI (reação de imunofluorescência indireta) e ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

Dentre os testes sorológicos, o método de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) foi o primeiro teste empregado no diagnóstico da neosporose, em 1988 (DUBEY *et al.*, 1988a). A RIFI é a metodologia de referência estabelecida para a pesquisa de anticorpos contra *N. caninum*, e é considerada como padrão ouro, um teste padrão para calibração e comparação com os novos testes (BJÖRKMAN *et al.*, 1999). A finalidade do método é a fixação de anticorpos aos antígenos de membrana dos taquizoítas, com visualização da reação pela adição de um conjugado fluorescente. No diagnóstico de rotina da neosporose em cães, o soro é analisado na diluição de 1:50 na RIFI, embora os cães com sinais clínicos de neosporose geralmente apresentem um título $\geq 1:400$ de IgG (DUBEY *et al.*, 1998a). Os anticorpos não específicos que produzem fluorescência reduzida e

consequentemente reação cruzada são desconhecidos. *Neospora caninum* e *T. gondii* possuem muitos antígenos semelhantes, porém a RIFI parece ser bem específica na detecção dos anticorpos. Reação cruzada entre os dois protozoários na diluição 1:100 pela RIFI não é comumente observada. Entretanto, vários fatores como o conjugado, tampão e padrão de fluorescência são muito importantes na avaliação da especificidade do teste sorológico (DUBEY e LINDSAY, 1996).

Os significados dos resultados sorológicos são poucos conhecidos no diagnóstico da neosporose canina. Um aumento progressivo do título de anticorpos da classe IgG, em um período de tempo, geralmente é indicativo de infecção aguda (DUBEY *et al.*, 1998a). O que se observa é que a sorologia ainda deve ser vista de forma presuntiva porque a presença de anticorpos não é diagnóstica para a doença, já que muitos cães soropositivos permanecem saudáveis. Entretanto, a magnitude do título pode ser indicadora de diagnóstico, apesar de alguns animais clinicamente normais terem apresentado títulos 1:800 em estudos epidemiológicos. Como *N. caninum* pode ser transmitido através da placenta, uma sorologia positiva em uma cadela sugere um diagnóstico de neosporose em seus filhotes (BARBER e TREES, 1996). DUBEY *et al.* (1998) verificaram que os títulos de anticorpos em cães com neosporose clínica variaram de 1:50 até 1:3.200 no método da RIFI. Em cães clinicamente normais, REICHEL (1998) verificou títulos de 1:200.

A maioria dos laboratórios utiliza o teste da RIFI na rotina, porque geralmente poucas amostras de soro de cães são submetidas simultaneamente para sorologia de *N. caninum* (BJÖRKMAN *et al.*, 1999). Para amostras individuais, a imunofluorescência indireta se mantém como teste de primeira escolha (LARSRI *et al.*, 2004). O teste de ELISA é o principal método sorológico utilizado nas avaliações dos rebanhos de bovinos, com finalidades diagnósticas ou de pesquisa, pois apresenta algumas vantagens em relação ao método da RIFI. Dentre elas destacam-se a realização de um maior número de análises, maior rapidez, o registro das reações é realizado de maneira objetiva e o exame pode ser automatizado (BJÖRKMAN *et al.*, 1999). Vários estudos vêm sendo realizados para validar testes de ELISA para diagnóstico sorológico em cães. LASRI *et al.* (2004) desenvolveram um método de ELISA direto que pode substituir o método da IFI para a análise de um grande número de soros de cães. CAPELLI *et al.* (2006) utilizaram amostras de 618 cães para validar um teste comercial de cELISA para detecção de anticorpos anti-*N. caninum* no soro de cães utilizando como referência o teste de imunofluorescência

indireta. Os resultados estatísticos mostraram que o cELISA pode ser usado como teste para confirmação de suspeita clínica de neosporose, quando níveis altos de anticorpos são esperados, porém para estudos epidemiológicos alguns ajustes devem ser feitos (CAPELLI *et al.*, 2006).

3.6.2 Diagnóstico parasitológico de neosporose

O diagnóstico parasitológico pode ser feito através de exames histopatológicos, imunohistoquímicos, o isolamento *in vitro* e *in vivo*, a detecção do DNA do parasita por PCR, a observação dos cistos nos tecidos a fresco (sem coloração) e o exame de fezes no hospedeiro definitivo (DUBEY *et al.*, 1998; HEMPHILL *et al.*, 2000; ANDERSON *et al.*, 2000). Cada método apresenta vantagens, desvantagens e limitações, que devem ser considerados na interpretação dos resultados (LOCATELLI-DITTRICH, 2002).

3.6.2.1 Exame de fezes

O exame de fezes é feito para pesquisa de oocistos de *N. caninum* nos hospedeiros definitivos do parasita (cão e coioite). O método mais utilizado é o de flutuação com solução de açúcar (MCALLISTER *et al.*, 1998; GONDIM *et al.*, 2002). As características dos oocistos de *N. caninum* são parecidas àquelas dos oocistos de *H. heydorni*, isolados de fezes de cães, e dos oocistos de *T. gondii* e *Hammondia hammondi*, isolados de fezes de gato (LINDSAY *et al.*, 1999a; HILL *et al.*, 2001; SCHARES *et al.*, 2005).

O primeiro isolamento de oocistos de *N. caninum* de um cão naturalmente infectado foi feito por BASSO *et al.* (2001) das fezes de um filhote de cão com histórico de diarreia, através do método de flutuação com solução de açúcar. Foram encontrados oocistos pequenos, semelhantes aos de *Hammondia-Neospora*, que posteriormente foram confirmados nos Estados Unidos como sendo de *Neospora caninum*, através de técnica de PCR e inoculação em gerbils. Estudos

demonstraram que cães com infecção natural podem eliminar oocistos durante um longo período de tempo em determinadas circunstâncias, ou voltar a eliminá-los após algum tempo (Mc GARRY *et al.*, 2003).

Em infecção experimental, os oocistos de *N. caninum* já foram isolados das fezes de cães (LINDSAY *et al.*, 1999a; DJISKSTRA *et al.*, 2001, HILL *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2004; GONDIM *et al.*, 2005), porém nunca foram observados em cães com infecção ativa sistêmica pelo protozoário, indicando que provavelmente o exame de fezes apresenta pouco valor na detecção da doença (LINDSAY *et al.*, 1999a). Os efeitos de fatores como idade, raça e sexo dos cães sobre a excreção de oocistos de *N. caninum* são desconhecidos (RODRIGUES *et al.*, 2004) e pouco se sabe sobre a frequência, intensidade de eliminação e o tempo de sobrevivência destes oocistos no ambiente (DUBEY, 2003). Estudos mais detalhados são necessários para o melhor entendimento da participação do hospedeiro definitivo na epidemiologia do parasita.

3.6.2.2 Exame histopatológico

O exame histopatológico deve ser realizado principalmente em amostras do sistema nervoso central e se baseia na observação de lesões sugestivas de neosporose e na presença de taquizoítas ou cistos teciduais. Lesões que indicam a presença da doença incluem encefalite não supurativa, com diferentes graus de degeneração neuronal e gliose multifocal. No cérebro ainda podem ser observados infiltrados celulares mononucleares, com ocasionais focos de necrose (DUBEY *et al.*, 2005). Miocardites, miosites e hepatites não supurativas também podem estar presentes. A miosite de musculatura esquelética é caracterizada por necrose, infiltração de células mononucleares e vasculite, sendo mais frequentemente observada em membros pélvicos (DUBEY e LINDSAY, 1996).

BASSO *et al.* (2001) encontraram no exame histopatológico de filhote de boxer com neosporose, encefalite multifocal não supurativa, com numerosas áreas de gliose focal associadas com malácia, e presença de taquizoítas e cistos teciduais próximos a essas áreas. DUBEY *et al.* (1998) observaram cistos de *N. caninum* no cérebro, presença de encefalite e miosite não supurativa e várias lesões com

taquizoítas associados em coração, musculatura esquelética e cérebro de cães com neosporose.

3.6.2.3 Exame imunohistoquímico

O exame imunohistoquímico é utilizado para detecção do protozoário nos tecidos do hospedeiro. Quando lesões típicas são encontradas, a confirmação do diagnóstico é feita pela imunohistoquímica. A técnica revela a presença de *N. caninum* nos cortes de tecidos, através do uso de anticorpos anti-*Neospora* nas amostras analisadas. A identificação de taquizoítas e/ou cistos de *N. caninum* por meio de exame imunohistoquímico tem sido relatada a partir de cérebro, medula espinhal, coração, fígado, pulmão, rim, esôfago e retina (DUBEY *et al.*, 1988a; BARBER e TREES, 1996).

3.6.2.4 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

A reação da polimerase em cadeia (PCR) é utilizada para detecção de *N. caninum* através da amplificação de segmentos específicos do DNA do parasita. Apesar de ser um importante método diagnóstico, a biologia molecular ainda não é rotineiramente utilizada nos laboratórios devido ao custo elevado, porém tem sido fundamental em pesquisas realizadas em muitos países. O diagnóstico através da PCR se tornou o método de escolha para detecção de patógenos em estudos clínicos e epidemiológicos e é considerado um dos mais específicos métodos diagnósticos com boa sensibilidade (HURCOVÁ *et al.*, 2006). A técnica de PCR é fundamental para detecção de *N. caninum* nos tecidos do hospedeiro intermediário e nas fezes do cão, sendo considerada peça chave para a confirmação do diagnóstico nestes animais.

3.6.3 Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial é de extrema importância para a identificação da enfermidade e a implantação de um tratamento adequado ao animal. Outras condições que podem levar ao aparecimento de sinais clínicos semelhantes aos observados na neosporose canina e que devem ser incluídas no diagnóstico diferencial da doença no cão estão descritas na TABELA 3.

TABELA 3 – DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE NEOSPOROSE EM CÃES

CONDIÇÃO
Trauma
Doença do disco intervertebral
Toxoplasmose
Outras doenças infecciosas, como raiva e cinomose
Neuropatias congênitas/hereditárias
Meningoencefalopatia granulomatosa (MEG) e outras doenças inflamatórias do sistema nervoso central (SNC).
Doenças tromboembólicas
Neoplasias
Envenenamentos/botulismo
Vários tipos de miopatias ou miosites, incluindo miopatias metabólicas e distrofias musculares
Outras causas de miocardites, pneumonia
Outras causas de epilepsia

FONTE: ADAPTADO DE BARBER, 1998

3.7 TRATAMENTO DA NEOSPOROSE CANINA

Informações sobre uma terapia efetiva para a neosporose canina ainda são limitadas (DUBEY e LAPPIN, 2006). A resposta ao tratamento depende do estágio da doença no cão, gravidade dos sinais clínicos e principalmente da rapidez do início da terapia medicamentosa. Filhotes que apresentam alterações clínicas graves são menos responsivos ao tratamento do que cães com sinais crônicos (BARBER e TREES, 1996). Estudos demonstram que o rápido início da terapia medicamentosa

melhora inclusive o prognóstico dos animais. Cães que recebem tratamento logo no aparecimento dos sinais clínicos têm maior chance de recuperação do que aqueles que só foram tratados uma ou duas semanas após o início das alterações. Dessa forma, a terapia deve ser iniciada o mais brevemente possível, mesmo antes do resultado sorológico ou diagnóstico confirmativo da doença através de outros exames específicos (BARBER e TREES, 1996).

Os medicamentos utilizados no tratamento de neosporose foram selecionados com base na experiência com a toxoplasmose e nos resultados de estudos *in vitro* e *in vivo* (BARBER e TREES, 1996). Vários antibióticos como as sulfadiazinas, pirimetamina e clindamicina tiveram sua eficácia testada em cultura de células (LINDSAY *et al.*, 1994). Em geral, sabe-se que drogas antiprotozoárias são benéficas em cães com neosporose clínica, porém o efeito da clindamicina sobre os cistos teciduais de *N. caninum* é desconhecido e para cistos de *T. gondii* é ineficaz (DUBEY *et al.*, 1998). Entretanto, o tratamento adequado com sulfonamida e trimetoprim ou clindamicina pode levar à resolução dos sinais clínicos (DUBEY *et al.*, 1998; THOMAS, 1998; TARLOW *et al.*, 2005)

Há alguns anos, muitos medicamentos têm sido utilizados com o objetivo de controlar a neosporose. Associações e diferentes períodos de tratamento estão expostos na TABELA 4. Medicamentos derivados de ervas também têm sido testados *in vitro* e demonstraram serem eficazes contra *N. caninum* nas doses adequadas (LINDSAY *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 2002; KWON *et al.*, 2003; YOUN *et al.*, 2003).

TABELA 4 - TERAPIAS UTILIZADAS NA NEOSPOROSE CANINA

DROGA	DOSE (mg/kg)	VIA DE ADMINISTRAÇÃO	FREQÜÊNCIA (HORA)	DURAÇÃO (SEMANAS)
Sulfonamida-trimetoprim	15-20	VO	12	4-8
	10-15	VO	08	4-8
Clindamicina	7,5-15	VO/SC	08	4-8
	15-22	VO/SC	12	4-8
Pirimetamina	1	VO	24	
Sulfonamida	15-30	VO	12	2-4

FONTE: DUBEY e LAPPIN (2006)

3.8 TOXOPLASMOSE EM CÃES

Toxoplasma gondii (NICOLLE e MANCEAUX, 1909), é um protozoário intracelular de distribuição mundial, que tem os felídeos como hospedeiros definitivos. A toxoplasmose pode afetar uma grande variedade de animais, inclusive o homem. Nos cães, hospedeiros intermediários do parasita, a infecção é de evolução crônica e assintomática na grande maioria dos casos, mas quando diante de condições imunossupressoras manifesta-se clinicamente como uma moléstia grave (GERMANO *et al.*, 1985; DUBEY e LAPPIN, 2006). A toxoplasmose canina raramente resulta de infecção primária, portanto uma grande parte dos cães que morrem da doença são portadores do vírus da cinomose ou apresentam alguma outra imunossupressão (MORETTI *et al.*, 2002; DUBEY *et al.*, 2003a; MORETTI *et al.*, 2006). Entretanto, em estudo realizado em Londrina – Paraná, com cães portadores de distúrbios neurológicos, não se observou associação entre toxoplasmose e cinomose em 98 amostras analisadas. Embora os resultados de soroprevalência à *T. gondii* nos animais analisados tenham sido altos, os dois cães que apresentaram cistos do protozoário não tinham lesões compatíveis com cinomose, enquanto nos animais que apresentaram lesões compatíveis com cinomose a infecção por protozoários foi ausente (GIRALDI *et al.*, 2002).

A doença clínica no cão é de difícil diagnóstico porque a enfermidade em geral é de caráter crônico, decorrente da alta infectividade e baixa patogenicidade do parasito. Em geral, duas formas da toxoplasmose canina são observadas, uma severa multisistêmica e normalmente fatal, que é mais comum em cães jovens; e outra localizada no sistema nervoso central e periférico (DUBEY *et al.*, 1990 apud BANETH *et al.*, 1996). As manifestações clínicas da doença são muito variadas e comuns a diversas enfermidades, com envolvimento de vários órgãos e sistemas, incluindo gastrintestinal, linfático, esplênico, hepático, pulmonar, osteomuscular, cardíaco, ocular e nervoso. Segundo DUBEY e LAPPIN (2006), os sinais clínicos nos cães podem se localizar nos sistemas respiratório, neuromuscular ou gastrointestinal, ou ainda podem ser causados pela generalização da infecção.

Nos casos de manifestação clínica da toxoplasmose, o animal geralmente apresenta febre (40-42°C), anorexia, apatia, ataxia, desenvolvimento de pneumonia, dispnéia inspiratória, rinorréia, conjuntivite catarral ou catarro-purulenta,

linfadenopatia, sinais neurológicos e diarreia (DUBEY, 1987; SILVA *et al.*, 1997). Toxoplasmose generalizada tem sido observada mais comumente em cães com menos de um ano de idade, que apresentam febre, tonsilite, dispnéia, diarreia e vômito. Ocasionalmente podem ocorrer dermatites (DUBEY e LAPPIN, 2006). Cães com toxoplasmose nervosa mudam de hábitos, ficam agressivos ou apáticos, apresentam convulsões, sialorréia, paresia e paralisia (CORRÊA e CORRÊA, 1992). Assim como na neosporose, a forma de manifestação e a severidade da doença dependem do grau e localização da injúria tecidual. Os sinais nervosos da toxoplasmose dependem da localização do parasita no cérebro, cerebelo e medula espinhal. A multiplicação do agente nestes locais leva ao aparecimento de episódios convulsivos, déficits de nervos cranianos, ataxia, tremores, paresias e paralisias (DUBEY e LAPPIN, 2006), sendo as duas últimas citadas as alterações neurológicas predominantes (CORRÊA e CORRÊA, 1992).

Em infecções experimentais, alterações oftálmicas foram observadas em cães a partir da terceira semana pós-inoculação (ABREU *et al.*, 2002). Em animais inoculados, foram observados lesões histopatológicas em rim, pulmão, fígado, baço e linfonodo (ABREU *et al.*, 2001). PIPER e colaboradores (1970) descreveram retinite, coroidite e pseudocisto de *T. gondii* no epitélio ciliar de cão infectado pelo protozoário. Uveíte anterior, hiperplasia do epitélio ciliar e neurite no nervo óptico também já foram descritos, porém ainda são poucos os relatos de lesões oculares associados à toxoplasmose em cães (DUBEY e LAPPIN, 2006).

Como os sinais clínicos da doença são inespecíficos, outras moléstias devem ser investigadas simultaneamente. Desta forma, o diagnóstico diferencial da toxoplasmose em cães deve incluir a cinomose, a isosporose, a estrogiloidose, intoxicações por organofosforados, raiva (CORRÊA e CORRÊA, 1992), entre outros. O diagnóstico diferencial deve ainda englobar a neosporose, pois a infecção por *T. gondii* e *N. caninum* são clinicamente similares, não esquecendo que os cães podem concomitantemente ter sorologia positiva para ambos protozoários (MINEO *et al.*, 2001).

Vários autores já demonstraram que a infecção por *T. gondii* está difundida entre os cães no Brasil (ISHIZUKA *et al.*, 1974; ISHIZUKA e YASUDA, 1981; SALATA *et al.*, 1985; GUIMARÃES *et al.*, 1992; GIRALDI *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2003, ORTOLANI *et al.*, 2005) e os resultados de soroprevalência têm evidenciado grande número de cães infectados pelo protozoário. Anticorpos anti-*T. gondii* foram

encontrados em 63,6% de cães errantes da zona urbana de Salvador, Estado da Bahia (BARBOSA *et al.*, 2003), e em 50,5% de cães errantes em São Paulo (MEIRELES *et al.*, 2004). No nordeste do Estado de São Paulo, VARANDAS e colaboradores (2001) demonstraram que, de 295 soros de cães analisados, 51,19% foram sororeagentes à *T. gondii*.

Estudo soroepidemiológico de toxoplasmose realizado em propriedades rurais do município de Jaguapitã, Estado do Paraná, evidenciou que *T. gondii* está amplamente distribuído na população canina e felina da região, com menor soroprevalência em cães com menos de oito meses, indicando associação positiva entre idade do animal e soropositividade ao parasita (GARCIA *et al.*, 1999). SOUZA e colaboradores (2003) encontraram maior presença de anticorpos anti-*T. gondii* em cães rurais (34,3%) quando comparados à cães urbanos (19,7%). Toxoplasmose e sororeatividade à *T. gondii* são mais prevalentes em animais mais velhos, pois a força de exposição aumenta proporcionalmente com a idade; e em animais de ambiente rural, devido ao maior contato com pequenos mamíferos (DUBEY e LAPPIN, 2006).

3.8.1 Diagnóstico de toxoplasmose em cães

O diagnóstico de toxoplasmose em cães torna-se difícil devido à semelhança da doença com outras afecções de etiologia diversas, por isto a necessidade da associação entre os sinais clínicos observados no animal e os resultados de exames laboratoriais para confirmação final.

Alguns parâmetros hematológicos e bioquímicos podem estar alterados no cão com toxoplasmose aguda sistêmica, entre eles anemia não regenerativa, leucocitose neutrofílica, linfocitose, monocitose e eosinofilia. As anormalidades bioquímicas encontradas incluem hipoproteinemia e hipoalbuminemia, aumento das enzimas alanino amino transferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) pela necrose hepática e aumento da amilase e lipase em cães que desenvolvem pancreatite, embora este resultado não seja muito significativo (DUBEY e LAPPIN, 2006).

Através do exame de citologia, taquizoítas podem ser detectados em vários tecidos e fluidos corporais durante a fase aguda da doença, porém são raramente

encontrados no sangue, líquido cefalorraquidiano, aspirados com agulha fina e lavados broncoalveolar e transtraqueal (DUBEY e LAPPIN, 2006).

O método diagnóstico laboratorial mais utilizado na rotina clínica é a sorologia, pela detecção de anticorpos anti-*T. gondii* no soro ou plasma do cão suspeito. Dentre os métodos sorológicos, a RIFI é o mais usado para diagnóstico de toxoplasmose (UCHÔA *et al.*, 1999). O método de ELISA possui o mesmo princípio de funcionamento da técnica de imunofluorescência, partindo de uma reação antígeno-anticorpo, e apresenta algumas vantagens em relação à RIFI, principalmente quando grandes quantidades de amostras de soros são analisadas. A demonstração de anticorpos pelos métodos sorológicos apenas indica infecção prévia por *T. gondii*. O diagnóstico conclusivo de toxoplasmose clínica requer a demonstração de altos títulos de anticorpos específicos e aumento neste título em duas amostras de soro colhidas com duas a quatro semanas de intervalo (DUBEY, 1987; SILVA *et al.*, 1997).

O diagnóstico parasitológico é possível através da visualização, isolamento ou detecção do protozoário por PCR em tecidos, órgãos e líquidos de animais infectados.

REFERÊNCIAS

ABREU, C.B.; NAVARRO, I.T.; BALARIN, M.R.S.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; MARANA, E.R.M.; TRAPP, S.M.; FUGINAKA, C.A.; PRUDÊNCIO, L.B.; MATOS, M.R.; TSUTSUI, V.S. Aspectos clínicos, patológicos e sorológicos da toxoplasmose experimental em cães jovens. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, p. 123-130, 2001.

ABREU, C.B.; NAVARRO, I.T.; REIS, A.C.F.; SOUZA, M.S.B.; MACHADO, R.; MARANA, E.R.M.; PRUDÊNCIO, L.B.; MATTOS, M.R.; TSUTSUI, V.S. Toxoplasmose ocular em cães jovens inoculados com *Toxoplasma gondii*. **Ciência Rural**, v. 32, p. 807-812, 2002.

AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; RODRIGUES, A.A.R.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; CAMARGO, E.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 71-77, 2006.

ALMERÍA, S.; FERRER, D.; PABÓN, M.; CASTELLÀ, J.; MAÑAS S. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v.107, p.287-294, 2002.

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

ANDREOTTI, R.; LOCATELLI-DITTRICH, THOMAZ-SOCCOL, V.; PAIVA, F. Neosporose em bovinos. UFMS. **Série Qualificação Rural**, v. 3, p. 71-103, 2005.

ANDREOTTI, R.; OLIVEIRA, J.M.; ARAÚJO E SILVA, E.; OSHIRO, L.M.; MATOS, M.F.C. Occurrence of *Neospora caninum* in dogs and its correlation with visceral leishmaniasis in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 375-379, 2006.

ANTONY, A.; WILLIAMSON, N.B. Recent advances in understanding the epidemiology of *Neospora caninum* in cattle. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 49, p. 42-47, 2001.

ANTONY, A., WILLIAMSON, N.B. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs of rural or urban origin in central New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 51, p. 232-237, 2003.

AZEVEDO, S.S.; BATISTA, C.S., VASCONCELLOS, S.A; AGUIAR, D.M.; RAGOZO, A.M.; RODRIGUES, A.A.; ALVES, C.J.; GENNARI, S.M. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 79, p. 51-56, 2005.

BANETH, G.; SHKKAP, V.; SAVITSKY, I. The prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in dogs in Israel. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v.51, n.1, p.31-33, 1996.

BARBER, J.S. Canine neosporosis. **Waltham Focus**, v. 8, n.1, 1998.

BARBER, J.S.; TREES, A.J. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. **Veterinary Record**, v. 139, p. 439-443, 1996.

BARBER, J.S.; GASSER R.B.; ELLIS J.; REICHEL M.P.; MCMILLAN D.; TREES, A.J. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. **The Journal of Parasitology**, v. 83, p. 1056-1058, 1997.

BARBOSA, M.V.F.; GUIMARÃES, J.E.; ALMEIDA, M.A.O.; GONDIM, L.F.P.; REGIS, G.B. Frequência de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em soros de cães errantes da cidade de Salvador-Bahia, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 457-465, 2003.

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**, v. 87, n.3, p. 612-618, 2001.

BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M.C.; MOORE, D.P.; RAMBEAU, M.; UNZAGA, J.M.; CAMPERO, C.; BACIGALUPE, D.; DUBEY, J.P. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. **The Journal of Parasitology**, v. 87, p. 906-907, 2001a.

BASSO, W.; VENTURINI, M.C.; BACIGALUPE, D.; KIENAST, M.; UNZAGA, J.M.; LARSEN, A.; MACHUCA, M.; VENTURINI, L. Confirmed clinical *Neospora caninum* infection in a boxer puppy from Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 299-303, 2005.

BELO, M.A.A.; REZENDE, P.C.B.; CASTAGNOLLI, K.C.; BRESCIANI, K.D.S.; COSTA, A.J. Pesquisa de anticorpos anti- *Neospora caninum* em cães criados sob diferentes condições sanitárias. In: **SEMINÁRIO BRASILEIRO DE**

PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11, 1999, Salvador. **Anais...** Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Salvador, 1999, p. 228.

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

BOAVENTURA, C.M.; BASTOS, S.A.; MELO, D.P.G.; SILVA, A.C. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães de Goiânia, Goiás. In: **I FÓRUM BRASILEIRO DE ESTUDOS SOBRE *Neospora caninum***, 2005, São Paulo. **Anais...** São Paulo: C B P V, 2005. p. 52-53.

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

BOYD, S.P.; BARR, P.A.; BROOKS, H.W.; ORR, J.P. Neosporosis in a young dog presenting with dermatitis and neuromuscular signs **Journal of Small Animal Practice**, v. 46, 85–88, 2005.

BRESCIANI, K.D.S.; GENNARI, S.M.; NUNES, C.M.; SERRANO, A.C.M.; MOURA, A.B.; STOBBE, N.S.; PERRI, S.H.V.; COSTA, A.J.; DIAS, R.A. Fatores de risco associados à presença de anticorpos contra *Neospora caninum* em cães de Araçatuba – SP. In: **I FÓRUM BRASILEIRO DE ESTUDOS SOBRE *Neospora caninum***, 2005, São Paulo. **Anais...** São Paulo: C B P V, 2005. p. 35-37.

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

CABRAL, D.D.; MINEO, J.R.; MINEO T.W.P.; COSTA, G.H.N.; VON ANCKEN, A.C.B.; SILVA, D.A.O. Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros de cães positivos e negativos a *Toxoplasma gondii*. In: **SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA**, 11, 1999, Salvador, **Anais...** Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999, p. 226.

CAÑON-FRANCO, W.A.; BERGAMASCHI, D.P.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; SOUZA, S.L.P.; SILVA, J.C.R.; PINTER, A.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of antibodies anti-*Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brasil. **Veterinary Parasitology**, v. 115, p. 71-74, 2003.

CAÑÓN-FRANCO, W. A.; YAI, L.E.O.; SOUZA, S.L.P.; SANTOS, L.C.; FARIAS, N.A.R.; RUAS, J.; ROSSI, F.W.; GOMES, A.A.B.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Detection of antibodies to *Neospora caninum* in two species of wild canids, *Lycalopex gymnocercus* and *Cerdocyon thous* from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.123, p. 275-277, 2004.

CAPELLI, G.; NATALE, A.; NARDELLI, S.; DI REGALBONO, A.F.; PIETROBELLI, M. Validation of a commercially available cELISA test for canine neosporosis against an indirect fluorescent antibody test (IFAT). **Preventive Veterinary Medicine**, v. 73, p. 315-320, 2006.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. Rio de Janeiro: Medsi, 1992, p.757-766.

COSKUN S.Z.; AYDYN L.; BAUER C. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in domestic dogs in Turkey. **Veterinary Record**, v. 146, p. 649, 2000.

CRINGOLI, G.; RINALDI, L.; CAPUANO, F.; BALDI, L.; VENEZIANO, V.; CAPELLI, G. Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* coinfection in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p. 307-313, 2002.

CROOKSHANKS, J.L.; TAYLOR, S.M.; HAINES, D.M.; SHELTON, D. Treatment of canine pediatric *Neospora caninum* myositis following immunohistochemical identification of tachyzoites in muscle biopsies. **Canadian Veterinary Journal**, v. 48, p. 506-508, 2007.

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

DAVIDSON, H.C.; GUY, C.S.; MCGARRY, J.W.; GUY, F.; WILLIAMS, D.J.L.; TREES, A.J. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. **Research in Veterinary Science**, v.70, p. 163-168, 2001.

DIJKSTRA, T.; EYSKER, M.; SCHARES, G.; CONRATHS, F.J.; WOUDA, W.; BARKEMA, H.W. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v.8, p. 747-752, 2001.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis. **Veterinary Clinics of North American Small Animal Practice**, v. 17, p. 1389-1404, 1987.

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

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

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

DUBEY, J. P.; LAPPIN, M. R. Toxoplasmosis and neosporosis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3.ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006. Cap. 80, p.754-775.

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

DUBEY, J.P., CARPENTER, J.L., SPEER, C.A., TOPPER, M.J., UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, p. 1269–1285, 1988.

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, 1988a.

DUBEY, J. P.; KOESTNER, A.; PIPER, R. C. Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.197, p.857-860, 1990.

DUBEY, J.P.; METZGER, F.L.J.; HATTEL, A.L.; LINDSAY, D.S.; FRITZ, D.L. Canine cutaneous neosporosis: clinical improvement with clindamycin. **Veterinary Dermatology**, v. 6, p. 37-43, 1995.

DUBEY, J.P.; DOROUGH, K.R.; JENKINS, M.C.; LIDDELL, S.; SPEER, C.A.; KWOW, O.C.H.; SHEN, S.K. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1293-1304, 1998.

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**, v. 87, p. 345-353, 2001.

DUBEY J.P.; BARR B.C.; BARTA J.R.; BJERKÅS I.; BJÖRKMAN C.; BLAGBURN B.L.; BOWMAN D.D.; BUXTON D.; ELLIS J.T.; GOTTSTEIN B.; HEMPHILL A.; HILL D.E.; HOWE D.K.; JENKINS M.C.; KOBAYASHI Y.; KOUDELA B.; MARSH A.E.; MATTSSON J.G.; MCALLISTER M.M.; MODRÝ D.; OMATA Y.; SIBLEY L.D.; SPEER C.A.; TREES A.J.; UGGLA A.; UPTON S.J.; WILLIAMS D.J.; LINDSAY D.S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 929-946, 2002.

DUBEY, J.P.; ROSS, A.D.; FRITZ, D. Clinical *Toxoplasma gondii*, *Hammondia heydorni* and *Sarcocystis* sp. infections in dogs. **Parassitologia**, v. 45, p. 141-146, 2003a.

DUBEY, J.P.; KNICKMAN, E.; GREENE, C.E. Neonatal *Neospora caninum* infections in dogs. **Acta Parasitologica**, v. 50, p.176–179, 2005.

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

DUBEY, J.P.; VIANNA, M.C.B.; KWOK, O.C.H.; HILL, D.E.; MISKA, K.B.; TUO, W.; VELMURUGAN, G.V.; CONORS, M.; JENKINS, M.C. Neosporosis in Beagle dogs: Clinical signs, diagnosis, treatment, isolation and genetic characterization of *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 158-166, 2007.

FERNANDES, B.C.T.M.; GENNARI, S.M.; SOUZA, S.L.P.; CARVALHO, J.M.; OLIVEIRA, W.G.; CURY, M.C. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 33-40, 2004.

GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R.C. Soroepidemiologia da toxoplasmose em gatos e cães de propriedades rurais do município de Jaguapitã, Estado do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 29, p.99-104, 1999.

GAY, J.M. Neosporosis in dairy cattle: Na update from na epidemiological perspective. **Theriogenology**, v. 66, p. 629-632, 2006.

GENNARI, S.M. *Neospora caninum* no Brasil: situação atual da pesquisa. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 23-28, 2004.

GENNARI, S.M.; YAI, L.E.; D'AURIA, S.N.R.; CARDOSO, S.M.S.; KWOK, O.C.H.; JENKINS, M.C.; DUBEY, J.P. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of São Paulo, Brasil. **Veterinary Parasitology**, v.106, p. 177-179, 2002.

GERMANO, P.M.L.; ERBOLATO, E.B.; ISHIZUKA, M.M. Serological survey of toxoplasmosis in dogs with the Indirect Immunofluorescent test in Campinas city, 1981. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP**, São Paulo, v. 22, p. 53-58, 1985.

GIRALDI, J.H.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; VIDOTTO, O.; TUDURY, E.A.; NAVARRO, I.T.; BATISTA, T.N. Sorologia e histopatologia de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em cães portadores de distúrbios neurológicos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, p.9-14, 2002.

GONDIM, L.F.P. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends in Parasitology**, v. 22, p.247-252, 2006.

GONDIM, L.F.P.; PINHEIRO, A.M.; SANTOS, P.O.M.; JESUS, E.E.V.; RIBEIRO, M.B.; FERNANDES, H.S.; ALMEIDA, M.A.O.; FREIRE, S.M.; MEYER, R.; McALLISTER, M.M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**, v. 101, p. 1-7, 2001.

GONDIM, L.F.P.; GAO, L.; McALLISTER, M.M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. **The Journal of Parasitology**, v. 88, p. 1159-1163, 2002.

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

GONDIM, L.F.P.; McALLISTER, M.M.; GAO, L. Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 134, p. 33-39, 2005.

GUIMARÃES, A.M.; RIBEIRO, M.F.B.; LIMA, J.D. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em cães de Belo Horizonte, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.44, p.67-68, 1992.

GUIMARÃES Jr.; J.S.; SOUSA, S.L.P.; BERGAMASHI, D.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 124, p. 1-8, 2004.

GUIMARÃES Jr.; J.S.; ROMANELLI, P.R. Neosporose em animais domésticos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, p.665-678, 2006.

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

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

HORNOK, S., EDELHOFER, R., FOK, É., BERTA, K., FEJES, P., RÉPÁSI, A., FARKAS, R. Canine neosporosis in Hungary: Screening for seroconversion of household, herding and stray dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 197–201, 2006.

HUANG, C.C.; YANG, C.H.; WATANABE, Y.; LIAO, Y.K.; OOI, H.K. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). **Veterinary Research**, v.35, p. 283-290, 2004.

HURCOVÁ, L.; MODRÝ, D. PCR detection of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in brains of wild carnivores. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 150-154, 2006.

ISHIZUKA, M. M.; YASUDA, P.H. Incidência de infecção por *Toxoplasma gondii* em cães do município de São Paulo. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 18, p. 161-165, 1981.

ISHIZUKA, M. M.; MIGUEL O.; BROGLIATO D.F. Prevalência de anticorpos anti-toxoplasma em soros de cães do município de São Paulo. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.11, p.115-125, 1974.

JACKSON, W.; DeLAHUNTA, A.; ADASKA, J.; COOPER, B.; DUBEY, J.P. *Neospora caninum* in an adult dog with progressive cerebellar signs. **Progress in Veterinary Neurology**, v.6, p. 124-127, 1995.

JESUS, E.E.V.; SANTOS, P.O.M.; BARBOSA, M.V.F.; PINHEIRO, A.M.; GONDIM, L.F.P.; GUIMARÃES, J.E.; ALMEIDA, M.A.O. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães nos municípios de Salvador e Lauro de Freitas, Estado da Bahia – Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p.5-10, 2006.

KIM, J.T.; 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 artemisinin on *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 103, p. 53–63, 2002.

KNOWLER, C.; WHEELER, S.J. *Neospora caninum* infection in three dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 36, p. 172-177, 1995.

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.

LASRI, S.; MEERSCHMAN, F. DE.; RETTIGNER, C.; FOCANT, C.; LOSSON, B. Comparison of three techniques for the serological diagnosis of *Neospora caninum* in the dog and their use for epidemiological studies. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 25-32, 2004.

LINDSAY, D.S.; RIPPEY, N.S.; COLE, R.A.; PARSONS, L.C.; DUBEY, J.P.; TIDWELL, R.R.; BLAGBURN, B.L. Examination of the activities of 43 chemotherapeutic agents against *Neospora caninum* tachyzoites in cultured cells. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, p. 976–981, 1994.

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**, v. 68, p. 35-40, 1997.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; McALLISTER M.M. *Neospora caninum* and the potential for parasite transmission. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 21, p. 317-321, 1999.

LINDSAY, D.S., UPTON, S.J., DUBEY, J.P. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1521-1523, 1999a.

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

LOCATELLI-DITTRICH, R. ; SOCCOL, V.T.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; VINNE, R.; PINCKNEY, R.D. Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in Southern Brazil. **The Journal of Parasitology**, v. 87, n.6, p. 1493-1494. 2001.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; VAN DER VINNE, R.; PINCKNEY, R.D. Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 103-109, 2004.

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, V. 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.

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.

McALLISTER, M.M. Uncovering the biology and epidemiology of *Neospora caninum*. **Parasitology Today**, v. 15, p. 216-217, 1999.

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

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

McGARRY, J.W.; STOCKTON, C.M.; WILLIAMS, D.J.L.; TREES, A.J. Protracted shedding of oocysts of *Neospora caninum* by a naturally infected foxhound. **The Journal of Parasitology**, v. 89, p. 628-630, 2003.

McINNIS, L.M., IRWIN, P., PALMER, D.G., RYAN, U.M. In vitro isolation and characterization of the first canine *Neospora caninum* isolate in Austrália. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 355–363, 2006.

MEIRA SANTOS, P.O.; VIANA DE JESUS, E.E.; PINHEIRO, A.M.; ALMEIDA, M.A.O.; GUIMARÃES, J.E.; SOUZA, R.M.; GONDIM, L.F.P. Frequência de anticorpos contra *Neospora caninum* em cães criados no estado da Bahia. In: **SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA**, 11, Salvador. **Anais...** Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999, p. 228.

MEIRELES, L.R.; GALISTEO, A.J.Jr.; POMPEU, E.; ANDRADE, H.F.Jr. *Toxoplasma gondii* spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs. **Tropical Medicine and International Health**, v.9, p.876-881, 2004.

MELO, C.B.; LEITE, RÔMULO.C.; LEITE, ROMÁRIO.C. Infecção por *Neospora caninum* em cães e outros carnívoros. **Revista CFMV**, n.35, p. 32-42, 2005.

MINEO, T.W.P.; SILVA, D.A.O.; COSTA, G.H.N.; VON ANCKEN, A.C.B.; KASPER, L.H.; SOUZA, M.A.; CABRAL, D.D.; COSTA, A.J.; MINEO, J.R. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.98, p. 239-245; 2001.

MOORE, D.P. Neosporosis in South America. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 87-97, 2005.

MORAES, C.C.G.; MEGID, J.; PITUCO, E.M.; OKUDA, L.H.; DEL FAVA, C.; STEFANO, E. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães da microrregião da Serra de Botucatu, Estado de São Paulo. In: **I FÓRUM BRASILEIRO DE ESTUDOS SOBRE *Neospora caninum***, 2005, São Paulo. *Anais...* São Paulo: C B P V, 2005. p. 49-50.

MORETTI, L.; UENO, T.E.; RIBEIRO, M.G.; AGUIAR, D.M.; PAES, A.C.; PEZERICO, S.B.; SILVA, A.V. Toxoplasmose em cães co-infectados com o vírus da cinomose. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, p. 85-91, 2002.

MORETTI, L.; DA SILVA, A.V.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii* genotyping in a dog co-infected with distemper virus and ehrlichiosis rickettsia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, p. 359-363, 2006.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une protozoaire nouveau du *gondii*, *Toxoplasma*. **Archives de l'Institut Pasteur de Tunis**, v. 2, p. 216-218, 1909.

ODIN, M.; DUBEY, J.P. Sudden death associated with *Neospora caninum*-*myocarditis* in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 203, p. 831-833, 1993.

ORTOLANI, E.S.; GENNARI, S.M.; PINHEIRO, S.R.; RODRIGUES, A.A.R.; CHIEBAO, D.P.; SOARES, R.M. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em populações animais das aldeias indígenas Krucutu e Morro da Saudade, no município de São Paulo, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v.12, p.25-28, 2005.

ORTUNO, A.; CASTELLA, J.; ALMERIA, S. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Spain. **The Journal of Parasitology**, v. 88, p. 1263-1266, 2002.

PARADIES, P.; CAPELLI, G.; TESTINI, G.; CANTACESSI, C.; TREES, A.J.; OTRANTO, D. Risk factors for canine neosporosis in farm and kennel dogs in southern Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 240-244, 2007.

PARE, J.; FECTEAU, G.; FORTIN, M.; MARSOLAIS, G. Seroepidemiology study of *Neospora caninum* in dairy herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, p. 1595-1598, 1998.

PASQUALI, P.; MANDARA, M.T.; ADAMO, F.; RICCI, G.; POLIDORI, G.A.; DUBEY, J.P. Neosporosis in a dog in Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 77, p. 297-299, 1998.

PATITUCCI, A.N.; ALLEY, M.R.; JONES, B.R.; CHARLESTON, W.A. Protozoal encephalomyelitis of dogs involving *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 45, p. 231-235, 1997.

PATITUCCI, A.N.; PÉREZ, M.J.; ROZAS, M.A.; ISRAEL, K.F. Neosporosis canine: detection of sera antibodies in rural and urban canine population of Chile. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 33, p. 227-232, 2001.

PERL, S.; HARRUS, S.; SATUCHNE, C.; YAKOBSON, B.; HAINES, D. Cutaneous neosporosis in a dog in Israel. **Veterinary Parasitology**, v.79, p.257-261, 1998.

PETERS, M.; WAGNER, F.; SCHARES, G. Canine neosporosis: clinical and pathological findings and first isolation of *Neospora caninum* in Germany. **Parasitological Research**, v. 86, p. 1-7, 2000.

PIPER, R.C.; CLOE, C.R.; SHAFFUCK, J.A. Natural and experimental ocular toxoplasmosis in animals. **American Journal of Ophthalmology**, v.69, p.662-668, 1970.

POLI, A.; MANCIANTI, F.; CARLI, M. A.; STROSCIO, M. C.; KRAMER, L. *Neospora caninum* infection in a Bernese cattle dog from Italy. **Veterinary Parasitology**, v.78, p.79-85, 1998.

PUMAROLA, M.; AÑOR, S.; RAMIS, A. J.; BORRAS, D.; GORRAIZ, J.; DUBEY, J.P. *Neospora caninum* infection in a Napolitan mastiff dog from Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 64, p. 315–317, 1996.

RASMUSSEN, K.; JENSEN, A.L. Some epidemiologic features of canine neosporosis in Denmark. **Veterinary Parasitology**, v. 62, p. 345–349, 1996.

REICHEL M.P.; THORTON R.N.; MORGAN P.L.; MILLS R.J.M.; SCHARES G. Neosporosis in a pup. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 46, p.106-110, 1998.

RODRIGUES, A.A.R.; GENNARI, S.M.; AGUIAR, D.M.; SREEKUMAR, C.; HILL, D.E.; MISKA, K.B.; VIANNA, M.C.B.; DUBEY, J.P. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 124, p. 139-150, 2004.

ROMANELLI, P.R.; FREIRE, R.L.; VIDOTTO, O.; MARANA, E.R.M.; OGAWA, L.; DEPAULA, V.S.O.; GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 82, p. 202-207, 2007.

ROSYPAL, A.C.; LINDSAY, D.S. The sylvatic cycle of *Neospora caninum*: where do we go from here? **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 439-440, 2005.

RUEHLMANN D., PODELL M., OGLESBEE M., DUBEY JP. Canine neosporosis: a case report and literature review. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 31, p. 174 –183, 1995.

SALATA, E., YOSHIDA, E.L.A., PEREIRA, E.A., CORRÊA, F.M.A. Toxoplasmose em animais silvestres e domésticos da região de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 27, p. 20-22, 1985.

SÁNCHEZ, G.F.; MORALES, S.E.; MARTINEZ, M.J.; TRIGO, J.F. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. **Can Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 67, p. 142-145, 2003.

SAWADA, M.; PARK, C.H.; KONDO, H.; MORITA, T.; SHIMADA, A.; YAMANE, I.; UMEMURA, T. Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60, p. 853-854, 1998.

SCHARES, G.; PETERS, M.; WURM, R.; BARWAKD, 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.

SCHARES, G., HEYDORN, A.O., CÜPPERS, A., CONRATHS, F.J., MEHLHORN, H. *Hammondia heydorni*-like oocysts shed by a naturally infected dog and *Neospora caninum* NC-1 cannot be distinguished. **Parasitology Research**, v. 87, p. 808-816, 2001.

SCHARES, G.; PANTCHEV, N.; BARUTZKI, D.; HEYDORN A.O.; BAUER, C.; CONRATHS, F.J. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 1525-1537, 2005.

SILVA, D.A.O.; CABRAL, D.D.; BERNARDINA, B.L.D.; SOUZA, M.A.; MINEO, J.R. Detection of *Toxoplasma gondii*-specific antibodies in dogs. A comparative study of Immunoenzymatic, Immunofluorescent and Haemagglutination titers. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 785-789, 1997.

SLAPETA, J.R.; MODRÝ, D.; KYSELOVÁ, I.; HOREJS, R.; LUKES, J.; KOUDELA, B. Dogs shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 157-167, 2002.

SOUZA, S.L.P.; GUIMARÃES, J.S.; Jr.; FERREIRA, F.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Parana. **The Journal of Parasitology**, v. 88, p. 408-409, 2002.

SOUZA, S.L.P.; YAY, L.E.O.; GENNARI, S.M.; D'AURIA, S.R.N.; CARDOSO, S.M.S.; GUIMARÃES Jr, J.S.; DUBEY, J.P. Occurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from dogs of the urban and rural areas from Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, p. 101-103, 2003.

TARLOW, J.M.; RUDLOFF, E.; LICHTENBERGER, M.; KIRBY, R.; Emergency presentations of 4 dogs with suspected neurologic toxoplasmosis. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.15, p. 119-127, 2005.

TEIXEIRA, W.C.; SILVA, M.I.S.; PEREIRA, J.G.; PINHEIRO, A.M.; ALMEIDA, M.A.O, GONDIM, L.F.P. Frequência de cães reagentes para *Neospora caninum* em São Luís, Maranhão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 685-687, 2006.

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p.1217-1258, 2000.

THOMAS, W.B. Inflammatory diseases of the central nervous system in dogs. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 13, p. 167-178, 1998.

TREES, A.J.; DAVISON, H.C.; INNES, E.A.; WASTLING, J.M. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p.1195-1200, 1999.

UCHÔA, C.M.A.; DUARTE, R.; LAURENTINO-SILVA, V.; ALEXANDRE, G.M.C.; FERREIRA, H.G.; AMENDOEIRA, M.R.R. Padronização de ensaio imunoenzimático para pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG anti-*Toxoplasma gondii* e comparação com a técnica de Imunofluorescência Indireta. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 661-669, 1999.

VÁCLAVEK, P.; SEDLÁK, K.; HURKOVÁ, L.; VODRÁZKA, P.; SEBESTA, R.; KOUDELA, B. Serological survey of *Neospora caninum* in dogs in the Czech Republic and a long-term study of dynamics of antibodies. **Veterinary Parasitology** v. 143, p. 35–41, 2007.

VARANDAS, N.P.; RACHED, P.A.; COSTA, G.H.N.; SOUZA, L.M.; CASTAGNOLLI, K.C.; COSTA, A.J. Freqüência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em cães da região nordeste do Estado de São Paulo. Correlação com neuropatias. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, p. 105-111, 2001.

VITALIANO, S.N., SILVA, D.A.O., MINEO, T.W.P., FERREIRA, R.A., BEVILACQUA, E., MINEO, J.R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *N. caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from southeastern and midwestern regions of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 122, p. 253-260, 2004.

YAI, L.E.O.; CAÑON-FRANCO, W.A.; GERALDI, V.C.; SUMMA, M.E.L.; CAMARGO, M.C.G.O.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) from the city of São Paulo, Brazil. **The Journal of Parasitology**, v. 89, p. 870-871, 2003.

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**, v. 116, p. 7–14, 2003.

WANHA, K.; EDELHOFER, R.; GABLER-EDUARDO, C.; PROSL H. Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs and foxes in Austria. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 189–193, 2005.

WOUDA, W.; DIJKSTRA, Th.; KRAMER, A.M.H.; VAN MAANEN, C.; BRINKHOF, J.M.A. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1677-1682, 1999.

CAPÍTULO I

PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum* E ANTI-*Toxoplasma gondii* EM CÃES COM SINAIS NEUROLÓGICOS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL

PREVALENCE OF ANTI-*Neospora caninum* AND ANTI-*Toxoplasma gondii* ANTIBODIES IN DOGS WITH NEUROLOGICAL SIGNS IN THE CITY OF CURITIBA AND ITS METROPOLITAN AREA, PARANÁ STATE – BRAZIL

RESUMO

Este trabalho objetivou verificar a presença de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em cães com sinais neurológicos e constatar a importância destes protozoários na etiologia das doenças neurológicas caninas. Foram coletadas 147 amostras de sangue, sendo 127 de animais domiciliados, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná (HV-UFPR) e em clínicas veterinárias da cidade de Curitiba, e 20 de cães errantes recebidos nos Centros de Controle de Zoonoses (CCZ) de Pinhais, São José dos Pinhais e na Associação do Amigo Animal, localizados em regiões metropolitanas de Curitiba. As amostras foram analisadas pela reação de imunofluorescência indireta, na diluição de corte 1:50 (RIFI \geq 50). Das 147 amostras obtidas, 17 (11,56%) foram soropositivas para *N. caninum*, 31 (21,08%) foram soropositivas para *T. gondii* e 04 (2,72%) foram soropositivas para ambos os protozoários. A maior prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* ocorreu nos cães da Associação Amigo Animal (80%) e de anticorpos anti-*N. caninum* nos cães do CCZ de Pinhais (42,86%). Analisando a titulação dos animais soropositivos, 54,83% (17/31) e 41,18% (07/17) tiveram títulos \geq 1:200 para anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum*, respectivamente. Diferença significativa foi observada para soropositividade à *T. gondii* ($P \leq 0,05$) entre cães domiciliados e cães errantes e em amostras obtidas de cães do HV-UFPR e da Associação do Amigo Animal.

Palavras-chave: *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, cães, sinais neurológicos, Paraná

ABSTRACT

The aim of this study was to verify the presence of anti-*Neospora caninum* and anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dogs with neurological signs and to confirm the importance of these protozoa in the etiology of neurological diseases in dogs. 147 blood samples were collected, 127 being from domiciled dogs, examined at the Veterinary Teaching Hospital of the Federal University of Paraná (HV-UFPR) and in private veterinary clinics of Curitiba city, and 20 from stray dogs taken in the Zoonosis Control Centers (CCZ) in Pinhais and São José dos Pinhais and at the Non-Governmental Organization “Amigo Animal”, situated in Curitiba’s Metropolitan Area. The samples were analyzed by an indirect fluorescent antibody test (IFAT), at a dilution of 1:50 (IFAT \geq 50). From the total of 147 dogs, 17 (11,56%) were seropositive for *N. caninum*, 31 (21,08%) were seropositive for *T. gondii* and 04 (2,72%) were seropositive for both protozoa. The highest prevalence of anti-*T.gondii* antibodies was found in dogs from the Non-Governmental Organization “Amigo Animal” (80%), and of anti-*N. caninum* antibodies in dogs from CCZ-Pinhais (42,86%). Analyzing the seropositive animals titration, 54,83% (17/31) and 41,18% (07/17) showed \geq 1:200 titres for anti-*T. gondii* and anti-*N. caninum* antibodies, respectively. A significant difference was observed in the seropositivity for *T. gondii* ($P \leq 0,05$) in the samples obtained from dogs from the HV-UFPR and from the Non-Governmental Organization “Amigo Animal” and between domiciled and stray dogs.

Key-words: *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, dogs, neurological signs, Paraná

1 INTRODUÇÃO

As doenças neurológicas causadas por protozoários são pouco diagnosticadas em cães e a maioria dos casos descritos atribui-se à *Toxoplasma gondii*.

A toxoplasmose no cão é de difícil diagnóstico, já que a enfermidade em geral manifesta-se em caráter crônico, decorrente da alta infectividade e baixa patogenicidade do parasita. Quando a doença clínica ocorre nesta espécie, normalmente está associada ao vírus da cinomose ou outra condição imunossupressora (MORETTI *et al.*, 2002; DUBEY *et al.*, 2003a; MORETTI *et al.*, 2006), que predispõe à multiplicação intracelular do protozoário, causando destruição e morte tecidual (DUBEY e LAPPIN, 2006). Vários autores já demonstraram por meio de estudos sorológicos e histopatológicos que a infecção por *T. gondii* está difundida entre os cães no Brasil (ISHIZUKA *et al.*, 1974; ISHIZUKA e YASUDA, 1981; SALATA *et al.*, 1985; GUIMARÃES *et al.*, 1992; GIRALDI *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2003, ORTOLANI *et al.*, 2005) e os resultados de soroprevalência têm evidenciado grande número de cães infectados pelo protozoário.

O primeiro relato de neosporose canina foi feito em 1984 por BJERKAS e colaboradores, em filhotes da raça Boxer que desenvolveram uma progressiva e fatal doença neurológica com paresia (BARBER E TREES, 1996). Desde o isolamento de *Neospora caninum* por DUBEY e colaboradores em 1988, casos de neosporose em cães têm sido relatados em vários países do mundo, inclusive no Brasil (GONDIM *et al.*, 2001).

Este trabalho objetivou determinar a soropositividade a anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* em cães com sinais neurológicos, investigar a participação destes protozoários na etiologia da doença e verificar a importância da inclusão da neosporose e da toxoplasmose no diagnóstico diferencial dos distúrbios neurológicos caninos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

No período de março de 2006 a março de 2007 foram coletadas 147 amostras de sangue de cães que apresentavam diferentes sinais neurológicos. As amostras foram obtidas de animais domiciliados, atendidos na rotina do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná (HV-UFPR) e em clínicas veterinárias localizadas em Curitiba (127 cães); de animais errantes oriundos da região metropolitana da cidade, recolhidos nos Centros de Controle de Zoonoses dos municípios de Pinhais (07 cães) e São José dos Pinhais (08 cães), na ONG Associação do Amigo Animal (05 cães), localizada em Campo Magro. Todos os animais apresentavam um ou mais sinais neurológicos que incluíram convulsões, paresia ou paralisia de membros torácicos e/ou pélvicos, ataxia, mudança de comportamento, alterações sensoriais, alterações oculares, entre outros. Os cães eram de várias idades, ambos os sexos, diferentes raças e provenientes de várias regiões de Curitiba e área metropolitana. Todos os animais foram registrados em formulário individual contendo informações relevantes à pesquisa.

2.2 COLETA DE SANGUE E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue total foram obtidas por venopunção jugular ou cefálica nos animais atendidos no HV-UFPR, clínicas veterinárias e ONG Associação do Amigo Animal. A punção intracardíaca foi realizada em cães previamente anestesiados que seriam submetidos à eutanásia nos Centro de Controle de Zoonoses dos municípios de São José dos Pinhais e Pinhais. As amostras foram acondicionadas em tubos sem anticoagulante e o soro foi separado em alíquotas após centrifugação a 3.500 rpm durante 10 minutos, armazenado e congelado à -20°C até a realização das análises sorológicas.

2.3 REAÇÃO DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

O método da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) foi utilizado na detecção de anticorpos IgG anti-*N. caninum* e anti-*T.gondii* no soro dos animais. As lâminas foram preparadas com taquizoítas de *N. caninum* da cepa NC-1 e com taquizoítas de *T. gondii* da cepa RH, ambas obtidas de cultivo celular *in vitro*. As amostras de soro foram diluídas na titulação inicial de 1:50 em solução tampão fosfatada (PBS pH 7,2) e testadas até a obtenção do título final. A técnica foi realizada de acordo com LOCATELLI-DITTRICH *et al.* (2006), com utilização de anticorpo conjugado com fluoresceína anti-cão (Sigma®). Os soros-controle negativo e positivo foram utilizados em cada lâmina analisada. Apenas as reações com completa fluorescência periférica dos taquizoítas foram consideradas positivas. Aquelas em que a fluorescência compreendeu apenas uma porção do taquizoíta foram consideradas negativas (fluorescência apical).

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste empregado para análise estatística da comparação de proporção entre o número de amostras positivas e o número total de amostras estudadas nos diferentes grupos foi Fisher-Exact-Test. Foram considerados resultados significativos quando $P \leq 0,05$.

3 RESULTADOS

Das 147 amostras analisadas, 52 (35,37%) foram soropositivas para *N. caninum* e/ou *T. gondii* na RIFI, sendo 17 (11,56%) soropositivas para *N. caninum*, 31 (21,08%) soropositivas para *T. gondii* e 04 (2,72%) soropositivas para ambos os protozoários.

Analisando separadamente as 127 amostras colhidas dos animais domiciliados, atendidos no HV-UFPR e em clínicas veterinárias de Curitiba, 14

(11,02%) foram soropositivas para *N. caninum*, 23 (18,11%) foram soropositivas para *T. gondii* e 02 (1,57%) foram soropositivas para *N. caninum* e *T. gondii*. Nas 08 amostras colhidas de cães errantes do CCZ de São José dos Pinhais, não houve soropositividade detectada exclusivamente para *N. caninum*, porém 01 cão (12,50%) foi soropositivo para *T. gondii* e 01 cão (12,50%) foi soropositivo para os dois protozoários. Todas as 07 amostras obtidas de cães errantes do CCZ de Pinhais foram soropositivas, sendo 03 (42,86%) para *N. caninum*, 03 (42,86%) para *T. gondii* e 01 (14,28%) para *N. caninum* e *T. gondii*. Das 05 amostras obtidas da Associação do Amigo Animal, 04 (80%) foram soropositivas para *T. gondii* e nenhuma para *N. caninum*. Diferença significativa foi observada entre as amostras coletadas de cães do HV-UFPR e da ONG Associação do Amigo Animal para a presença de anticorpos anti-*T. gondii* ($P \leq 0,05$). Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos das demais regiões analisadas (TABELA 5).

TABELA 5 - PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum* E ANTI-*Toxoplasma gondii* DETECTADOS PELA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI ≥ 50) EM SOROS DE CÃES COM SINAIS NEUROLÓGICOS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL

REGIÃO	CÃES	SOROPOSITIVO		SOROPOSITIVO		SOROPOSITIVO	
		<i>N. caninum</i>		<i>T. gondii</i>		<i>N. caninum</i> e <i>T. gondii</i>	
		Total	%	Total	%	Total	%
HV-UFPR/Clínicas	127	14	11,02	23	18,11a	02	1,57
CCZ São José dos Pinhais	08	00	00,00	01	12,50 ab	01	12,50
CCZ Pinhais	07	03	42,86	03	42,86 ab	01	14,28
ONG Amigo Animal	05	00	00,00	04	80,00b	00	00,00
Total	147	17	11,56	31	21,08	04	2,72

Diferentes letras na coluna: $P \leq 0,05$

Método sorológico: RIFI ($\geq 1:50$).

Comparando os animais de acordo com o tipo de criação, cães domiciliados apresentaram 11,02% (14/127) e 18,11% (23/127) de prevalência para anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii*, respectivamente. Nos cães errantes, houve prevalência de 15,00% (3/20) para *N. caninum* e 40,00% (8/20) para *T. gondii*. A soropositividade encontrada para ambos os protozoários foi de 1,57% em cães domiciliados e 10,00% em cães errantes, conforme TABELA 6. Diferença

significativa entre animais domiciliados e errantes foi observada para a presença de anticorpos anti-*T. gondii* ($P \leq 0,05$). Não houve diferença significativa entre soropositivos para *N. caninum* e para ambos os protozoários comparando cães dos dois diferentes tipos de criação ($P > 0,05$).

TABELA 6 - PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum* E ANTI-*Toxoplasma gondii* DETECTADOS PELA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA EM SOROS DE CÃES COM SINAIS NEUROLÓGICOS ERRANTES E DOMICILIADOS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL

TIPO DE CRIAÇÃO	CÃES	SOROPOSITIVO		SOROPOSITIVO		SOROPOSITIVO	
		<i>N. caninum</i>		<i>T. gondii</i>		<i>N. caninum</i> e <i>T. gondii</i>	
		Total	%	Total	%	Total	%
Domiciliado	127	14	11,02	23	18,11a	02	1,57
Errante	20	03	15,00	08	40,00b	02	10,00
Total	147	17	11,56	31	21,08	04	2,72

Diferentes letras na coluna: $P \leq 0,05$
Método sorológico: RIFI ($\geq 1:50$).

As titulações mais encontradas nas amostras analisadas foram 1:50 para *N. caninum* (47,06% dos cães) e 1:200 para *T. gondii* (32,26% dos cães). Os títulos obtidos nos animais soropositivos estão especificados na TABELA 7.

TABELA 7 - SOROPREVALÊNCIA DE NEOSPOROSE E TOXOPLASMOSE EM CÃES COM SINAIS NEUROLÓGICOS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA, CONFORME TITULAÇÃO, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL

	Titulações				
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
<i>Neospora caninum</i>					
Soropositivos n=17	8	2	4	0	3
Prevalência do grupo (%)	47,06	11,76	23,53	0	17,65
<i>Toxoplasma gondii</i>					
Soropositivos n=31	8	6	10	2	5
Prevalência do grupo (%)	25,80	19,35	32,26	6,45	16,13
<i>T. gondii</i> e <i>N. caninum</i>					
Soropositivos n=4	3	0	1	0	0
Prevalência do grupo (%)	75,00	0	25,00	0	0

Método sorológico: RIFI

Nas TABELAS 8 e 9 estão descritos os principais sinais neurológicos observados nos cães soropositivos, de acordo com o título final de anticorpos obtido pela RIFI.

TABELA 8 - SINAIS CLÍNICOS OBSERVADOS EM CÃES SOROPOSITIVOS PARA *Neospora caninum* NAS DIFERENTES TITULAÇÕES, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL

SINAIS CLÍNICOS	TITULAÇÃO				
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
Paresia/Paralisia	5	0	1	0	2
Convulsão	5	2	5	0	1
Alteração de comportamento	1	0	1	0	0
Ataxia	4	0	4	0	0
Alterações oculares	0	1	0	0	0
Alterações sensoriais	0	0	0	0	0

Método sorológico: RIFI

TABELA 9 – SINAIS CLÍNICOS OBSERVADOS EM CÃES SOROPOSITIVOS PARA *Toxoplasma gondii* NAS DIFERENTES TITULAÇÕES, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL

SINAIS CLÍNICOS	TITULAÇÃO				
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
Paresia/Paralisia	4	1	4	1	2
Convulsão	6	1	4	1	2
Alteração de comportamento	0	0	1	0	1
Ataxia	6	2	4	1	1
Alterações oculares	0	0	0	0	0
Alterações sensoriais	1	0	1	0	1

Método sorológico: RIFI

4 DISCUSSÃO

As doenças do sistema nervoso central, associadas com infecção por parasitas apicomplexas têm grande impacto tanto nos animais como em seres humanos (CARRUTHERS, 2006). *Sarcocystis neurona*, *Sarcocystis canis*, *T. gondii* e *N. caninum* são responsáveis por doenças sistêmicas em várias espécies animais, incluindo o cão (DUBEY *et al.*, 2001; DUBEY, 2003; DUBEY *et al.*, 2006).

A neosporose e toxoplasmose são doenças clinicamente similares (THOMAS, 1998) que podem levar ao aparecimento de distúrbios neuromusculares em cães. Os sinais clínicos variam de acordo com o órgão e tecidos parasitados (JACKSON *et al.*, 1995; DUBEY, 2003) e muitas vezes não são diagnosticados corretamente. A manifestação clínica de toxoplasmose canina normalmente ocorre concomitante ou é predisposta pela infecção pelo vírus da cinomose ou outra condição imunossupressora (BRITO *et al.*, 2002; DUBEY *et al.*, 2003a; MORETTI *et al.*, 2006). Entretanto, *T. gondii* pode ser considerado em alguns casos como patógeno primário nos cães (HASS *et al.*, 1989; GIRALDI *et al.*, 2002, TARLOW *et al.*, 2005), assim como *N. caninum* (LeCOUTER e GRANDY, 2000).

Neospora caninum é um protozoário que inicialmente foi confundido com *T. gondii* devido às características semelhantes entre ambos os parasitas e a similaridade dos sinais clínicos observados nas duas infecções. Desde a identificação de *N. caninum* (DUBEY *et al.*, 1988), casos de neosporose canina têm sido descritos em países do mundo inteiro (KNOWLER AND WHEELER, 1995; PUMAROLA *et al.*, 1996; PASQUALI *et al.*, 1997; PETERS *et al.*, 2000; BASSO *et al.*, 2005; DUBEY *et al.*, 2005, CROOKSHANKS *et al.*, 2007), porém ainda são poucos estudos correlacionando a presença de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* em cães que apresentam alterações neurológicas. A grande maioria dos relatos de *N. caninum* descreve a prevalência de anticorpos em cães saudáveis, indicando que o protozoário está presente nas regiões estudadas (RASMUSSEN E JENSEN, 1996; BARBER *et al.*, 1997; SAWADA *et al.*, 1998; COSKUN *et al.*, 2000; BASSO *et al.*, 2001; PATITUCCI *et al.*, 2001; CRINGOLI *et al.*, 2002; ORTUNO *et al.*, 2002; SÁNCHEZ *et al.*, 2003; WANHA *et al.*, 2005; HORNOK *et al.*, 2006; PARADIES *et al.*, 2007; VÁCLAVEK *et al.*, 2007). No Brasil, anticorpos anti-*N. caninum* já foram detectados em vários Estados, como São Paulo (BELO *et al.*,

1999; BRESCIANI *et al.*, 2005; MORAES *et al.*, 2005), Minas Gerais (FERNANDES *et al.*, 2004), Rondônia (CAÑON-FRANCO *et al.*, 2003; AGUIAR *et al.*, 2006), Paraíba (AZEVEDO *et al.*, 2005), Goiás (BOAVENTURA *et al.*, 2005), Bahia (JESUS *et al.*, 2006), Maranhão (TEIXEIRA *et al.*, 2006), Mato Grosso do Sul (ANDREOTTI *et al.*, 2006) e Paraná (SOUZA *et al.*, 2002; GUIMARÃES JR. *et al.*, 2004; ROMANELLI *et al.*, 2007), demonstrando que o protozoário está amplamente distribuído no país. O primeiro isolamento de *N. caninum* no Brasil foi realizado de um cão de sete anos da raça Collie, que apresentava incoordenação e paresia de membros (GONDIM *et al.*, 2001).

Igualmente, a maioria das pesquisas com toxoplasmose canina relatam a prevalência de anticorpos em cães de diferentes regiões (ISHIZUKA *et al.*, 1974; ISHIZUKA E YASUDA, 1981; GERMANO *et al.*, 1985, FREIRE *et al.*, 1992; GUIMARÃES *et al.*, 1992; GARCIA *et al.*, 1999) ou descreve casos de infecção natural ou experimental do parasita (PIPER *et al.*, 1970; ABREU *et al.*, 2002; GIRALDI *et al.*, 2002; MORETTI *et al.*, 2002).

Neste estudo, dos 147 cães com sinais neurológicos analisados, 17 (11,56%) foram soropositivos para *N. caninum*, 31 (21,08%) foram soropositivos para *T. gondii* e 04 (2,72%) foram soropositivos para ambos os protozoários. GIRALDI e colaboradores (2002) realizaram estudo semelhante em Londrina – Paraná, com 31 cães que apresentavam distúrbios neurológicos. A prevalência encontrada para anticorpos anti-*T. gondii* (35,4%) foi maior do que a obtida nesta pesquisa, porém nenhum cão foi soropositivo para *N. caninum*, provavelmente pela origem urbana dos animais. VARANDAS *et al.* (2001) analisaram 58 cães com alterações nervosas, encontrando presença de anticorpos para *T. gondii* em 24 animais (41,3%) e de anticorpos para *N. caninum* em 04 (6,89%) animais.

Analisando os resultados das amostras de cães errantes obtidas neste estudo, a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* encontrada foi de 40% (8/20) e 15% (3/20), respectivamente. Nas amostras de cães domiciliados, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná (HV-UFPR) e em clínicas veterinárias da cidade de Curitiba, observou-se prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* em 18,11% (23/127) e 11,02% (14/127) dos animais, respectivamente.

Nas pesquisas com *T. gondii*, a maioria dos resultados no Brasil demonstra prevalência mais elevada do que as encontradas neste estudo. ISHIZUKA e

colaboradores (1974) e ISHIZUKA e YASUDA (1981) demonstraram em cães de São Paulo, soropositividade em 72% e 63,8%, respectivamente. BARBOSA e colaboradores (2003) realizaram estudo com 225 cães errantes da cidade de Salvador, Bahia, encontrando freqüência de anticorpos anti-*T. gondii* em 63,55% das amostras analisadas. FREIRE *et al.* (1992) e GUIMARÃES *et al.* (1992) encontraram 75,98% e 47,30% de cães soropositivos atendidos nos Hospitais Veterinários das Universidades Estadual de Londrina e Federal de Minas Gerais, respectivamente. GARCIA *et al.* (1999) obtiveram 84,10% de soroprevalência em cães da zona rural do município de Jaguapitã, Paraná. A prevalência encontrada para *T. gondii* neste estudo é consideravelmente mais baixa que a encontrada por outros autores brasileiros provavelmente devido à linha de corte utilizada na RIFI. A grande maioria das pesquisas considera positivos animais com títulos a partir de 1:16 e neste estudo a linha de corte utilizada foi 1:50.

Nas pesquisas realizadas com *N. caninum*, resultados próximos aos encontrados neste estudo foram obtidos por JESUS e colaboradores (2006), que observaram freqüência de anticorpos anti-*N. caninum* em 11,2% dos cães errantes e em 13,3% dos cães domiciliados dos municípios de Lauro de Freitas e Salvador, no Estado da Bahia, sem diferença significativa entre os dois tipos de criação. Entretanto, os resultados de GENNARI *et al.* (2002) indicaram maiores chances de um cão de rua se infectar com *N. caninum*.

Analisando-se cães com sinais neurológicos domiciliados e errantes, diferença significativa foi observada para presença de anticorpos anti-*T. gondii* ($P \leq 0,05$) comparando-se os cães dos dois diferentes tipos de criação, demonstrando que o acesso à rua pode ser um fator de risco para a infecção pelo protozoário. Conclusões semelhantes foram obtidas por SOUZA e colaboradores (2003) e por SVOBODA AND SVOBODOVÁ (1987), que demonstraram que a presença de anticorpos anti-*T. gondii* é significativamente menos freqüente em cães domiciliados. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) para soropositividade à *N. caninum* e para soropositividade a ambos os protozoários simultaneamente, analisando cães domiciliados e de rua. Este resultado difere do encontrado por AZEVEDO *et al.* (2005) em cães de Campina Grande, que evidenciou soroprevalência menor à *N. caninum* em animais que permanecem exclusivamente em ambiente doméstico.

A maior prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em cães com sinais neurológicos obtida nesse estudo (80%) foi em cães da ONG Associação do Amigo

Animal. A grande maioria dos animais que vivem neste local, incluindo cães e gatos, foi capturada da rua, o que pode ter sido responsável pela alta prevalência de anticorpos (SOUZA *et al.*, 2003; SVOBODA AND SVOBODOVÁ, 1987). A elevada soropositividade dos cães oriundos da ONG pode ter sido também resultado do tratamento utilizado nos animais que chegam ao abrigo com a suspeita de cinomose. Sabe-se que corticóides sistêmicos tem uso limitado na toxoplasmose, sendo indicado apenas quando associado ao tratamento específico da doença e na presença de reação inflamatória importante (FINAMOR *et al.*, 2002). A toxoplasmose clínica é favorecida por condições imunossupressoras, incluindo a terapia com glicocorticóides e a infecção pelo vírus da cinomose (DUBEY e LAPPIN, 2006). Outro fator que pode ter influenciado na soropositividade encontrada é a convivência com gatos no mesmo ambiente. Embora esta espécie permaneça alojada em uma área separada dos cães, uma contaminação ambiental pela presença de oocistos eliminados nas fezes de gatos imunossuprimidos pode ter sido possível, o que facilitaria a infecção dos cães que transitam livremente pelo local. Entretanto, torna-se necessário um estudo epidemiológico mais aprofundado para se determinar quais os fatores de risco associados à alta prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* nesta determinada área estudada, com um número de amostras mais significativo do que a utilizada nessa pesquisa.

Nas amostras obtidas de cães errantes com sinais neurológicos de Pinhais, houve 42,86% (03/07) de soropositividade para *T. gondii* e 42,86% (03/07) de soropositividade para *N. caninum*. A maioria dos cães foi encaminhada ao Centro de Controle de Zoonoses do município de Pinhais com a suspeita de cinomose, pela presença de distúrbios nervosos. Isto reforça a justificativa de que a sorologia para toxoplasmose e neosporose deve ser realizada em cães com alterações no sistema nervoso central, mesmo quando há uma grande suspeita de cinomose, devido aos sinais clínicos associados às doenças serem indistinguíveis (MORETTI *et al.*, 2006).

Anticorpos para ambos os coccídios foram observados em 2,72% (04/147) dos animais analisados nessa pesquisa. Resultados semelhantes também foram observados por VARANDAS e colaboradores (2001), que encontraram 17 dos 295 cães (5,76%) sendo soropositivos para *T. gondii* e *N. caninum* simultaneamente. RESENDE *et al.* (1999), MINEO *et al.* (2001) e WANHA *et al.* (2005) também obtiveram resultados de sorologia positiva para ambos os protozoários, com índices de 16,27%, 3,1% e 1,7% respectivamente.

Neospora caninum e *T. gondii* possuem muitos antígenos semelhantes, porém a RIFI parece ser bem específica na detecção dos anticorpos. No entanto, vários fatores como o conjugado, tampão e o padrão de fluorescência utilizados são muito importantes na avaliação da especificidade do teste sorológico (DUBEY e LINDSAY, 1996). Os anticorpos não específicos que produzem fluorescência reduzida e conseqüentemente reação cruzada são desconhecidos. Segundo DUBEY e LINDSAY (1996), reação cruzada entre os dois protozoários na diluição 1:100 pela IFAT não tem sido observada. Neste estudo, 03 cães apresentaram títulos de 1:50 para *N. caninum* e *T. gondii*, porém 01 cão apresentou soropositividade para ambos os protozoários com título 1:200. A titulação obtida nessa amostra pode ser indicativa de infecção simultânea por *N. caninum* e *T. gondii* neste animal.

Altos títulos (1:800) foram encontrados em 17,65% (3/17) e 16,13% (5/31) dos cães, para *N. caninum* e *T. gondii* respectivamente. Os principais sinais clínicos observados nestes animais foram paresia/paralisia de membros pélvicos e convulsão. No diagnóstico de rotina da neosporose em cães, o soro é analisado na diluição de 1:50 na RIFI, embora os cães com sinais clínicos de neosporose geralmente apresentem um título \geq 1:400 de IgG. Os significados dos resultados sorológicos são poucos conhecidos no diagnóstico da neosporose canina. Um aumento progressivo do título de anticorpos da classe IgG, em um período de tempo, geralmente é indicativo de infecção aguda (DUBEY *et al.*, 1998). DUBEY *et al.* (1998) verificaram que os títulos de anticorpos em cães com neosporose clínica variaram de 1:50 até 1:3200 no método da RIFI e em cães clinicamente normais já foram observados títulos de 1:200 (REICHEL, 1998) e 1:800 (BARBER e TREES, 1996).

Algumas das pesquisas sorológicas realizadas com *T. gondii* consideram animais positivos a partir do título 1:16. Portanto, os resultados obtidos nessa pesquisa podem estar subestimados, devido à linha de corte utilizada ter sido 1:50. De qualquer forma, estes resultados sugerem que os animais analisados estão infectados com o protozoário, e a magnitude do título pode ajudar no diagnóstico diferencial.

5 CONCLUSÃO

Os resultados sorológicos obtidos dos 147 cães com sinais neurológicos analisados indicam que a infecção pelos protozoários *N. caninum* e *T. gondii* está amplamente distribuída na população estudada. Conclui-se que a sorologia para os protozoários deve ser rotineiramente solicitada em casos de cães com alterações neurológicas, mesmo quando se tem uma forte suspeita de cinomose ou outra doença do sistema nervoso central, devido à similaridade dos sinais clínicos observados nesses casos e a possibilidade de co-infecção nos animais. Entretanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados para se determinar a real participação destes parasitas na etiologia das doenças neurológicas caninas e a importância do acesso à rua como fator de risco para a infecção.

6 AGRADECIMENTOS

Ao Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná (HV-UFPR), Hospital e Centro Veterinário Diagnóstico Clinivet, Clínica Veterinária Clínicão, Centros de Controle de Zoonoses de Pinhais e São José dos Pinhais e ONG Associação do Amigo Animal pela disponibilidade de amostras, e ao CNPq e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ABREU, C.B.; NAVARRO, I.T.; REIS, A.C.F.; SOUZA, M.S.B.; MACHADO, R.; MARANA, E.R.M.; PRUDÊNCIO, L.B.; MATTOS, M.R.; TSUTSUI, V.S. Toxoplasmose ocular em cães jovens inoculados com *Toxoplasma gondii*. **Ciência Rural**, v. 32, p. 807-812, 2002.

AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; RODRIGUES, A.A.R.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; CAMARGO, E.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 71-77, 2006.

ANDREOTTI, R.; OLIVEIRA, J.M.; ARAÚJO E SILVA, E.; OSHIRO, L.M.; MATOS, M.F.C. Occurrence of *Neospora caninum* in dogs and its correlation with visceral leishmaniasis in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 375-379, 2006.

AZEVEDO, S.S.; BATISTA, C.S., VASCONCELLOS, S.A; AGUIAR, D.M.; RAGOZO, A.M.; RODRIGUES, A.A.; ALVES, C.J.; GENNARI, S.M. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 79, p. 51-56, 2005.

BARBER, J.S.; TREES, A.J. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. **Veterinary Record**, v. 139, p. 439-443, 1996.

BARBER, J.S.; GASSER R.B.; ELLIS J.; REICHEL M.P.; MCMILLAN D.; TREES, A.J. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. **The Journal of Parasitology**, v. 83, p. 1056-1058, 1997.

BARBOSA, M.V.F.; GUIMARÃES, J.E.; ALMEIDA, M.A.O.; GONDIM, L.F.P.; REGIS, G.B. Frequência de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em soros de cães errantes da cidade de Salvador-Bahia, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 457-465, 2003.

BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M.C.; MOORE, D.P.; RAMBEAU, M.; UNZAGA, J.M.; CAMPERO, C.; BACIGALUPE, D.; DUBEY, J.P. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. **The Journal of Parasitology**, v. 87, p. 906-907, 2001.

BASSO, W.; VENTURINI, M.C.; BACIGALUPE, D.; KIENAST, M.; UNZAGA, J.M.; LARSEN, A.; MACHUCA, M.; VENTURINI, L. Confirmed clinical *Neospora caninum* infection in a boxer puppy from Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 299-303, 2005.

BELO, M.A.A.; REZENDE, P.C.B.; CASTAGNOLLI, K.C.; BRESCIANI, K.D.S.; COSTA, A.J. Pesquisa de anticorpos anti- *Neospora caninum* em cães criados sob diferentes condições sanitárias. In: **SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA**, 11, 1999, Salvador. **Anais...** Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Salvador, 1999, p. 228.

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

BOAVENTURA, C.M.; BASTOS, S.A.; MELO, D.P.G.; SILVA, A.C. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães de Goiânia, Goiás. In: **I FÓRUM BRASILEIRO DE ESTUDOS SOBRE *Neospora caninum***, 2005, São Paulo. **Anais...** São Paulo: C B P V, 2005. p. 52-53.

BRESCIANI, K.D.S.; GENNARI, S.M.; NUNES, C.M.; SERRANO, A.C.M.; MOURA, A.B.; STOBBE, N.S.; PERRI, S.H.V.; COSTA, A.J.; DIAS, R.A. Fatores de risco associados à presença de anticorpos contra *Neospora caninum* em cães de Araçatuba – SP. In: **I FÓRUM BRASILEIRO DE ESTUDOS SOBRE *Neospora caninum***, 2005, São Paulo. **Anais...** São Paulo: C B P V, 2005. p. 35-37.

BRITO, A.F.; SOUZA, L.C.; DA SILVA, A.V.; LANGONI, H. Epidemiological and serological aspects in canine toxoplasmosis in animals with nervous symptoms. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 31-35, 2002.

CAÑON-FRANCO, W.A.; BERGAMASCHI, D.P.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; SOUZA, S.L.P.; SILVA, J.C.R.; PINTER, A.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of antibodies anti-*Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brasil. **Veterinary Parasitology**, v. 115, p. 71-74, 2003.

CARRUTHERS, V.B. Proteolysis and *Toxoplasma* invasion. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 595-600, 2006.

COSKUN S.Z.; AYDYN L.; BAUER C. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in domestic dogs in Turkey. **Veterinary Record**, v. 146, p. 649, 2000.

CRINGOLI, G.; RINALDI, L.; CAPUANO, F.; BALDI, L.; VENEZIANO, V.; CAPELLI, G. Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* coinfection in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p. 307–313, 2002.

CROOKSHANKS, J.L.; TAYLOR, S.M.; HAINES, D.M.; SHELTON, D. Treatment of canine pediatric *Neospora caninum* myositis following immunohistochemical identification of tachyzoites in muscle biopsies. **Canadian Veterinary Journal**, v. 48, p. 506-508, 2007.

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

DUBEY, J. P.; LAPPIN, M. R. Toxoplasmosis and neosporosis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3.ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006. Cap. 80, p.754-775.

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

DUBEY, J.P., CARPENTER, J.L., SPEER, C.A., TOPPER, M.J., UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, p. 1269–1285, 1988.

DUBEY, J.P.; DOROUGH, K.R.; JENKINS, M.C.; LIDDELL, S.; SPEER, C.A.; KWOW, O.C.H.; SHEN, S.K. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1293-1304, 1998.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; SAVILLE, W.J.A.; REED, S.M.; GRANSTROM, D.E.; SPEER, C.A. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, v. 95, p. 89–131, 2001.

DUBEY, J.P.; ROSS, A.D.; FRITZ, D. Clinical *Toxoplasma gondii*, *Hammondia heydorni* and *Sarcocystis sp.* infections in dogs. **Parassitologia**, v. 45, p. 141-146, 2003a.

DUBEY, J.P.; KNICKMAN, E.; GREENE, C.E. Neonatal *Neospora caninum* infections in dogs. **Acta Parasitologica**, v. 50, p.176–179, 2005.

DUBEY, J.P.; CHAPMAN, J.L.; ROSENTHAL, B.M.; MENSE, M.; SCHUELER, R.L. Clinical *Sarcocystis neurona*, *Sarcocystis canis*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* infections in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 36-49, 2006.

FERNANDES, B.C.T.M.; GENNARI, S.M.; SOUZA, S.L.P.; CARVALHO, J.M.; OLIVEIRA, W.G.; CURY, M.C. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 33-40, 2004.

FREIRE R.L.; NAVARRO I.T.; VIDOTTO O.; TUDURY E.A.; VIANNA C.C. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em cães atendidos no Hospital Veterinário da UEL-PR. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 13, p. 66-69, 1992.

FINAMOR, L.P.; FINAMOR Jr., F.; MUCCIOLI, C. Corticoterapia e uveítes. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 65, p. 483-486, 2002.

GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R.C. Soroepidemiologia da toxoplasmose em gatos e cães de propriedades rurais do município de Jaguapitã, Estado do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 29, p.99-104, 1999.

GENNARI, S.M.; YAI, L.E.; D'AURIA, S.N.R.; CARDOSO, S.M.S.; KWOK, O.C.H.; JENKINS, M.C.; DUBEY, J.P. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of São Paulo, Brasil. **Veterinary Parasitology**, v.106, p. 177-179, 2002.

GERMANO, P.M.L.; ERBOLATO, E.B.; ISHIZUKA, M.M. Serological survey of toxoplasmosis in dogs with the Indirect Immunofluorescent test in Campinas city, 1981. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP**, v. 22, p. 53-58, 1985.

GIRALDI, J.H.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; VIDOTTO, O.; TUDURY, E.A.; NAVARRO, I.T.; BATISTA, T.N. Sorologia e histopatologia de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em cães portadores de distúrbios neurológicos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, p.9-14, 2002.

GONDIM, L.F.P.; PINHEIRO, A.M.; SANTOS, P.O.M.; JESUS, E.E.V.; RIBEIRO, M.B.; FERNANDES, H.S.; ALMEIDA, M.A.O.; FREIRE, S.M.; MEYER, R.; McALLISTER, M.M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**, v. 101, p. 1-7, 2001.

GUIMARÃES, A.M.; RIBEIRO, M.F.B.; LIMA, J.D. Freqüência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em cães de Belo Horizonte, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.44, p.67-68, 1992.

GUIMARÃES Jr.; J.S.; SOUSA, S.L.P.; BERGAMASHI, D.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 124, p. 1-8, 2004.

HASS, J.A.; SHELL, L.; SUNDERS, G. Neurologic manifestations of toxoplasmosis: a literature review and case summary. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 5, p. 253, 1989.

HORNOK, S., EDELHOFER, R., FOK, É., BERTA, K., FEJES, P., RÉPÁSI, A., FARKAS, R. Canine neosporosis in Hungary: Screening for seroconversion of household, herding and stray dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 197–201, 2006.

ISHIZUKA, M. M.; YASUDA, P.H. Incidência de infecção por *Toxoplasma gondii* em cães do município de São Paulo. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 18, p. 161-165, 1981.

ISHIZUKA, M. M.; MIGUEL O.; BROGLIATO D.F. Prevalência de anticorpos anti-toxoplasma em soros de cães do município de São Paulo. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.11, p.115-125, 1974.

JACKSON, W.; DeLAHUNTA, A.; ADASKA, J.; COOPER, B.; DUBEY, J.P. *Neospora caninum* in an adult dog with progressive cerebellar signs. **Progress in Veterinary Neurology**, v.6, p. 124-127, 1995.

JESUS, E.E.V.; SANTOS, P.O.M.; BARBOSA, M.V.F.; PINHEIRO, A.M.; GONDIM, L.F.P.; GUIMARÃES, J.E.; ALMEIDA, M.A.O. Freqüência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães nos municípios de Salvador e Lauro de Freitas, Estado da Bahia – Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p.5-10, 2006.

KNOWLER, C.; WHEELER, S.J. *Neospora caninum* infection in three dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 36, p. 172-177, 1995.

LeCOUTER, R.A., GRANDY, J.L. Diseases of the spinal cord. In: ETTINGER, J.P. (Ed). **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 5 ed. Philadelphia: Saunders, 2000. Cap. 106, p. 608-657.

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, V. 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.

MINEO, T.W.P.; SILVA, D.A.O.; COSTA, G.H.N.; VON ANCKEN, A.C.B.; KASPER, L.H.; SOUZA, M.A.; CABRAL, D.D.; COSTA, A.J.; MINEO, J.R. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.98, p. 239-245; 2001.

MORAES, C.C.G.; MEGID, J.; PITUCO, E.M.; OKUDA, L.H.; DEL FAVA, C.; STEFANO, E. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães da microrregião da Serra de Botucatu, Estado de São Paulo. In: **I FÓRUM BRASILEIRO DE ESTUDOS SOBRE *Neospora caninum***, 2005, São Paulo. *Anais...* São Paulo: C B P V, 2005. p. 49-50.

MORETTI, L.; UENO, T.E.; RIBEIRO, M.G.; AGUIAR, D.M.; PAES, A.C.; PEZERICO, S.B.; SILVA, A.V. Toxoplasmose em cães co-infectados com o vírus da cinomose. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, p. 85-91, 2002.

MORETTI, L.; DA SILVA, A.V.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii* genotyping in a dog co-infected with distemper virus and ehrlichiosis rickettsia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, p. 359-363, 2006.

ORTOLANI, E.S.; GENNARI, S.M.; PINHEIRO, S.R.; RODRIGUES, A.A.R.; CHIEBAO, D.P.; SOARES, R.M. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em populações animais das aldeias indígenas Krucutu e Morro da Saudade, no município de São Paulo, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v.12, p.25-28, 2005.

ORTUNO, A.; CASTELLA, J.; ALMERIA, S. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Spain. **The Journal of Parasitology**, v. 88, p. 1263–1266, 2002.

PARADIES, P.; CAPELLI, G.; TESTINI, G.; CANTACESSI, C.; TREES, A.J.; OTRANTO, D. Risk factors for canine neosporosis in farm and kennel dogs in southern Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 240–244, 2007.

PASQUALI, P.; MANDARA, M.T.; ADAMO, F.; RICCI, G.; POLIDORI, G.A.; DUBEY, J.P. Neosporosis in a dog in Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 77, p. 297-299, 1998.

PATITUCCI, A.N.; PÉREZ, M.J.; ROZAS, M.A.; ISRAEL, K.F. Neosporosis canine: detection of sera antibodies in rural and urban canine population of Chile. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 33, p. 227-232, 2001.

PETERS, M.; WAGNER, F.; SCHARES, G. Canine neosporosis: clinical and pathological findings and first isolation of *Neospora caninum* in Germany. **Parasitological Research**, v. 86, p. 1-7, 2000.

PIPER, R.C.; CLOE, C.R.; SHAFFUCK, J.A. Natural and experimental ocular toxoplasmosis in animals. **American Journal of Ophthalmologic**, v.69, p.662-668, 1970.

PUMAROLA, M.; AÑOR, S.; RAMIS, A. J.; BORRAS, D.; GORRAIZ, J.; DUBEY, J.P. *Neospora caninum* infection in a Napolitan mastiff dog from Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 64, p. 315–317, 1996.

RASMUSSEN, K.; JENSEN, A.L. Some epidemiologic features of canine neosporosis in Denmark. **Veterinary Parasitology**, v. 62, p. 345–349, 1996.

REICHEL M.P.; THORTON R.N.; MORGAN P.L.; MILLS R.J.M.; SCHARES G. Neosporosis in a pup. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 46, p.106-110, 1998.

RESENDE, P.C.B., et al. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em cães do município de Jaboticabal, SP, Brasil. In: **SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA**, 11, 1999. Salvador-BA. Anais... Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999, p. 229.

ROMANELLI, P.R.; FREIRE, R.L.; VIDOTTO, O.; MARANA, E.R.M.; OGAWA, L.; DEPAULA, V.S.O.; GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 82, p. 202-207, 2007.

SALATA, E., YOSHIDA, E.L.A., PEREIRA, E.A., CORRÊA, F.M.A. Toxoplasmose em animais silvestres e domésticos da região de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 27, p. 20-22, 1985.

SÁNCHEZ, G.F.; MORALES, S.E.; MARTINEZ, M.J.; TRIGO, J.F. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. **Can Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 67, p. 142-145, 2003.

SAWADA, M.; PARK, C.H.; KONDO, H.; MORITA, T.; SHIMADA, A.; YAMANE, I.; UMEMURA, T. Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60, p. 853-854, 1998.

SOUZA, S.L.P.; GUIMARÃES, J.S.; Jr.; FERREIRA, F.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Parana. **The Journal of Parasitology**, v. 88, p. 408-409, 2002.

SOUZA, S.L.P.; YAY, L.E.O.; GENNARI, S.M.; D'AURIA, S.R.N.; CARDOSO, S.M.S.; GUIMARÃES Jr, J.S.; DUBEY, J.P. Occurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from dogs of the urban and rural areas from Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, p. 101-103, 2003.

SVOBODA, M.; SVOBODOVÁ, V. Effects of breed, sex, age, management and nutrition on the incidence of *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs and cats. **Acta Veterinaria Brno**, v. 56, p. 315-330, 1987.

TARLOW, J.M.; RUDLOFF, E.; LICHTENBERGER, M.; KIRBY, R.; Emergency presentations of 4 dogs with suspected neurologic toxoplasmosis. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.15, p. 119-127, 2005.

TEIXEIRA, W.C.; SILVA, M.I.S.; PEREIRA, J.G.; PINHEIRO, A.M.; ALMEIDA, M.A.O, GONDIM, L.F.P. Frequência de cães reagentes para *Neospora caninum* em São Luís, Maranhão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 685-687, 2006.

THOMAS, W.B. Inflammatory diseases of the central nervous system in dogs. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 13, p. 167-178, 1998.

VÁCLAVEK, P.; SEDLÁK, K.; HURKOVÁ, L.; VODRÁZKA, P.; SEBESTA, R.; KOUDELA, B. Serological survey of *Neospora caninum* in dogs in the Czech Republic and a long-term study of dynamics of antibodies. **Veterinary Parasitology** v. 143, p. 35-41, 2007.

VARANDAS, N.P.; RACHED, P.A.; COSTA, G.H.N.; SOUZA, L.M.; CASTAGNOLLI, K.C.; COSTA, A.J. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em cães da região nordeste do Estado de São Paulo. Correlação com neuropatias. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, p. 105-111, 2001.

WANHA, K.; EDELHOFER, R.; GABLER-EDUARDO, C.; PROSL H. Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs and foxes in Austria. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 189–193, 2005.

CAPÍTULO II

PREVALENCE OF *Neospora caninum* ANTIBODIES IN STRAY AND DOMICILED DOGS FROM URBAN, PERIURBAN AND RURAL AREAS FROM PARANÁ STATE, SOUTHERN BRAZIL

ABSTRACT

Antibodies to *Neospora caninum* were analyzed by an indirect fluorescent antibody test (IFAT), in stray and domiciled dogs from urban, periurban and rural areas from Curitiba, Paraná State, Brazil. Of the total of 556 dogs, 18.17% (101) were positive for *N. caninum* (titer 50). Seroprevalence was 12.71% in urban, 15.73% in periurban, and 25.38% in rural dogs. Rural dogs had a significantly higher seroprevalence than urban dogs ($P < 0.02$). There were no significant differences between the seroprevalence in urban and periurban dogs ($P \leq 1$), and between dogs from periurban and rural areas ($P \leq 0.10$). Antibodies to *N. caninum* were detected in 34 of 233 domiciled dogs (14.59%) and in 17 of 126 stray dogs (13.49%). No statistical differences were observed considering life-style and geographic location of origin ($P \leq 1$). *Neospora caninum* is widespread among dogs from urban, periurban and rural areas of the municipal district of Curitiba, Paraná, Brazil.

KEY-WORDS: *Neospora caninum*, stray and domiciled dogs, urban, periurban, rural, Paraná.

RESUMO

Os anticorpos anti-*Neospora caninum* foram detectados pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em cães errantes e domiciliados das áreas urbana, periurbana e rurais de Curitiba, estado do Paraná, Brasil. Do total de 556 cães, 18,17% (101) foram soropositivos para *N. caninum* (título de 1:50). A soroprevalência foi de 12,71% nos cães urbanos, de 15,73% nos periurbanos e de 25,38% nos cães rurais. Nos cães rurais a soroprevalência foi maior do que nos cães urbanos ($P < 0.02$). Não houve diferença significativa entre as soroprevalências dos cães urbanos e periurbanos ($P \leq 1$), e dos periurbanos e rurais ($P \leq 0.10$). Os anticorpos anti *N. caninum* foram detectados em 34 de 233 cães domiciliados (14,59%) e em 17 de 126 cães errantes (13,49%). Não houve diferença estatística significativa entre o tipo de criação e origem ($P \leq 1$). *Neospora caninum* está presente nos cães urbanos e periurbanos de Curitiba e nas áreas rurais do Estado do Paraná.

PALAVRAS-CHAVE: *Neospora caninum*, cães errantes e domiciliares, urbanos, periurbanos, rurais, Paraná.

1 INTRODUCTION

Neospora caninum is an apicomplexan protozoan that was first described and isolated from dogs (DUBEY *et al.*, 1988) and later associated with bovine abortion. The parasite has since been recognized as one of the major causes of abortion in cattle worldwide as well as a causative agent of neuromuscular disease in dogs (McINNES *et al.*, 2006). Besides being a possible cause of neuromuscular disease, the protozoan might also produce myocardial, pulmonary and dermal diseases in dogs (McINNES *et al.*, 2006). Domestic dogs and coyotes are considered the definitive hosts for *N. caninum* (Mc ALLISTER *et al.*, 1998; GONDIM *et al.*, 2004).

Antibodies to *N.caninum* in canine populations were reported in several countries, and the seroprevalence has been reported from 4 to 54.2% (DUBEY, 2003). In South America, antibodies to *N. caninum* were detected in dogs from Uruguay (BARBER *et al.*, 1997), Argentina (BASSO *et al.*, 2001), Chile (PATITUCCI *et al.*, 2001) and Brazil (CAÑON-FRANCO *et al.* 2003; FERNANDES *et al.*, 2004; GUIMARÃES JUNIOR *et al.*, 2004; ROMANELLI *et al.*, 2007).

There are few studies comparing isolated characteristics of the animals such as seroprevalence of *Neospora caninum* in stray dogs versus domiciled dogs. The presence of *N. caninum* antibodies in urban dogs of the city of Curitiba, Parana State, and in periurban dogs from the city's metropolitan area is not known yet. In this context, the objectives of this study were: (1) to determine the seroprevalence of *Neospora caninum* in domiciled and stray dogs from urban and periurban areas of the city of Curitiba, Paraná (PR), Brazil, and in domiciled dogs from rural areas of Paraná state; (2) to perform multiple comparisons of the proportion of seroprevalence obtained in domiciled and stray dogs living in all geographic locations, urban versus periurban versus rural areas.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 STUDY AREA AND SAMPLING

In the period of time between March 2006 and March 2007, 556 randomly chosen domestic dogs of different breeds, sex, ages and without neurological signs, participated in this study. These animals came from Curitiba's urban area (181 dogs), periurban areas of the municipality of Curitiba (178 dogs) and rural area (197 dogs) of Paraná state, Southern Brazil, which is an important region of dairy production in this country. The blood samples originated from urban and periurban areas were obtained from dogs presented to the Veterinary Teaching Hospital of the Federal University of Paraná and to private veterinary clinics of Curitiba city. The dogs from the periurban areas all came from four places: Zoonosis Control Centers, located at the cities of Pinhais, PR and São José dos Pinhais, PR, from the Non-Governmental Organization "Amigo Animal", at the city of Campo Magro, PR and from the Military Police Prison located in the city of Piraquara, PR. Information regarding the life-style (stray or domiciled) and the origin (urban and periurban) of the dogs was also obtained. Of the 359 dogs from urban and periurban areas, 233 were domiciled dogs, and 126 were stray dogs. From the 233 domiciled dogs, 165 lived in Curitiba and 68 lived in the metropolitan areas of the city (Pinhais, São José dos Pinhais, Campo Magro, Piraquara). From the 126 stray dogs, 16 lived in Curitiba and 110 lived in the metropolitan areas of the city. The rural dogs that were studied belonged to dairy farms in the east of the state of Paraná (Castro and Colônia Wittmarsum).

2.2 BLOOD COLLECTION

The blood samples were collected by cephalic or jugular vein punctures and then centrifuged at 700 x g for 10 min. Sera were separated and stored at - 20 °C until serological testing.

2.3 SEROLOGY FOR *N. caninum*

An indirect fluorescent antibody test (IFAT) was used for detection of anti-*N. caninum* antibodies, as previously described (DUBEY *et al.*, 1988). Antigen of *N. caninum* culture-derived tachyzoites of the NC-1 isolate was produced and prepared according to LOCATELLI-DITTRICH *et al.* (2006). Reactions in which tachyzoites presented total peripheral fluorescence were deemed positive, using the cut-off dilution of 1:50 (ROMANELLI *et al.*, 2007). All seropositive sera were retested using two-fold serial dilutions. Positive and negative control sera were included in each slide.

2.4 STATISTICAL ANALYSIS

The data were analyzed using Chi-square tests to determine differences in seroprevalence between groups ($P \leq 0.05$). Additionally, the prevalence ratio was calculated ($R_p = \text{seroprevalence between the exposed to a given life-style factor} / \text{seroprevalence between the non-exposed}$) when a significant difference between the groups was detected.

3 RESULTS

Of a total of 556 dogs tested, 18.17% (101) were seropositive for anti- *N. caninum* at titers of 50, in which 12.71% (23/181) came from the urban area, 15.73% (28/178) from the periurban area, and 25.38% (50/197) from the rural area (TABLE 10). Statistical differences were observed between the seroprevalence in dogs from urban areas and those from rural areas ($P \leq 0.02$). Statistical differences were not observed between the seroprevalence in dogs from urban areas and those from periurban areas ($P \leq 1$) and between dogs from periurban and rural areas ($P \leq 0.10$).

TABLE 10 - SEROPREVALENCE FOR *N. caninum* IN SERA OF DOGS FROM URBAN AND PERIURBAN AREAS IN THE CURITIBA COUNTY, AND FROM RURAL AREAS IN PARANÁ STATE, SOUTHERN BRAZIL

AREAS	SERUM SAMPLES	POSITIVE*	
		<i>n</i>	%
Urban	181	23	12.71a
Periurban	178	28	15.73ab
Rural	197	50	25.38b
Total	556	101	18.17

Different letters in the column: $P \leq 0.02$; *n*: number of positive animals.

* IFAT reaction (1:50)

Considering the dog's exposure to the rural environment as a potential risk factor, the prevalence ratio between rural and urban dogs was calculated, resulting in a moderately high positive association ($Pr = 2.0$), showing that rural dogs might be considered at a higher risk of developing *N. caninum* seropositivity.

Of the 233 domiciled dogs, antibodies to *N. caninum* were found in 13.33% (22/165) and 17.65% (12/68) with titer of 50, respectively, for urban and periurban areas. Of the 126 stray dogs, 6.25% (1/16) and 14.55% (16/110) had titers of 50, respectively, for urban and periurban areas. No statistical differences were observed between the life-style and geographic location of origin ($P \leq 1$) (TABLE 11).

TABLE 11- SEROPREVALENCE OF ANTI-*Neospora caninum* ANTIBODIES IN DOMICILED AND STRAY DOGS FROM URBAN AND PERIURBAN AREAS OF CURITIBA, PARANÁ STATE, BRAZIL

LIFE-STYLE	DOGS	POSITIVES* (%) TO <i>Neospora caninum</i>
Domiciled		
Urban	165	22 (13.33)
Periurban	68	12 (17.65)
Total	233	34 (14.59)
Stray		
Urban	16	1 (06.25)
Periurban	110	16 (14.55)
Total	126	17 (13.49)

* IFAT reaction (1:50)

4 DISCUSSION

The results of this study indicate that dogs from urban, periurban, and rural areas in Paraná state, Brazil are exposed to *Neospora caninum* and, curiously, domiciled and stray dogs have similar seroprevalences. The presence of anti-*N.caninum* antibodies in urban (12.71%), periurban (15.73%) and rural dogs (25.38%) detected in this study corroborates the results of FERNANDES *et al.* (2004), who observed a prevalence of 10.70% in urban dogs, 18.9% in periurban dogs and 21.7% in rural dogs from Minas Gerais state, Brazil. Few studies compared the seroprevalence between stray and domiciled dogs (GENNARI *et al.*, 2002; AZEVEDO *et al.* 2005; JESUS *et al.*, 2006) and only one investigation compared the seroprevalence in urban, periurban and rural dogs (FERNANDES *et al.*, 2004).

In the present study, the highest seroprevalences were detected in periurban and rural dogs, however, without statistical differences between these populations examined. The higher trend of seroprevalence found in periurban dogs, when compared to dogs from urban areas, may be explained by the fact that those animals live close to small rural farms, in the presence of potential intermediate hosts, hunting possibilities and feeding habits that include homemade diet, contrary to the major part of the urban dogs, which are usually fed with commercial dog food and seldom get in contact with intermediate hosts. FERNANDES *et al.* (2004) reported *N. caninum* antibodies in 10.70% of 300 dogs from urban area and 18.9% of 58 dogs from periurban areas in Brazil, also suggesting that in periurban environment there are potential intermediary hosts that facilitate the contact of the animals with the agent.

The seroprevalence found for anti-*N. caninum* antibodies in rural dogs (25.38%) was similar to the 21.6% found by SOUZA *et al.* (2002) in dogs of the rural area of the northern region of the state of Paraná and to ROMANELLI *et al.* (2007) who observed, in Guarapuava, Parana state, similar seroprevalence (29.1%) in dogs also in the rural area. In the present study significant differences were observed between the seroprevalence in dogs from urban versus rural areas. The highest seroprevalence in rural dogs compared with urban dogs (25.38% versus 12.71%) may be explained by the fact that in the rural environment, dogs may acquire infection by ingesting cattle tissues, especially placentas and aborted fetuses of

infected bovine (DIJKSTRA *et al.*; 2002). In Paraná State, *N. caninum* was isolated from a bovine fetus and from a blind calf, confirming the presence of the parasite in cattle from this area (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2003; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2004). In rural dogs of the Western Amazon, northern Brazil, AGUIAR *et al.* (2006) noted the occurrence of anti-*N. caninum* antibodies in 12.6%, a lower seroprevalence than that observed in his study. SAWADA *et al.* (1998) in Japan, WOUDA *et al.* (1999) in Holland, and BASSO *et al.* (2001) in Argentina, also reported higher seroprevalence in dogs from the rural area in comparison to those of the urban areas.

The seroprevalence of *N. caninum* in 12.71% of urban dogs was similar to the 12% of 120 urban dogs from Chile (PATITUCCI *et al.*, 2001). FERNANDES *et al.* (2004) reported *N. caninum* antibodies in 10.7% of 300 urban dogs. However, TEIXEIRA *et al.* (2006) in São Luís, Maranhão, Brazil, observed a very high seroprevalence (31.1%) in urban dogs from Zoonosis Control Centers. In urban dogs of the municipalities of Monte Negro, Rondônia, and Campina Grande, Paraíba, Brazil, CAÑON-FRANCO *et al.* (2003) and AZEVEDO *et al.* (2005), respectively, reported seroprevalences of 8.3% and 8.4%, lower results than that observed in this study.

There are few reports in the literature comparing the prevalence of anti- *N. caninum* antibodies in domiciled and stray dogs (GENNARI *et al.*, 2002; AZEVEDO *et al.*, 2005; JESUS *et al.*, 2006). No statistical differences were observed between all possible comparisons of urban, periurban, domiciled and stray dogs, neither between the stray dogs and domiciled dogs in both origins ($P \leq 1$), suggesting that dogs having greater access to streets, in the city of Curitiba and metropolitan areas, did not positively influence the seroprevalence results. Similar results were found by JESUS *et al.* (2006), that reported *N. caninum* antibodies in 11.2% of the stray dogs and 13.3% of the domiciled dogs from Bahia state, Brazil, and no statistical differences were observed between the two geographic locations. However, GENNARI *et al.* (2002) reported a higher seroprevalence in stray dogs (25% of 611) versus domiciled dogs (10% of 500) from urban area in São Paulo (SP), Brazil, using the agglutination test as the diagnostic method. AZEVEDO *et al.* (2005) observed correlation between canine seroprevalence for *N. caninum* and access to street, in Paraíba State, Brazil. The different seroprevalences detected in dogs were probably because of differences in the diet consumed by the canine population examined.

The results of this study show that subclinical infection with *Neospora caninum* is widespread among dogs from urban, periurban and rural areas of the municipal district of Curitiba, Paraná and reinforce the importance of the fact that dogs carry the protozoan in those environments. Although no statistical differences were observed between the occurrences in stray and domiciled dogs from the urban and periurban areas, it should be considered the small size of the analyzed sample, mainly of stray dogs from Curitiba. More studies associating risk factors for canine neosporosis in periurban areas must be performed. Additionally, further studies are required in dogs living in rural areas to verify their real participation in the epidemiology of the disease.

5 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the veterinary clinics of the Veterinary Teaching Hospital of the Universidade Federal do Paraná (UFPR), the Zoonosis Control Centers from Pinhais and São José dos Pinhais, the Non-Governmental Organization “Amigo Animal”. We would like to acknowledge the Brazilian research agencies, Fundação Araucária (Paraná state) and CNPq, who funded part of this research. The authors are also very grateful to the owners of the dogs for their help and co-operation.

6 REFERENCES

AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; RODRIGUES, A.A.R.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; CAMARGO, E.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 71-77, 2006.

AZEVEDO, S.S.; BATISTA, C.S.; VASCONCELLOS, S.A.; AGUIAR, D.M.; RAGOZO, A.M.; RODRIGUES, A.A.; ALVES, C.J.; GENNARI, S.M. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. **Research in Veterinary Science**, v.79, p. 51-56, 2005.

BARBER, J.S.; GASSER, R.B.; ELLIS, J.; REICHEL, M.P.; MCMILLAN, D.; TRESS, A.J. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. **The Journal of Parasitology**, v. 83, p. 1056-1058, 1997.

BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M.C.; MOORE, D.P.; RAMBEAU, M.; UNZAGA, J.M.; CAMPERO, C.; BACIGALUPE, D.; DUBEY, J.P. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. **The Journal of Parasitology**, v. 87, p. 906-907, 2001.

CAÑON-FRANCO, W.A.; BERGAMASCHI, D.P.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; SOUZA, S.L.P.; SILVA, J.C.R.; PINTER, A.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of antibodies anti-*Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brasil. **Veterinary Parasitology**, v. 115, p. 71-74, 2003.

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H.W.; EYSKER, M.; HESSELINK, J.W.; WOUDA, W. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. **Veterinary Parasitology**, v.105, p.99-104, 2002.

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 American Veterinary Medical Association**, v.193, p.1259-1263, 1988.

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

FERNANDES, B.C.T.M.; GENNARI, S.M.; SOUZA, S.L.P.; CARVALHO, J.M.; OLIVEIRA, W.G.; CURY, M.C. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.123, p.33-40, 2004.

GENNARI, S.M.; YAI, L.E.; D'AURIA, S.N.R.; CARDOSO, S.M.S.; KWOK, O.C.H.; JENKINS, M.C.; DUBEY, J.P. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.106, p.177-179, 2002.

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

GUIMARÃES JR., J.S.; SOUZA, S.L.P.; BERGAMASHI, D.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 124, p.1-8, 2004.

JESUS, E.E.V.; SANTOS, P.O.M.; BARBOSA, M.V.F.; PINHEIRO, A.M.; GONDIM, L.F.P.; GUIMARÃES, J.E.; ALMEIDA, M.A.O. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães nos municípios de Salvador e Lauro de Freitas, Estado da Bahia – Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p.5-10, 2006.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; PINCKNEY, R.D.; SOUSA, R.S.; LEITE, L.C.; THOMAZ-SOCCOL, V. Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Paraná, southern Brazil. **Veterinary Record**, v.153, p.366-367, 2003.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; VAN DER VINNE, R.; PINCKNEY, R.D. Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p.103-109, 2004.

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, V. 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.

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

McINNIS, L.M.; IRWIN, P.; PALMER, D.G.; RYAN, U.M. *In vitro* isolation and characterization of the first canine *Neospora caninum* isolate in Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 355-363, 2006.

PATITUCCI, A.N.; PÉREZ, M.J.; ROZAS, M.A.; ISRAEL, K.F. Neosporosis canine: detection of sera antibodies in rural and urban canine population of Chile. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 33, p. 227-232, 2001.

ROMANELLI, P.R.; FREIRE, R.L.; VIDOTTO, O.; MARANA, E.R.M.; OGAWA, L.; DEPAULA, V.S.O.; GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 82, p. 202-207, 2007.

SAWADA, M.; PARK, C.H.; KONDO, H.; MORITA, T.; SHIMADA, A.; YAMANE, I.; UMEMURA, T. Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60, p. 853-854, 1998.

SOUZA, S.L.P.; GUIMARÃES, J.S.; Jr.; FERREIRA, F.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Parana. **The Journal of Parasitology**, v. 88, p. 408-409, 2002.

TEIXEIRA, W.C.; SILVA, M.I.S.; PEREIRA, J.G.; PINHEIRO, A.M.; ALMEIDA, M.A.O, GONDIM, L.F.P. Frequência de cães reagentes para *Neospora caninum* em São Luís, Maranhão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 685-687, 2006.

WOUDA, W.; DIJKSTRA, T.; KRAMER, A.M.H.; VAN MANEN, C.; BRINKHOF, J.M.A. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. **International Journal of Parasitology**, v. 29, p.1677-1682, 1999.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho teve como objetivos iniciar as pesquisas com neosporose canina na região de Curitiba, verificar se o protozoário *N. caninum* está presente na forma de infecção subclínica nos cães sadios analisados e qual sua participação na etiologia de cães que manifestam sinais neurológicos.

A neosporose tem sido amplamente estudada no mundo inteiro devido ao impacto econômico causado pelas perdas reprodutivas em bovinos. A descoberta do cão como hospedeiro definitivo do agente intensificou as pesquisas para tentar se elucidar qual a real participação dos cães na contaminação do ambiente e na manutenção e disseminação do parasita nos rebanhos de produção. Anticorpos anti-*N. caninum* têm sido descritos em várias espécies animais e estudos mais aprofundados devem ser realizados para verificar a presença de hospedeiros definitivos e intermediários no ambiente silvestre, fator importante na investigação epidemiológica da doença.

Muitos relatos de casos clínicos de neosporose em cães têm sido publicados nos últimos anos, demonstrando que as principais conseqüências da infecção nesta espécie decorrem do aparecimento de alterações neuromusculares que podem levar o animal a óbito. Como a doença é clinicamente similar a várias outras enfermidades, a neosporose deve ser incluída rotineiramente no diagnóstico diferencial das alterações neurológicas em cães. A presença de anticorpos anti-*N. caninum* na sorologia isoladamente não é suficiente para o diagnóstico de neosporose, porém altos títulos associados ao histórico e quadro clínico do animal podem ser indicativos da doença.

Com os resultados sorológicos obtidos neste estudo, concluiu-se que *N. caninum* está presente nas regiões estudadas, tanto em cães que manifestaram sinais neurológicos compatíveis com a doença, quanto em cães sadios, portadores assintomáticos do parasita. O exame diagnóstico para os protozoários *N. caninum* e *T. gondii* deve ser normalmente solicitado em casos de cães com distúrbios neurológicos, mesmo quando se tem uma forte suspeita de cinomose ou outra doença do sistema nervoso central, principalmente pela possibilidade de co-infecção nesses animais.

A detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em cães sadios confirmaram a presença do protozoário na população estudada de Curitiba, região metropolitana e área rural do Estado do Paraná, e demonstraram a importância da neosporose subclínica em animais portadores assintomáticos no ambiente urbano e periurbano da região. Como o número de amostras de cães errantes utilizada neste estudo foi limitado, mais pesquisas enfocando a prevalência da doença em cães de rua tornam-se necessárias, com o objetivo de identificar possíveis fatores de risco para a infecção nestes animais e de associar medidas preventivas para evitar o aparecimento da doença e a permanência do protozoário no ambiente.

Nas áreas rurais, onde a prevalência e a razão de prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* são elevadas, estudos de epidemiologia parasitológica mais aprofundados devem ser executados para se verificar a real participação do cão na manutenção da neosporose nos rebanhos e no controle epidemiológico da doença. A elucidação do ciclo do protozoário no intestino do cão e a dinâmica da frequência, intensidade de eliminação e sobrevivência de oocistos no ambiente são fatores fundamentais para a prevenção e controle da neosporose canina e bovina.

PERSPECTIVAS

A partir deste trabalho inicial enfocando a neosporose canina em cães urbanos e periurbanos de Curitiba, ficou evidente que o protozoário *N. caninum* está presente na região e a necessidade de mais pesquisas que englobem a prevalência em cães de diferentes origens e os fatores de risco associados a estas áreas. Novos trabalhos associando a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em cães domiciliados e errantes ao seus hábitos alimentares, possibilidade de acesso à rua e contato com animais positivos, serão extremamente úteis para se desvendar o principal mecanismo de infecção dos animais nesta região. Aqui no Paraná, outros estudos também já revelaram a presença de cães infectados em áreas rurais, evidenciando a necessidade de investigações epidemiológicas que detalhem o elo de ligação entre os animais soropositivos e a forma de manutenção do protozoário no ambiente.

Pesquisas mais aprofundadas são necessárias para se determinar a participação de *N. caninum* e *T. gondii* na etiologia das doenças neurológicas caninas, incluindo a cinomose e outras doenças imunossupressoras como potenciais fatores de risco para a manifestação clínica da enfermidade. O limiar crítico entre a presença da infecção e o desenvolvimento de neosporose ou toxoplasmose em cães é importante na prevenção das doenças e deve ser alvo de estudos em animais portadores.

Com os avanços tecnológicos no uso de ferramentas diagnósticas e principalmente com o incentivo às pesquisas por entidades governamentais e privadas, torna-se possível realizar trabalhos científicos com animais domésticos e silvestres para elucidar as principais dúvidas ainda existentes sobre a neosporose, atuando de maneira efetiva no controle da doença nos animais.

ANEXO 1 – RESULTADOS SOROLÓGICOS OBTIDOS NO EXPERIMENTO

FIGURA 2 – PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum* E ANTI-*Toxoplasma gondii* EM SOROS DE CÃES COM SINAIS NEUROLÓGICOS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL, CONFORME LOCAL DE COLETA DAS AMOSTRAS

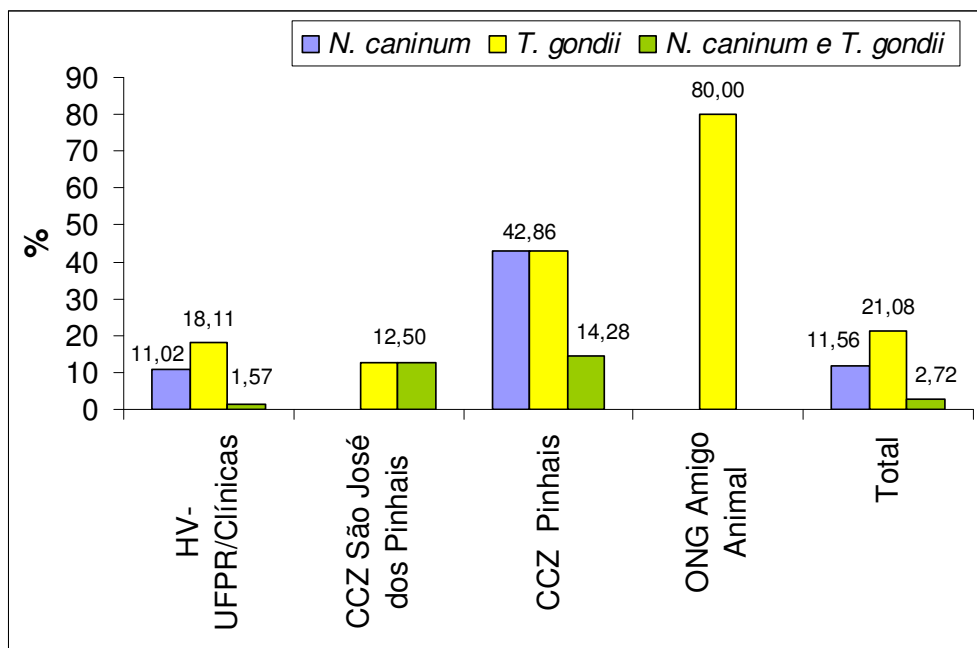


FIGURA 3 – PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*N. caninum* E ANTI-*T. gondii* EM SOROS DE CÃES COM SINAIS NEUROLÓGICOS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL, CONFORME TIPO DE CRIAÇÃO

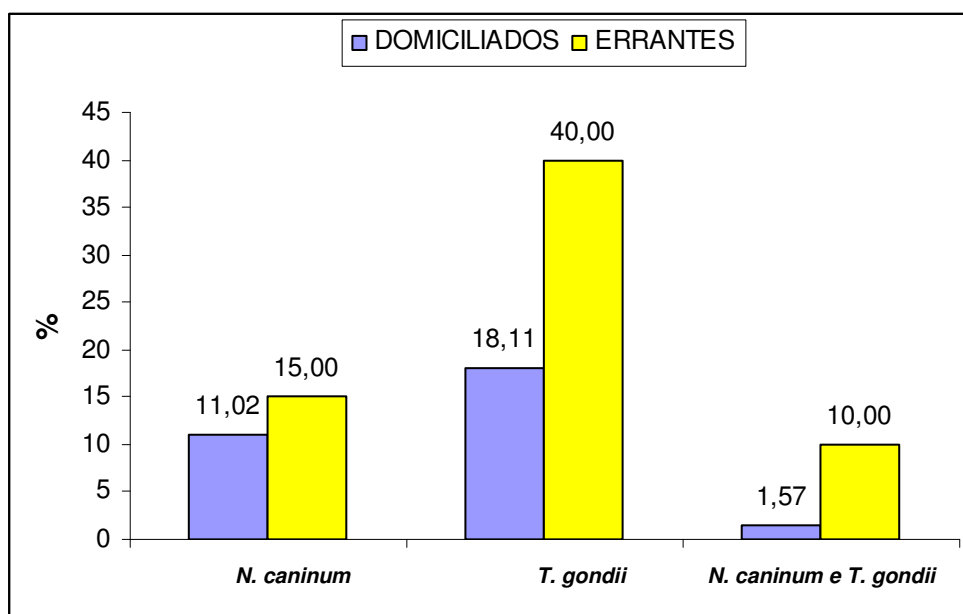


FIGURA 4 – PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*N. caninum* EM CÃES COM SINAIS NEUROLÓGICOS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA, CONFORME A TITULAÇÃO FINAL, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL

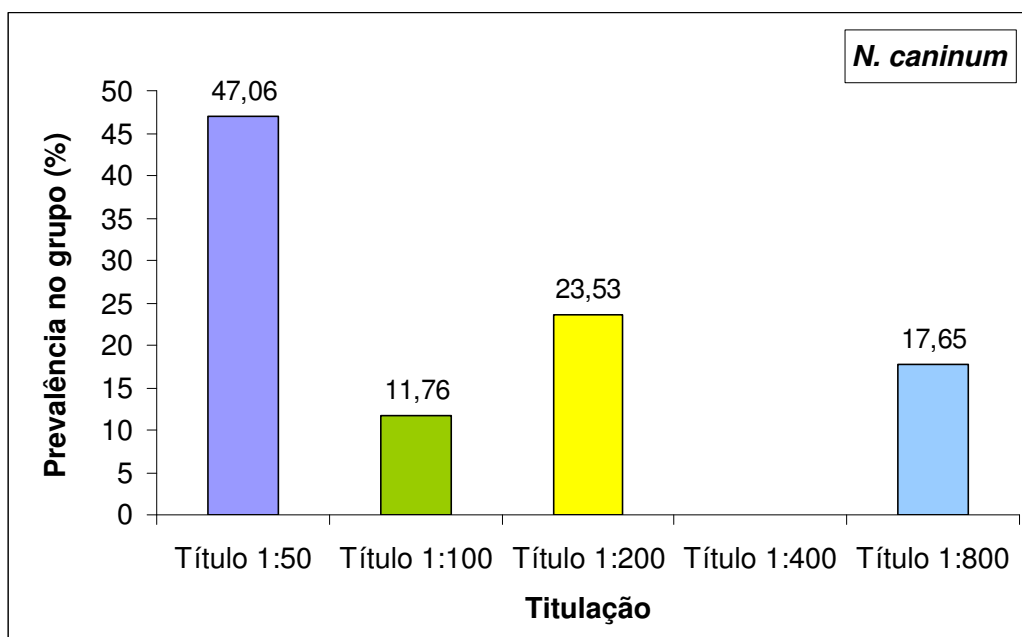


FIGURA 5 – PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*T. gondii* EM CÃES COM SINAIS NEUROLÓGICOS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA, CONFORME A TITULAÇÃO FINAL, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL

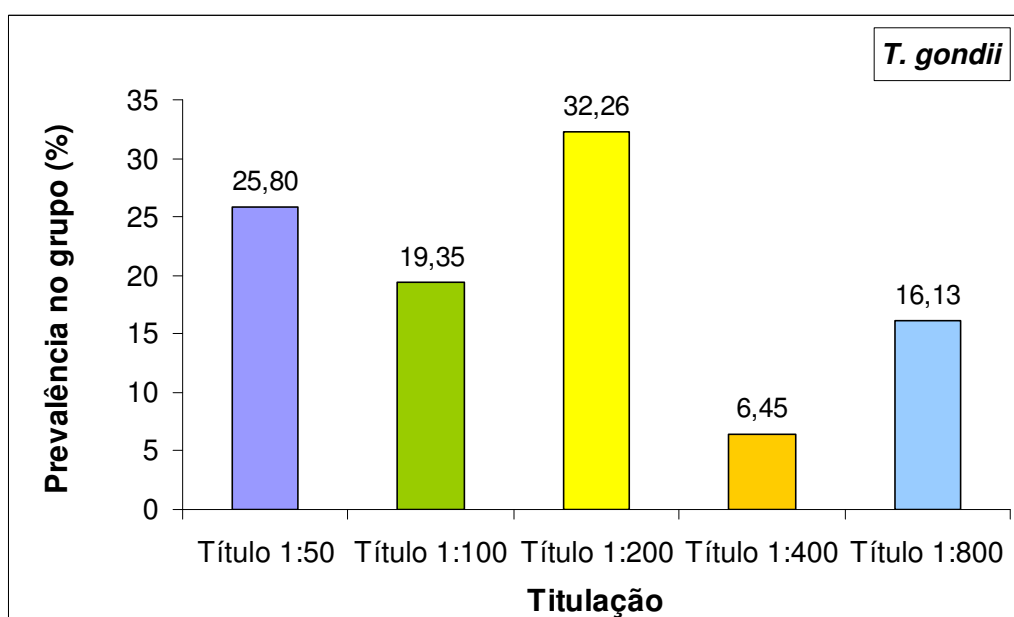


FIGURA 6 – PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*N. caninum* E ANTI-*T. gondii* EM CÃES COM SINAIS NEUROLÓGICOS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA, CONFORME A TITULAÇÃO FINAL, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL

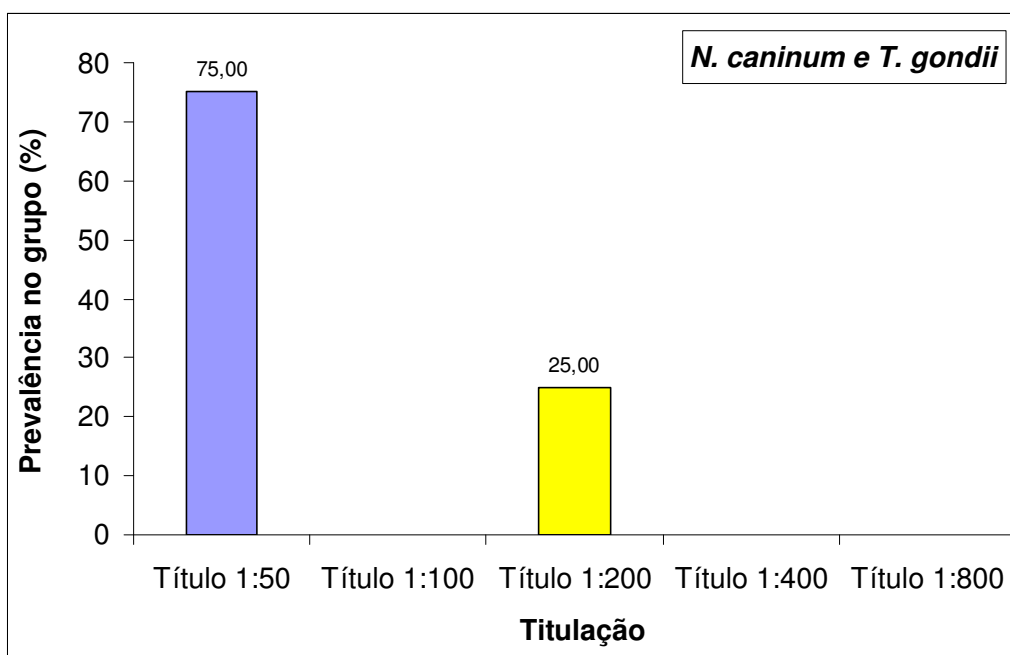


FIGURA 7 – COMPARAÇÃO ENTRE AS PREVALÊNCIAS DE ANTICORPOS PARA *N. caninum* e *T. gondii* EM CÃES COM SINAIS NEUROLÓGICOS CONFORME A TITULAÇÃO FINAL, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL

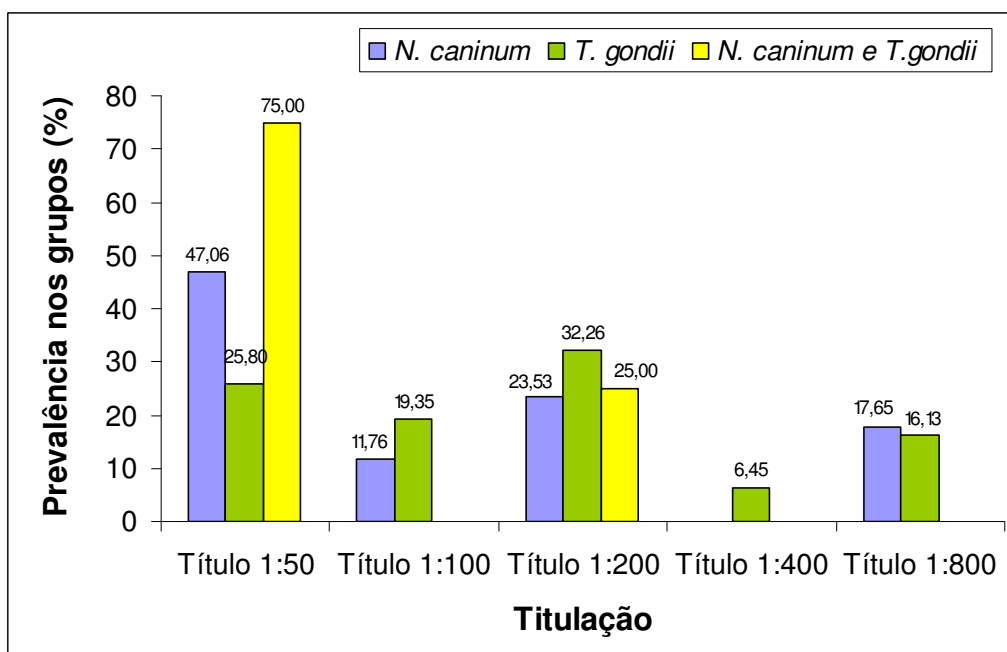


FIGURA 8 – PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*N. caninum* EM CÃES SADIOS URBANOS E PERIURBANOS DE CURITIBA E DE ÁREA RURAL DO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL, CONFORME A REGIÃO

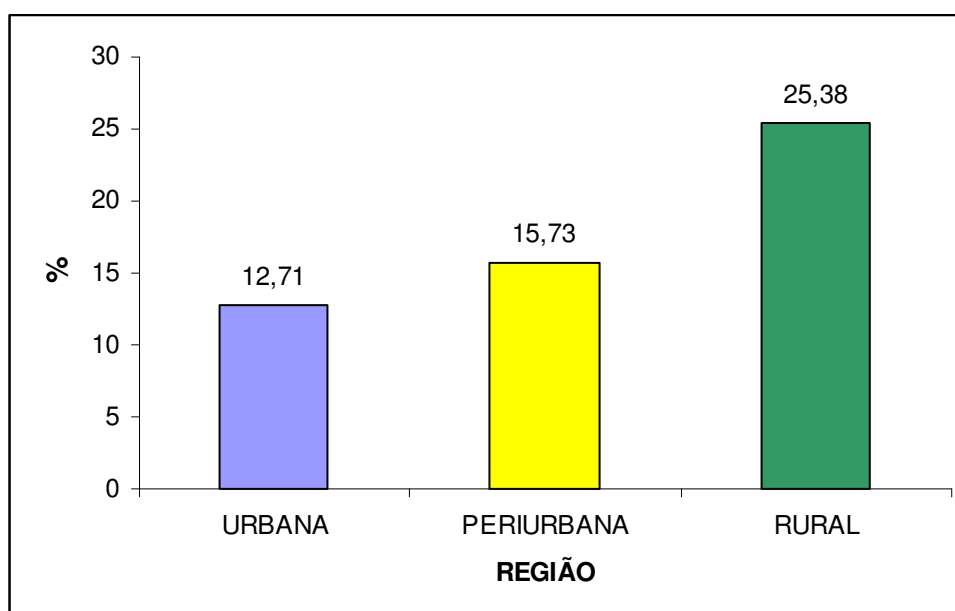
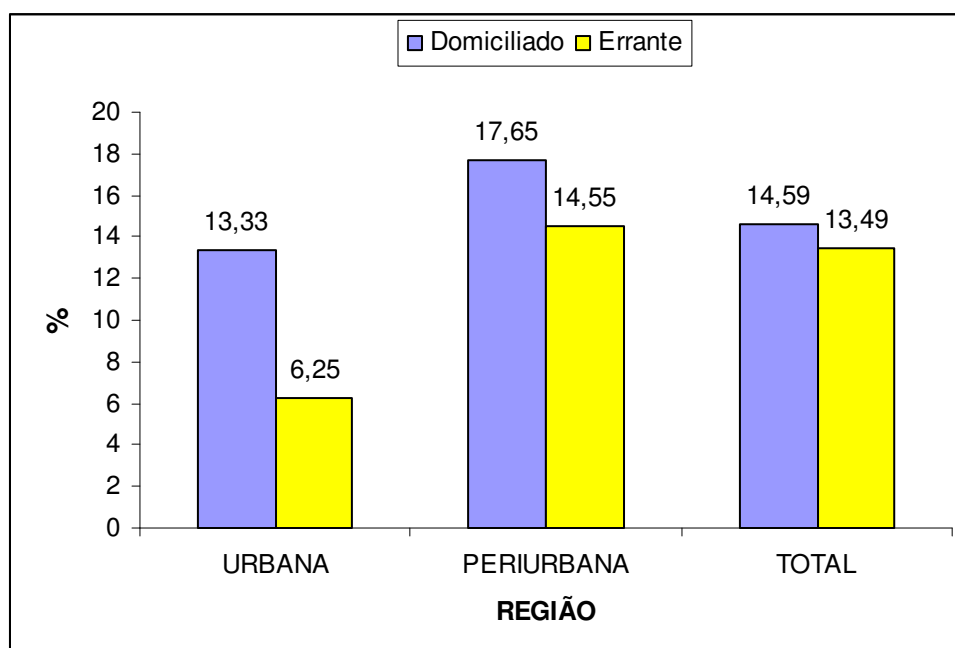


FIGURA 9 – PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*N. caninum* EM CÃES SADIOS ERRANTES E DOMICILIADOS DA REGIÃO URBANA E PERIURBANA DE CURITIBA, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL, CONFORME O TIPO DE CRIAÇÃO



ANEXO 2 – PREPARO DE LÂMINAS PARA REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

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

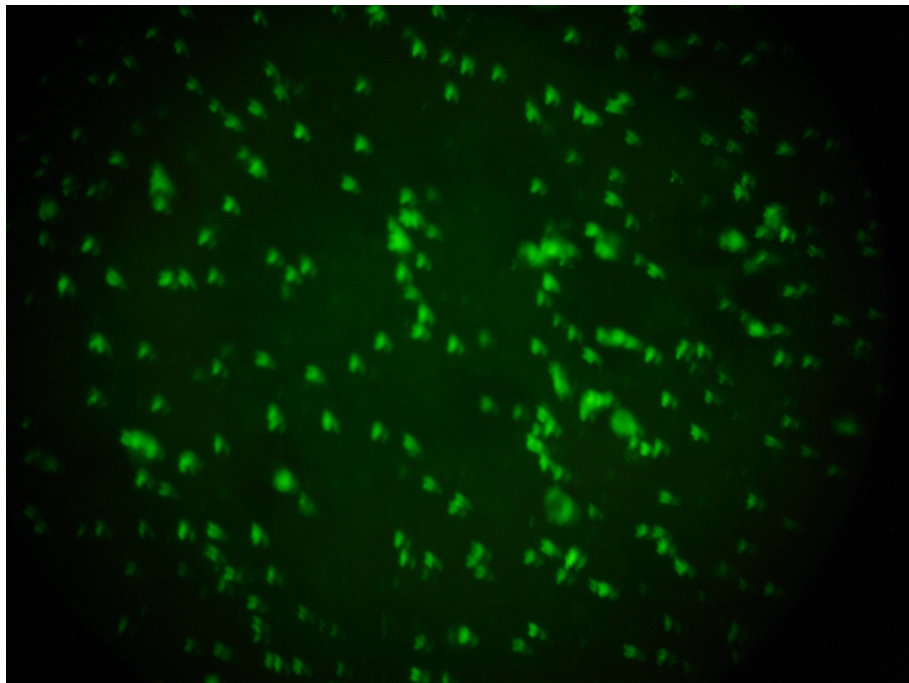
- a) Retirar o meio de cultivo das garrafas infectadas com os taquizoítas. Lavar a monocamada com PBS;
- b) Transferir a suspensão para um tubo de Falcon. Passar a suspensão em agulha (25x6) e seringa, três vezes, para romper as células e filtrar em filtro de 5µm para remover os restos celulares;
- c) 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 20µL 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.

ANEXO 3 – TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

- 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 μ 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 μ 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.

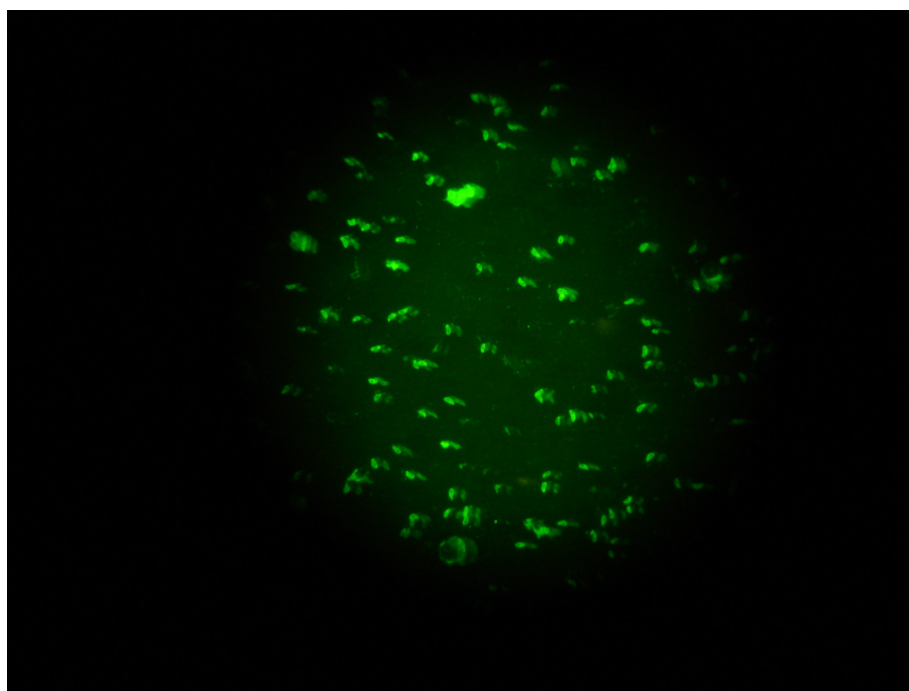
ANEXO 4 – REAÇÃO DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA

FIGURA 10 – CÃO SOROPOSITIVO PARA *N. caninum*. TAQUIZOÍTAS OBSERVADOS EM LÂMINA DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA, AUMENTO DE 400x



FONTE: FRIDLUND-PLUGGE, N. (2007)

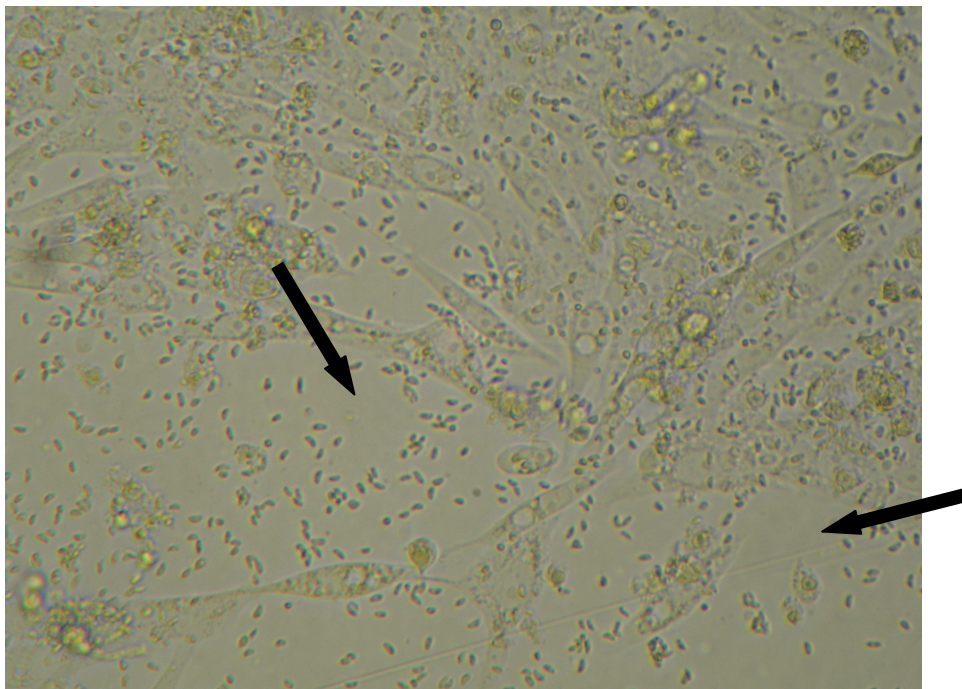
FIGURA 11 – CÃO SOROPOSITIVO PARA *N. caninum*. TAQUIZOÍTAS OBSERVADOS EM LÂMINA DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA, AUMENTO DE 400x



FONTE: FRIDLUND-PLUGGE, N. (2007)

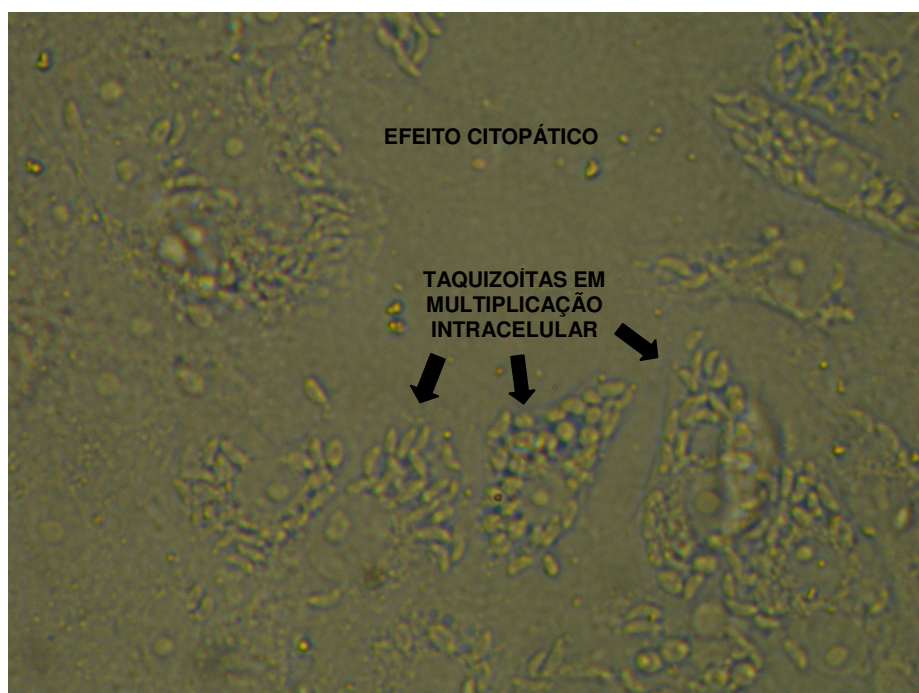
ANEXO 5 – IMAGENS DE *N. caninum* EM CULTIVO CELULAR

FIGURA 12 – EFEITO CITOPÁTICO CAUSADO POR *N. caninum* EM CULTIVO DE CÉLULAS VERO, AUMENTO DE 200x



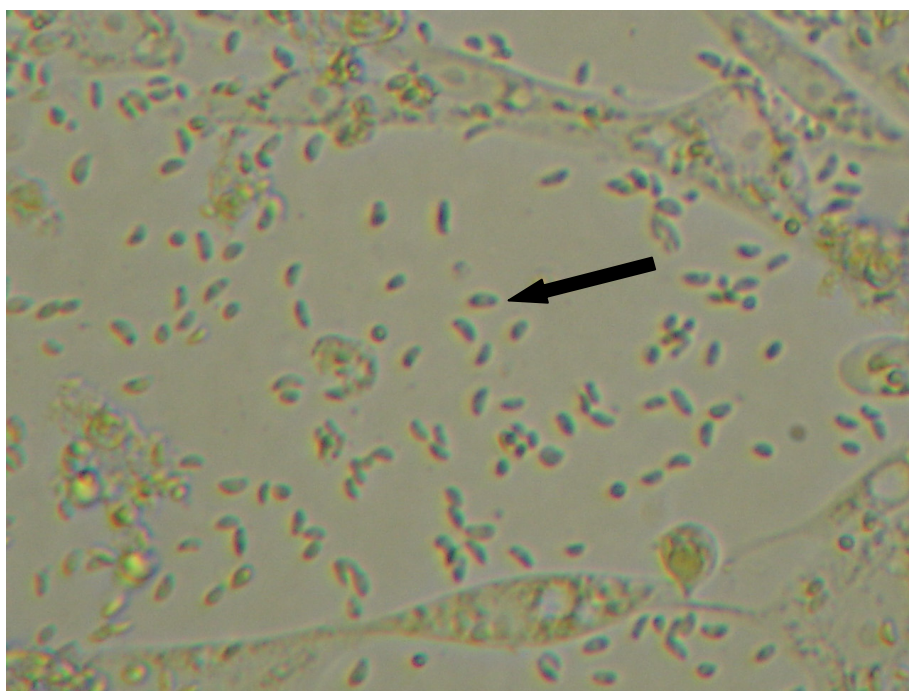
FONTE: FRIDLUND-PLUGGE, N. (2006)

FIGURA 13 – *Neospora caninum* EM MULTIPLICAÇÃO INTRACELULAR E ÁREAS COM EFEITO CITOPÁTICO CAUSADO POR *N. caninum* EM CULTIVO DE CÉLULAS VERO, AUMENTO DE 400x



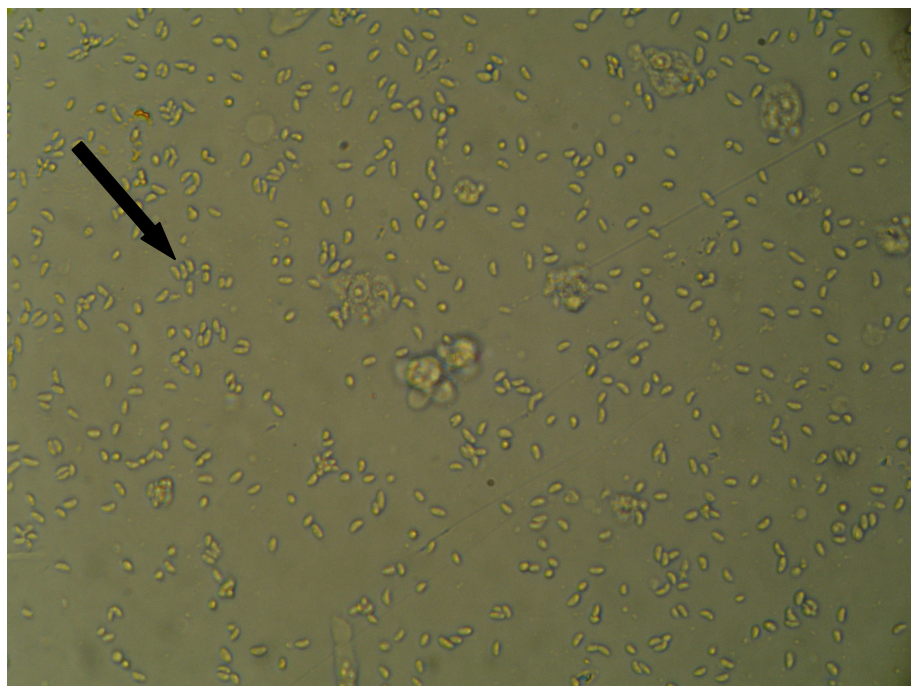
FONTE: FRIDLUND-PLUGGE, N. (2006)

FIGURA 14 – TAQUIZOÍTAS DE *N. caninum* EM CULTIVO CELULAR, AUMENTO DE 400X



FONTE: FRIDLUND-PLUGGE, N. (2006)

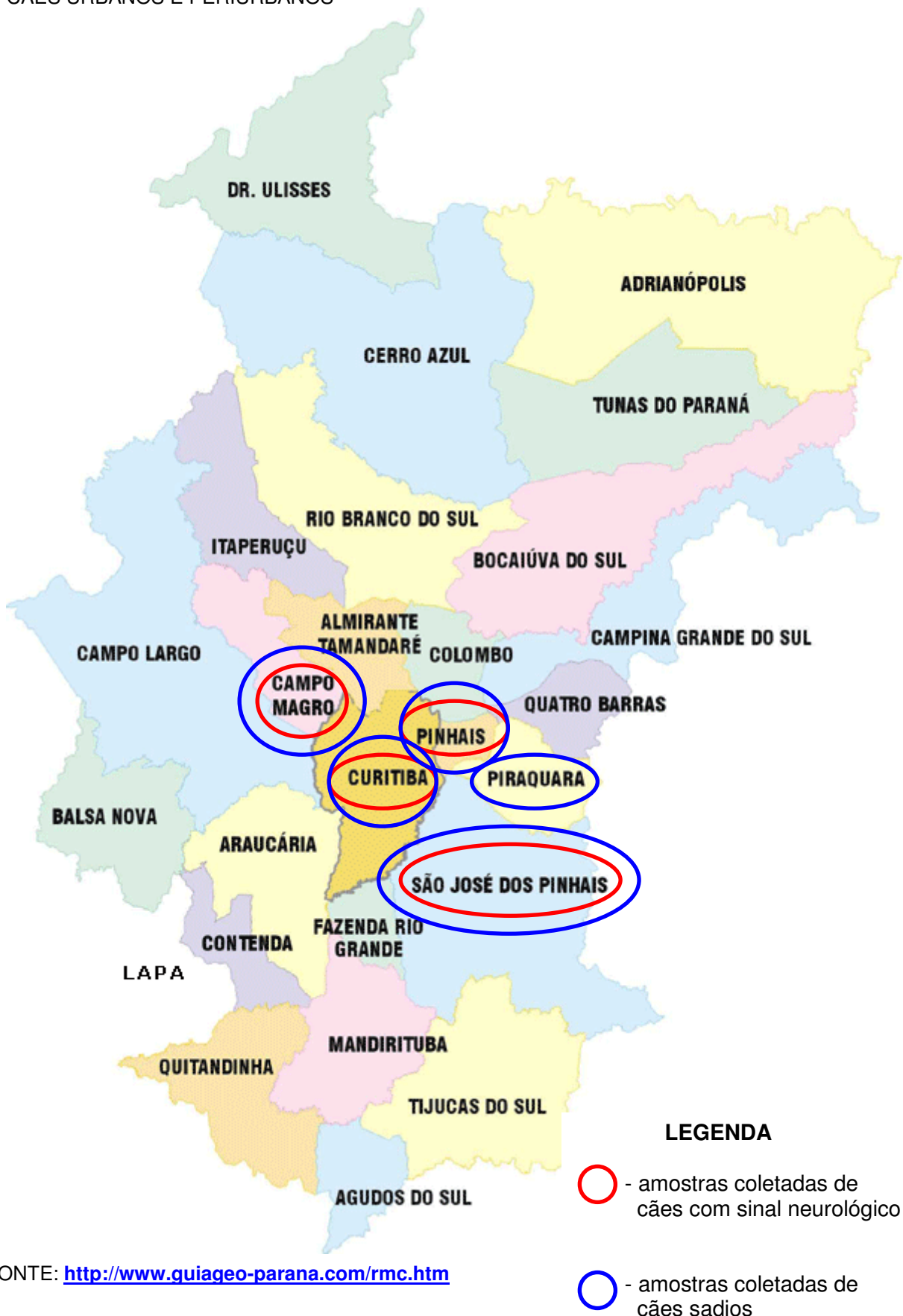
FIGURA 15 – TAQUIZOÍTAS DE *N. caninum* EM CULTIVO CELULAR APÓS DESTRUIÇÃO DO TAPETE DE CÉLULAS VERO, AUMENTO DE 200X



FONTE: FRIDLUND-PLUGGE, N. (2006)

ANEXO 6 – LOCAIS DE COLETA DAS AMOSTRAS

FIGURA 16 – MAPA DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA - COLETA DAS AMOSTRAS DE CÃES URBANOS E PERIURBANOS



FONTE: <http://www.guiageo-parana.com/rmc.htm>

FIGURA 17 – MAPA DE CASTRO E PALMEIRA (COLÔNIA WITTMARSUM) - COLETA DAS AMOSTRAS DE CÃES RURAIS

