

**RODRIGO ANTONIO PIVATTO**

*Neospora caninum:*  
INFECCÃO EXPERIMENTAL EM OVELHAS E AVALIAÇÃO DA  
POSSIBILIDADE DE TRANSMISSÃO CONGÊNITA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Barbosa de Moura

**LAGES, SC  
2017**

Pivatto, Rodrigo Antonio

*Neospora caninum*: INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM OVELHAS E AVALIAÇÃO DA POSSIBILIDADE DE TRANSMISSÃO CONGÊNITA / Rodrigo Antonio Pivatto – Lages, 2017.

88 p.: il.; 21 cm

Orientador: Anderson Barbosa de Moura

Inclui bibliografia.

Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2017.

1. *Neospora caninum*. 2. Ovinos. 3. Transmissão transplacentária. I. Pivatto, Rodrigo Antonio. II. Moura, Anderson Barbosa de. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título

Ficha catalográfica elaborada pelo aluno.

**RODRIGO ANTONIO PIVATTO**

*Neospora caninum*:  
INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM OVELHAS E AVALIAÇÃO DA  
POSSIBILIDADE DE TRANSMISSÃO CONGÊNITA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

**Banca examinadora**

Orientador: \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Anderson Barbosa de Moura  
Universidade do Estado de Santa Catarina- Lages, SC.

Membro: \_\_\_\_\_  
Prof. PhD Antonio Pereira de Souza  
Universidade do Estado de Santa Catarina- Lages, SC.

Membro: \_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Rosiléia Marinho de Quadros  
Universidade do Planalto Catarinense- Lages, SC.

**Lages- SC, 10/02/2017**



## AGRADECIMENTOS

As Três Pessoas da Santíssima Trindade.

A Nossa Senhora, mãe de Jesus e nossa Mãe.

A meu papai Valdemar, à minha mamãe Vanise, à minha irmã Vanessa.

A meu orientador, Prof. Dr. Anderson Barbosa de Moura.

Aos bolsistas de Iniciação Científica, Ruan Bruno Rodrigues e Jéssica Ceruti Reiter, do Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias do CAV/UEDESC.

As onze ovelhas mães e aos treze cordeiros deste projeto.

Ao carneiro 22, que por força instintiva, pulou a cerca e realizou a monta natural das ovelhas antes do esperado, o que tornou possível o trabalho ser realizado e concluído em tempo hábil.

Ao Instituto Federal Catarinense – *Campus* Concórdia.

Ao Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da UEDESC.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina - Chamada Pública FAPESC n. 04/2014 – Termo de Outorga 2015/293.

À Profa. Fernanda S. Flôres Vogel e à Patrícia Bräunig, da UFSM.

À Beatriz Nino e toda equipe do laboratório de Protozoologia da UEL.

Ao Prof. Ubirajara Maciel da Costa, que gentilmente permitiu o uso da estrutura do Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA) do CAV/UEDESC e à doutoranda Cláudia Appio Duarte, por todo apoio e paciência.

Ao Prof. Ricardo E. Mendes, Profa. Teane Silva e à bolsista Manoela M. Piva, do Laboratório de Patologia do IFC- *Campus* Concórdia.

À Roseli Jacobi, colega de trabalho.

Aos meus amigos Rodrigo, Everton e família.

À princesinha da Serra Catarinense- a cidade de Lages, mais uma vez.

A meu amor.

Enfim, a todos os anjinhos em forma de pessoas de luz que contribuíram para a realização deste trabalho.

Meu preito de gratidão.



*“Apareceu em seguida um grande sinal no Céu: uma Mulher revestida do Sol, tendo a Lua sob os pés e uma coroa de doze estrelas sobre a cabeça”.*

(Apocalipse 12.1)





## RESUMO

PIVATTO, R. A. *Neospora caninum*: INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM OVELHAS E AVALIAÇÃO DA POSSIBILIDADE DE TRANSMISSÃO CONGÊNITA. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal - Área de concentração: Saúde Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2017.

Com o objetivo de avaliar a possibilidade de transmissão congênita de *Neospora caninum* na espécie ovina e as implicações da infecção do agente em diferentes estádios da gestação, onze ovelhas férteis, sorologicamente negativas para *N. caninum* e *Toxoplasma gondii*, foram distribuídas em cinco grupos (A= 3 animais, B, C, D e E = 2 animais cada). O Grupo A foi inoculado intravenosamente com  $1 \times 10^7$  taquizoítos da cepa Nc-1 de *N. caninum*, sendo esta dose insuficiente para a detecção de soroconversão. Os animais dos grupos B, C e D foram inoculados com  $2 \times 10^7$  taquizoítos. O Grupo E foi mantido como controle (não inoculado). Os animais do grupo A foram inoculados 30 dias antes da cobertura, e os grupos B, C e D aos 65, 100 e 120 dias de gestação, respectivamente. Amostras de sangue dos animais foram colhidas nos dias -2, 2, 5, 7, 14, 21, 28, 35, 42 dias pós-infecção (DPI) para realização de hemogramas e obtenção de soro para a pesquisa de anticorpos IgG por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Exames clínicos (temperatura corporal e frequências cardíaca e respiratória) foram realizados diariamente entre -2 e 14 DPI e, na sequência, semanalmente até o final do experimento (42 DPI). Dos cordeiros nascidos, realizou-se exame clínico, colheita de sangue para realização da RIFI e hemograma. Após eutanásia, os cordeiros foram necropsiados e órgãos foram colhidos (SNC, fígado, coração, pulmão e placenta) para exame histopatológico. Todas as ovelhas dos Grupos B, C e D soroconverteram. Os animais dos grupos A e E mantiveram-se soronegativos ao longo de todo o experimento. Não foram observadas alterações clínicas ou hematológicas decorrentes da inoculação nas ovelhas, com exceção de uma ovelha do grupo B que apresentou retenção de placenta. Uma cordeira nascida do Grupo B foi sororreagente (pré-colostral) para *N. caninum* pela RIFI (1:400), indicando transmissão transplacentária, além de apresentar hipotermia e baixo peso ao nascer. Outro cordeiro do grupo B e um do grupo C também foram soropositivos, entretanto mamaram colostro. Um cordeiro do Grupo C (100 dias de gestação) e os dois cordeiros gêmeos do Grupo D (120 dias de gestação) não mamaram o colostro e foram soronegativos. Um cordeiro do Grupo D apresentou-se soronegativo mesmo após ter ingerido o colostro. Não houve alterações hematológicas e patológicas em nenhum dos cordeiros de todos os grupos. Os resultados demonstram ocorrência de transmissão transplacentária de *N. caninum* em uma ovelha inoculada aos 65 dias de gestação e sugerem que o mesmo ocorreu com outras duas ovelhas (inoculadas aos 65 e aos 100 dias de gestação), no entanto, testes com maior especificidade (PCR) são necessários para a confirmação da transmissão congênita nestes animais que, embora soropositivos, mamaram o colostro antes da colheita do sangue.

**Palavras-chave:** *Neospora caninum*. Ovinos. Transmissão transplacentária.



## ABSTRACT

PIVATTO, R. A. *Neospora caninum*: EXPERIMENTAL INFECTION IN EWES AND ASSESSMENT OF THE POSSIBILITY OF CONGENITAL TRANSMISSION. 2017. Dissertation (Animal Science Master's Degree - Area of Concentration: Animal Health) - State University of Santa Catarina. Animal Science Postgraduate Program, Lages, 2017.

In order to assess the possibility of congenital transmission of *Neospora caninum* in the ovine species and the implications of the infection of the agent in different stages of pregnancy, eleven fertile, serologically negative to *N. caninum* and *Toxoplasma gondii*, were distributed in five groups (A = 3 animals, B, C, D and E = 2 animals each one). Group A was inoculated intravenously with  $1 \times 10^7$  tachyzoites of *N. caninum* strain Nc-1, which was insufficient for the detection of seroconversion. The animals of groups B, C and D were inoculated with  $2 \times 10^7$  tachyzoites. Group E was maintained as control (not inoculated). The animals of group A were inoculated 30 days before mating, and groups B, C and D at 65, 100 and 120 days of pregnancy, respectively. Animal blood samples were collected on days -2, 2, 5, 7, 14, 21, 28, 35, 42 days postinfection (DPI) to perform complete blood count (CBC) and to obtain serum for the IgG antibody test by Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT). Clinical examinations (body temperature and heart and respiratory rates) were performed daily between -2 and 14 DPI and, thereafter, weekly until the end of the experiment (42 DPI). From lambs born alive, clinical examination, blood collection for IFAT and CBC were performed. After euthanasia, lambs were necropsied and organs (CNS, liver, heart, lung and placenta) were collected for histopathological examination. All the ewes of Groups B, C and D seroconverted. The animals of groups A and E remained seronegative throughout the experiment. No clinical or hematological changes were observed due to inoculation in the ewes, except for one ewe from group B that presented retained placenta. One lamb born from Group B was seroreagent (precolostral) to *N. caninum* by IFAT (1:400), indicating transplacental transmission, in addition to presenting hypothermia and low birth weight. Another lamb from group B and one from group C were also seropositive, but they drank colostrum. One lamb from Group C (100 days of gestation) and twin lambs from Group D (120 days of gestation) did not drink colostrum and were seronegative. One Group D lamb was seronegative even after ingesting colostrum. There were no haematological and pathological changes in any of the lambs of all groups. The results demonstrate the occurrence of transplacental transmission of *N. caninum* in a ewe inoculated at 65 days of gestation and suggest that the same occurred with two other ewes (inoculated at 65 and 100 days of gestation), however, higher specificity tests (PCR) are necessary for the confirmation of congenital transmission in these animals, which, although seropositive, drank colostrum prior to collection of blood.

**Keywords:** *Neospora caninum*. Sheep. Transplacental transmission.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Quadro 1-** Número de dias de gestação (individual e média de cada grupo) de ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum*. ..... 60
- Quadro 2-** Recíproca de títulos de anticorpos contra *Neospora caninum* em cordeiros nascidos de ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum*. ..... 61



## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1-** Resultado da média por grupo da aferição da temperatura retal das ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum* em calendário pré-fixado (-2 a 42 dias pós-inoculação). ..... 47
- Gráfico 2-** Resultado da média por grupo da frequência cardíaca (bpm) das ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum* em calendário pré-fixado (-2 a 42 dias pós-inoculação). ..... 48
- Gráfico 3 -** Resultado da média por grupo da frequência respiratória (mpm) das ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum* em calendário pré-fixado (-2 a 42 dias pós-inoculação). ..... 49
- Gráfico 4 -** Resultado da média por grupo da contagem de eritrócitos ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ) das ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum* em calendário pré-fixado (-2 a 42 dias pós-inoculação)..... 50
- Gráfico 5 -** Resultado da média por grupo de hemoglobina (g/dL) das ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum* em calendário pré-fixado (-2 a 42 dias pós-inoculação)... 51
- Gráfico 6 -** Resultado da média por grupo do hematócrito (%) das ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum* em calendário pré-fixado (-2 a 42 dias pós-inoculação)... 52
- Gráfico 7 -** Resultado da média por grupo da contagem de leucócitos ( $/\mu\text{L}$ ) das ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum* em calendário pré-fixado (-2 a 42 dias pós-inoculação). ..... 53

<b>Gráfico 8 - Resultado da média por grupo da contagem de neutrófilos (/μL) das ovelhas inoculadas com <math>1 \times 10^7</math> (Grupo A) ou <math>2 \times 10^7</math> (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de <i>Neospora caninum</i> em calendário pré-fixado (-2 a 42 dias pós-inoculação).</b> .....	<b>54</b>
<b>Gráfico 9 - Resultado da média por grupo da contagem de linfócitos (/μL) das ovelhas inoculadas com <math>1 \times 10^7</math> (Grupo A) ou <math>2 \times 10^7</math> (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de <i>Neospora caninum</i> em calendário pré-fixado (-2 a 42 dias pós-inoculação).</b> .....	<b>55</b>
<b>Gráfico 10 - Resultado da média por grupo da contagem de monócitos (/μL) das ovelhas inoculadas com <math>1 \times 10^7</math> (Grupo A) ou <math>2 \times 10^7</math> (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de <i>Neospora caninum</i> em calendário pré-fixado (-2 a 42 dias pós-inoculação).</b> .....	<b>56</b>
<b>Gráfico 11 - Resultado da média por grupo da contagem de eosinófilos (/μL) das ovelhas inoculadas com <math>1 \times 10^7</math> (Grupo A) ou <math>2 \times 10^7</math> (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de <i>Neospora caninum</i> em calendário pré-fixado (-2 a 42 dias pós-inoculação).</b> .....	<b>57</b>
<b>Gráfico 12 - Resultado da aferição da temperatura retal individual dos cordeiros nascidos de ovelhas inoculadas com <math>1 \times 10^7</math> (Grupo A) ou <math>2 \times 10^7</math> (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de <i>Neospora caninum</i>.</b> .....	<b>65</b>
<b>Gráfico 13 – Resultado da frequência cardíaca (bpm) individual dos cordeiros nascidos de ovelhas inoculadas com <math>1 \times 10^7</math> (Grupo A) ou <math>2 \times 10^7</math> (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de <i>Neospora caninum</i>.</b> .....	<b>66</b>
<b>Gráfico 14 – Resultado da frequência respiratória (mpm) individual dos cordeiros nascidos de ovelhas inoculadas com <math>1 \times 10^7</math> (Grupo A) ou <math>2 \times 10^7</math> (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de <i>Neospora caninum</i>.</b> .....	<b>67</b>
<b>Gráfico 15 - Resultado da contagem de eritrócitos (<math>10^6/\mu\text{L}</math>) individual dos cordeiros nascidos de ovelhas inoculadas com <math>1 \times 10^7</math> (Grupo A) ou <math>2 \times 10^7</math> (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de <i>Neospora caninum</i>.</b> .....	<b>68</b>



<b>Gráfico 16 - Resultado da hemoglobina (g/dL) individual dos cordeiros nascidos de ovelhas inoculadas com <math>1 \times 10^7</math> (Grupo A) ou <math>2 \times 10^7</math> (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de <i>Neospora caninum</i>. .....</b>	<b>69</b>
<b>Gráfico 17 - Resultado do hematócrito (%) individual dos cordeiros nascidos das ovelhas inoculadas com <math>1 \times 10^7</math> (Grupo A) ou <math>2 \times 10^7</math> (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de <i>Neospora caninum</i>. .....</b>	<b>70</b>
<b>Gráfico 18 - Resultado da contagem de leucócitos (<math>\mu\text{L}</math>) individual dos cordeiros nascidos das ovelhas inoculadas com <math>1 \times 10^7</math> (Grupo A) ou <math>2 \times 10^7</math> (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de <i>Neospora caninum</i>. .....</b>	<b>71</b>
<b>Gráfico 19 - Resultado da contagem de neutrófilos (<math>\mu\text{L}</math>) individual dos cordeiros nascidos das ovelhas inoculadas com <math>1 \times 10^7</math> (Grupo A) ou <math>2 \times 10^7</math> (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de <i>Neospora caninum</i>. .....</b>	<b>72</b>
<b>Gráfico 20 - Resultado da contagem de linfócitos (<math>\mu\text{L}</math>) individual dos cordeiros nascidos das ovelhas inoculadas com <math>1 \times 10^7</math> (Grupo A) ou <math>2 \times 10^7</math> (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de <i>Neospora caninum</i>. .....</b>	<b>73</b>
<b>Gráfico 21 - Resultado da contagem de monócitos (<math>\mu\text{L}</math>) individual dos cordeiros nascidos das ovelhas inoculadas com <math>1 \times 10^7</math> (Grupo A) ou <math>2 \times 10^7</math> (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de <i>Neospora caninum</i>. .....</b>	<b>74</b>
<b>Gráfico 22 - Resultado da contagem de eosinófilos (<math>\mu\text{L}</math>) individual dos cordeiros nascidos das ovelhas inoculadas com <math>1 \times 10^7</math> (Grupo A) ou <math>2 \times 10^7</math> (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de <i>Neospora caninum</i>. .....</b>	<b>75</b>



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Resultado da sorologia (RIFI, 1:50) para a pesquisa de anticorpos IgG contra *Neospora caninum* em ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1..... 44**
- Tabela 2 - Recíproca de títulos de anticorpos contra *Neospora caninum* em ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1..... 44**



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bpm	Batimentos por Minuto
mpm	Movimentos por Minuto
HDs	Hospedeiros definitivos
HIIs	Hospedeiros intermediários
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
PCR	Reação de Cadeia em Polimerase
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
Nc-Beef	<i>Neospora caninum</i> cepa Nc-Beef
Nc-1	<i>Neospora caninum</i> cepa Nc-1
Nc-2	<i>Neospora caninum</i> cepa Nc-2
Nc-Liverpool	<i>Neospora caninum</i> cepa Nc-Liverpool
G	Força Centrífuga
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 (meio de cultura celular)
IV	Intravenosa
PBS	Tampão Fosfato Salino
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
DPI	Dias Pós-Inoculação
IgG	Imunoglobulina do tipo G
SNC	Sistema Nervoso Central
OPG	Ovos por grama de fezes



## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{L}$	Microlitros
g	Gramas
dL	Decilitros
%	Por cento
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$\text{cm}^2$	Centímetros quadrados
$\text{CO}_2$	Gás carbônico
mL	Mililitros
$\mu\text{m}$	Micrômetros
$\geq$	Maior ou igual a
®	Marca registrada
mg	Miligramas
kg	Quilograma





## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>1</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>29</b>
1.1	ASPECTOS GERAIS.....	29
1.2	NEOSPOROSE EM OVINOS .....	30
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
2.1	GERAL.....	35
2.2	ESPECÍFICOS .....	35
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
3.1	LOCAL E SELEÇÃO DOS ANIMAIS .....	37
3.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	37
3.3	OBTENÇÃO DO INÓCULO .....	38
3.4	DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO .....	39
3.5	COLHEITA DE AMOSTRAS DE SANGUE E EXAMES CLÍNICOS .....	39
<b>3.5.1</b>	<b>Colheitas das amostras de sangue .....</b>	<b>39</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Exames clínicos .....</b>	<b>40</b>
3.6	SOROLOGIA.....	41
3.7	HEMOGRAMAS .....	41
3.8	CORDEIROS .....	42
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
4.1.	INFECÇÃO EXPERIMENTAL .....	43
<b>4.1.1</b>	<b>Avaliação por meio da sorologia .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Avaliações clínicas das ovelhas.....</b>	<b>45</b>
4.1.2.1	<i>Temperatura retal (°C)</i> .....	45
4.1.2.2	<i>Frequência cardíaca (bpm)</i> .....	47
4.1.2.3	<i>Frequência respiratória (mpm)</i> .....	48
<b>4.1.3</b>	<b>Hemograma das ovelhas .....</b>	<b>49</b>
4.1.3.1	<i>Eritrócitos (<math>\times 10^6/\mu\text{L}</math>)</i> .....	49
4.1.3.2	<i>Hemoglobina (g/dL)</i> .....	51
4.1.3.3	<i>Hematócrito (%)</i> .....	51
4.1.3.4	<i>Leucócitos (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</i> .....	53
4.1.3.4.1	<i>Neutrófilos (<math>/\mu\text{L}</math>)</i> .....	54

4.1.3.4.2 Linfócitos (/μL) .....	55
4.1.3.4.3 Monócitos (/μL) .....	55
4.1.3.4.4 Eosinófilos (/μL) .....	57
4.1.3.4.5 Basófilos (/μL).....	58
<b>4.2 TRANSMISSÃO CONGÊNITA .....</b>	<b>58</b>
<b>4.2.1 Partos.....</b>	<b>58</b>
<b>4.2.2 Sorologia dos cordeiros .....</b>	<b>60</b>
<b>4.2.3 Avaliações clínicas dos cordeiros .....</b>	<b>64</b>
4.2.3.1 <i>Temperatura retal (°C)</i> .....	64
4.2.3.2 <i>Frequência cardíaca (bpm)</i> .....	65
4.2.3.3 <i>Frequência respiratória (mpm)</i> .....	66
<b>4.2.4 Hemograma dos cordeiros .....</b>	<b>68</b>
4.2.4.1 <i>Eritrócitos (<math>\times 10^6/\mu\text{L}</math>)</i> .....	68
4.2.4.2 <i>Hemoglobina (g/dL)</i> .....	69
4.2.4.3 <i>Hematócrito (%)</i> .....	70
4.2.4.4 <i>Leucócitos (/μL)</i> .....	71
4.2.4.4.1 <i>Neutrófilos (/μL)</i> .....	72
4.2.4.4.2 <i>Linfócitos (/μL)</i> .....	73
4.2.4.4.3 <i>Monócitos (/μL)</i> .....	74
4.2.4.4.4 <i>Eosinófilos (/μL)</i> .....	75
4.2.4.4.5 <i>Basófilos (/μL)</i> .....	76
<b>4.2.5 Avaliação histopatológica .....</b>	<b>76</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>81</b>

## INTRODUÇÃO

O rebanho ovino no Brasil é composto de 18.410.551 cabeças. O maior plantel é encontrado na Região Nordeste, seguido pelas Regiões Sul, Centro-Oeste, Sudeste e Norte. A Região Sul corresponde a aproximados 26,5% desse total. O Estado de Santa Catarina abriga 305.647 animais, sendo a Mesorregião Oeste responsável por aproximadamente 46% do efetivo catarinense de ovinos (IBGE, 2016).

O Brasil apresentou abate estimado de 5.366.000 cabeças no ano de 2013. O país foi detentor de aproximadamente 1,4% do rebanho mundial no ano de 2014. Nessa condição, ocupou, portanto, a 18ª colocação de entre os maiores produtores mundiais. Embora em ritmo crescente, o consumo *per capita* de carne ovina no Brasil ainda é pequeno (estimado em 700g/habitante/ano) se comparado ao consumo da carne bovina, suína e de aves (FAOSTAT, 2016). Segundo Madruga et al. (2005), o Brasil possui fortes vantagens para competir com os maiores produtores de carne ovina do mundo, dispondo de grande extensão territorial, clima tropical, mão de obra barata e fartura de alimentação natural. Pode-se inferir que a ovinocultura para carne é uma atividade promissora e que está em pleno desenvolvimento, tal como relatou Viana (2008), argumentando também sobre a expansão do consumo da carne ovina.

Dentro desse processo de crescimento da ovinocultura nacional, a sanidade dos rebanhos ocupa cada vez mais a pauta dos agentes envolvidos na cadeia produtiva. Nesse aspecto, doenças que tradicionalmente fazem parte do manejo sanitário vêm se juntar a enfermidades emergentes, dentre as quais se destaca a neosporose, principalmente pelas alterações reprodutivas que esta pode causar.

Helmick et al. (2002) e Otter et al. (1997) citaram que o conhecimento do modo de transmissão da neosporose em ovinos é limitado, bem como Dubey e Schares (2011) relataram que a importância clínica, econômica e epidemiológica da infecção por *N. caninum* na espécie ovina ainda permanece incerta. Frente a esse pressuposto, buscam-se melhorias para elucidar o que os autores expuseram.

Dessa forma, objetivou-se aprimorar o conhecimento da neosporose na espécie supracitada, particularmente no aspecto reprodutivo, a fim de que se possam adotar medidas profiláticas para a doença em questão.



## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 ASPECTOS GERAIS

*Neospora caninum*, agente etiológico da neosporose, foi descrito e proposto por Dubey et al. (1988). É um protozoário pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoea, Ordem Eucoccidiida e Família Sarcocystidae (DUBEY et al., 2002). Foi identificado em 1984 (DUBEY et al., 1988), sendo anteriormente classificado como *Toxoplasma gondii*, em razão de suas similaridades taxonômicas. Embora possa ser confundido com o *T. gondii*, admite-se que seja diferenciado deste por sua ultraestrutura, bem como por suas propriedades antigênicas (BAAR et al., 1991).

É um parasito intracelular obrigatório e possui um ciclo heteroxeno facultativo, sendo transmitido também por via vertical. Possui três formas de vida em seu ciclo: os taquizoítos e os cistos teciduais contendo bradizoítos, que podem ser encontrados nos tecidos dos hospedeiros intermediários, e os oocistos, que são a forma de resistência, excretados pelos hospedeiros definitivos (HDs), após a fase sexuada de reprodução dos parasitos e que são encontrados no ambiente. Os hospedeiros intermediários (HIs) contaminam-se ingerindo oocistos esporulados do parasito que foram eliminados no ambiente pelos hospedeiros definitivos. Estes, por sua vez, ingerem carcaças, fetos e restos de placentas contaminados. Nos hospedeiros definitivos ocorre a fase reprodutiva do parasito, o que origina os oocistos que serão eliminados no ambiente, completando, assim, o ciclo de transmissão horizontal. O *N. caninum* demanda um hospedeiro definitivo, onde se dá o ciclo enteroepitelial, que resulta na produção e eliminação para o meio, junto às fezes, de seus oocistos (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

O cão (*Canis lupus familiaris*), o coiote (*Canis latrans*), o dingo-australiano (*Canis lupus dingo*) e o lobo-cinzento (*Canis lupus*) são as únicas espécies reconhecidas como hospedeiros definitivos até o momento (McALLISTER et al., 1998; GONDIM et al., 2004; KING et al., 2010; DUBEY et al., 2011). No Brasil, Nascimento (2015) observou a presença de DNA de *N. caninum* em cérebro de 12,2% (6/49) de raposas-do-campo (*Pseudalopex vetulus*) pressupondo, assim, essa espécie como um HI. Outros canídeos silvestres apresentam evidências sorológicas que permitem pressupor que possam atuar, além de HIs, como hospedeiros definitivos do *N. caninum*.

Dubey e Schares (2011) citaram uma vasta gama de animais selvagens e domésticos que foram expostos ao *N. caninum* e que podem servir de hospedeiros intermediários. No

entanto, conseguiu-se isolar o agente viável em apenas poucos hospedeiros (bovino, ovino, búfalo, cão, cavalo, bisão).

Embora não seja considerada uma zoonose, existem relatos da ocorrência de anticorpos contra o agente em humanos (ALMEIDA, 2004; LOBATO et al., 2006). Experimentos realizados com primatas, inoculados com taquizoítos durante a gestação, demonstraram a transmissão congênita do protozoário. A manifestação clínica da neosporose nesses primatas foi similar à toxoplasmose congênita em seres humanos (BAAR et al., 1994).

A transmissão horizontal, quando os HIs ingerem oocistos provenientes do meio ambiente, é de notável importância, pois se estima que um único exemplar de hospedeiro definitivo seja capaz de eliminar aproximadamente 500.000 oocistos após a ingestão de uma única carcaça contaminada, o que seria suficiente para infectar milhares de animais em um rebanho (GONDIM et al., 2002).

A transmissão vertical, também denominada de infecção transplacentária, subdivide-se em duas formas: a) endógena e b) exógena. A endógena compreende transmissão fetal a partir da recrudescência da infecção crônica materna, havendo, portanto, reativação da forma encistada do parasito, cursando com parasitemia sistêmica. Já a exógena dá-se quando ocorre a infecção da fêmea gestante, por meio da ingestão de oocistos, e posterior fase aguda da doença e transmissão ao feto (TREES; WILLIAMS, 2005).

## 1.2 NEOSPOROSE EM OVINOS

O primeiro relato histórico de neosporose em ovinos deu-se no ano de 1975 (DUBEY et al., 1990), quando Hartley e Bridge, na Inglaterra, suspeitaram de toxoplasmose como a *causa mortis* de um cordeiro de uma semana de idade, que foi a óbito com sinais neurológicos. Dubey et al. (1990), todavia, reexaminaram tecidos do mesmo cordeiro e por meio de imunistoquímica e microscopia eletrônica comprovaram que o cordeiro padecia de neosporose, no lugar de toxoplasmose. Esses autores reforçaram a ideia de que tais sinais clínicos são idênticos àqueles encontrados em bezerros infectados por *N. caninum*.

Segundo Dubey e Schares (2011), a neosporose em ovinos ocasionalmente pode causar aborto, mortalidade neonatal de cordeiros e talvez sinais clínicos em animais adultos, este último confirmado por Bishop et al. (2010), na Austrália, quando encontraram DNA do parasito no cérebro de uma ovelha da raça Merino que apresentara sinais neurológicos.

Estudos da neosporose ovina no Brasil são escassos, e em sua grande maioria consistem em dados de soroprevalência. Mesmo assim, em algumas regiões, esses números ainda não são conhecidos.

Em nível internacional, enquanto na Nova Zelândia a prevalência de sororreagentes para *N. caninum* foi de apenas 0,6% (REICHEL; ROSS; McALLISTER, 2008), na Espanha, Panadero et al. (2010) encontraram um índice de 57%.

Otter et al. (1997) e Helmick et al. (2002), ambos na Grã-Bretanha, não verificaram associação ou observaram raro envolvimento (com somente 0,45% de animais positivos em 660 casos de abortos) de *N. caninum* em abortos ovinos, respectivamente. Na Eslováquia, Spilovska e Reiterova (2008) concluíram que a ocorrência esporádica de neosporose ovina tem baixo impacto em perdas econômicas e reprodutivas. No Brasil, Romanelli et al. (2007), em Guarapuava, Estado do Paraná, e Soares et al. (2009), em Mossoró, Rio Grande do Norte, também não verificaram relação entre soroprevalência para neosporose e problemas reprodutivos.

Ao contrário, diversos outros pesquisadores têm observado correlação entre neosporose e desordens reprodutivas em ovinos. Jolley et al. (1999) descreveram a ocorrência de repetidos abortos em ovelhas em função da infecção experimental por *N. caninum*. Kobayashi et al. (2001) observaram a ocorrência de cistos teciduais em cérebros de dois fetos gêmeos de ovinos, assim como na mãe destes, e confirmaram transmissão vertical do agente. Hassig et al. (2003) detectaram *N. caninum* no cérebro de quatro de 20 fetos ovinos abortados. O rebanho apresentou soroprevalência de 10,3% (RIFI, 1:160). West et al. (2006), na Nova Zelândia, verificaram correlação positiva entre aborto e sorologia positiva para *N. caninum* em ovinos. Na Itália, Masala et al. (2007) verificaram o envolvimento de *N. caninum* em sete (2%) de 366 abortos ovinos. Howe et al. (2008), também na Nova Zelândia, observaram associação entre infecção por *N. caninum* e aborto em ovinos. Positividade (RIFI, 1:100) foi observada em 26%, 67% e 100% dos animais que abortaram nas três diferentes propriedades avaliadas. Estes autores também detectaram o DNA do parasito por PCR no cérebro fetal, na placenta e no sangue materno de diversos casos de aborto das propriedades avaliadas.

No exame histológico de ovelhas da Nova Zelândia com problemas de aborto, Howe et al. (2008) verificaram mineralização multifocal do estroma, além de necrose e infiltração de neutrófilos na base da carúncula materna. Os placentomas maternos apresentavam mineralização granular crônica com pequenas áreas de necrose multifocal do epitélio coriônico. Nenhum cisto do protozoário foi observado no cérebro dos fetos, porém os animais foram testados pelo ELISA e pela PCR, que confirmaram a infecção por *N. caninum*.

Em uma pesquisa realizada por Rossi et al. (2011), no Município de Uberlândia, Estado de Minas Gerais, a taxa de prevalência pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) foi de 47,1%, que pode ser considerada alta, de acordo com Dubey e Schares (2011). Em contrapartida, índices menores estão descritos, como na Região Serrana Catarinense (7,1%), de acordo com Moura et al. (2014) e no Município de Mossoró, Estado do Rio Grande do Norte, com índice de 1,8%, relatado por Soares et al. (2009).

No Planalto Serrano de Santa Catarina, Moura et al. (2014) relataram 7% de soroprevalência (92/1308), por meio da RIFI ( $\geq 1:50$ ) com títulos de anticorpos variando de 1:50 até 1:3200. Em 42,4% (39/92) das propriedades foi detectado, no mínimo, um animal soropositivo para *N. caninum*.

Para Syed-Hussein et al. (2013), a transmissão venérea do agente em questão, de carneiros experimentalmente infectados para ovelhas cobertas por monta natural é pouco provável.

*N. caninum* é um dos agentes microbianos com maior capacidade de transpassar a placenta na espécie bovina (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Em se tratando da patogenia da transmissão vertical do agente especificadamente na espécie ovina, há apenas poucos estudos internacionais (DUBEY; LINDSAY, 1990; McALLISTER et al., 1996; BUXTON et al., 1997; 1998; 2001; SYED-HUSSEIN et al., 2015; ARRANZ-SOLÍS et al., 2015; 2016), cujos experimentos ressaltam a importância na virulência do agente na infecção transplacentária.

Dubey e Lindsay (1990) inocularam experimentalmente duas ovelhas com cerca de três meses de gestação com  $1,5 \times 10^7$  taquizoítos da cepa Nc-1, sendo uma delas por via intravenosa e a outra por via intramuscular. Ambas abortaram gêmeos aos 25 e 26 dias pós-inoculação, respectivamente. Esses autores detectaram lesões no cérebro, medula espinhal, músculos e placenta. A encefalite foi caracterizada por múltiplos focos de gliose, hemorragia, necrose, manguito perivascular e infiltrado de células mononucleares. Miosite foi verificada em três dos quatro fetos e, em um deles, taquizoítos estavam presentes no músculo da perna.

Em um estudo similar realizado por Buxton et al. (1998), com o mesmo isolado, porém com dosagem menor ( $5 \times 10^5$  taquizoítos), as ovelhas que foram inoculadas nos primeiros 45 dias pós-concepção tiveram fetos mortos e reabsorvidos, naquelas inoculadas aos 65 dias de gestação houve abortos e, aos 90 dias, abortos, cordeiros fracos ou clinicamente normais.

McAllister et al. (1996) desenvolveram outra pesquisa mais complexa, com duas concentrações de inóculo ( $1,7 \times 10^5$ – $1,7 \times 10^6$  taquizoítos) e dois tipos de isolado (Nc-2 e Nc-



Liverpoll) obtendo resultados semelhantes. Lesões histopatológicas foram evidenciadas em quase todos os fetos abortados, mesmo naqueles em avançado estado de autólise ou mumificados. Dentre eles foram encontradas, nas seguintes percentagens, lesões no cérebro (90%), na placenta (88%), na língua ou diafragma (42%), no coração (22%), no fígado (28%) e no pulmão (12%). No entanto, chegaram à conclusão de que a titulação da dose administrada não foi o fator principal da virulência do parasito, mas sim o estágio da gestação em que a ovelha se encontrara quando ocorreu a infecção.

Enquanto Jolley et al. (1999) citaram que ovelhas infectadas experimentalmente no ano anterior não foram capazes de prevenir transmissão congênita quando desafiadas novamente aos 67 dias de gestação, Buxton et al. (2001) demonstraram que a infecção primária de ovelhas, durante a prenhez, levou todos os fetos a óbito enquanto que a inoculação prévia das ovelhas (antes da cobertura) não provocou nenhuma mortalidade e ainda conferiu proteção a um subsequente desafio durante a gestação, sugerindo forte componente imunológico na resposta à infecção de ovinos pelo *N. caninum*.

Ao contrário, Syed-Hussein et al. (2015) afirmaram que há transmissão congênita tanto em cordeiros cujas mães foram inoculadas experimentalmente antes da cobertura natural, quanto em cordeiros nas gestações subsequentes, sendo as mães reinoculadas ou não. Assim, os autores demonstraram que embora não houvesse transmissão congênita em ovelhas infectadas experimentalmente dois meses antes de emprenhá-las, esse ato não forneceu nenhuma proteção contra infecções nas próximas gestações, ocorrendo prontamente transmissão vertical uma vez que a ovelha fosse infectada.

Em ovelhas infectadas de forma experimental com  $1 \times 10^6$  taquizoítos da cepa Nc-Spain7 de *N. caninum* aos 40, 90 e 120 dias de gestação, apresentaram 100% de morte fetal no primeiro grupo, 100% de aborto no segundo e, no terceiro, cordeiros nascidos viáveis ou fracos, sorologicamente positivos ou não (ARRANZ-SOLÍS et al., 2015).

Em estudo sobre a resposta do sistema imune de ovelhas inoculadas experimentalmente em três estádios da gestação (40, 90 e 120 dias), Arranz-Solís et al. (2016) sugeriram que os abortos encontrados no primeiro trimestre (40 dias) se devem à intensa multiplicação do parasito no feto; no segundo trimestre (90 dias) os abortos ocorrem em virtude de severas lesões causadas na placenta; e no último trimestre (120 dias) não houve aborto, pois, segundo os autores, o sistema imune do feto estaria mais maduro e também pelo fato do curto espaço de tempo entre a infecção e o nascimento do cordeiro.

No Brasil, Socarrás (2001) pesquisou os efeitos da infecção experimental em ovelhas deslanadas com a cepa “Nc-Beef”, para servir como modelo experimental no estudo da

infecção em bovinos. Os cordeiros nascidos apresentaram anticorpos contra *N. caninum*, o que indica que houve infecção transplacentária. Neste estudo, todavia, não ocorreu aborto, o que contrasta com as pesquisas realizadas por McAllister et al. (1996) e Buxton et al. (1997; 1998). Socarrás (2001) argumentou que uma possível explicação para esse fato está em que o número de ovelhas utilizado foi menor em comparação aos trabalhos estrangeiros supracitados.

Silva (2005) acompanhou proles de várias gestações de ovelhas deslanadas, experimentalmente infectadas, e sugeriu transmissão vertical do agente no rebanho sem, no entanto, causar sinais clínicos ou abortamento, apesar das lesões características encontradas.

Contra a forma de cistos teciduais, o tratamento com toltrazurila não foi efetivo em cordeiros congenitamente infectados, cujas mães foram infectadas experimentalmente (SYED-HUSSAIN et al., 2015).

No tocante à vacina contra o agente, O'Handley et al. (2003) obtiveram certa redução na percentagem de nascimento de cordeiros positivos. No entanto, nenhuma interferência na taxa de natalidade foi observada. Em estudo realizado por Jenkins, Tuo e Dubey (2004), percebeu-se que a vacina preveniu a mortalidade de cordeiros, porém não houve o impedimento da transmissão ao feto. Innes et al. (2001) reportaram que a vacinação de ovelhas contra *T. gondii* não impediu a morte fetal quando os animais foram desafiados com taquizoítos de *N. caninum*, embora os animais vacinados tenham apresentado quadro febril menos intenso que aqueles desafiados, mas não vacinados. Isso confirma a hipótese de que não ocorre imunidade cruzada entre esses dois protozoários.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Aprimorar o conhecimento sobre a patogenia da neosporose na espécie ovina, particularmente no aspecto reprodutivo, a fim de que se possam adotar medidas profiláticas para a doença em questão.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- a) Verificar se ocorre transmissão transplacentária e em qual fase da gestação pode ser mais comum.
- b) Analisar em qual estágio de gestação a infecção por *N. caninum* causa mais danos.
- c) Estudar qual é a implicação da infecção materna para a prole em diferentes fases gestacionais.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado sob protocolo n. 07/2015 pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Federal Catarinense (IFC) – *Campus* Concórdia, em reunião de 14 de agosto de 2015.

#### 3.1 LOCAL E SELEÇÃO DOS ANIMAIS

O experimento a campo realizou-se nas dependências do setor de Zootecnia II (médios animais), da Fazenda-Escola desta Instituição, no Município de Concórdia, Estado de Santa Catarina.

A princípio, foram colhidas amostras de sangue de 53 matrizes ovinas de corte, da raça Texel, por meio de punção venosa jugular em tubos Vacuteiner® sem anticoagulante e logo em seguida centrifugadas por 15 minutos a 1.225 G, a fim de separar o coágulo de sangue do soro. Este, por sua vez, foi aliqotado em microtubos, identificado, congelado e armazenado a -20°C para posterior análise no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), no Município de Lages, Santa Catarina.

Utilizou-se como forma de diagnóstico a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), por ser o teste de referência para a pesquisa de anticorpos IgG contra *N. caninum* (BJÖRKMAN; UGGLA, 1999).

Ressalte-se que o rebanho em questão nunca apresentou histórico de quaisquer problemas reprodutivos e abortos, bem como não houve contato com cães domésticos. A partir dos resultados prévios, foram escolhidas onze ovelhas, pluríparas, sorologicamente negativas para *N. caninum* e *T. gondii*. Nos anos anteriores, todas as ovelhas tiveram partos eutócicos e pariram cordeiros hígidos.

#### 3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais incluídos no experimento foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos (Grupo A = 3 animais e Grupos B, C, D e E = 2 animais). O grupo A foi inoculado por via intravenosa com  $1,0 \times 10^7$  taquizoítos da cepa Nc-1 de *N. caninum* cultivados *in vitro*, que não soroconverteu em momento algum. Nos grupos B, C e D, portanto, a

concentração foi aumentada para o dobro ( $2,0 \times 10^7$  taquizoítos IV) por animal. A inoculação procedeu-se da seguinte forma:

- a) Grupo A (aos 30 dias antes da cobertura);
- b) Grupo B (aos 65 dias pós-concepção);
- c) Grupo C (aos 100 dias pós-concepção);
- d) Grupo D (aos 120 dias pós-concepção); e
- e) Grupo E (grupo-controle, não inoculado).

Os animais foram mantidos nas condições rotineiras de manejo, em piquetes de pastagem no período diurno e, à noite, fechados em galpão de concreto ventilado com cama de maravalha. Foram alimentados com pastagem, feno, sal mineral e água fresca *ad libitum*. As fêmeas foram submetidas à monta controlada pelo carneiro (também sorologicamente negativo para *N. caninum* e *T. gondii*), a partir da ocorrência de cio natural.

### 3.3 OBTENÇÃO DO INÓCULO

A cepa original de Nc-1 de *N. caninum* foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Protozoologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL), do Município de Londrina, Estado do Paraná. Já o cultivo celular para obtenção do inóculo foi realizado no Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA) do Centro de Ciências Agroveterinárias da UDESC, no Município de Lages.

Para replicar e manter a amostra do parasito, células Vero foram cultivadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup>, incubadas a 37°C e a 5% de CO<sub>2</sub>. Para a confecção do meio, utilizaram-se 500mL de água Milli-Q, sendo diluídos, para este volume: 5,2g de RPMI 1640 (meio de cultivo celular), 10% de soro fetal bovino, 0,011g de piruvato, 500µL de penicilina/estreptomicina, 500 µL de anfotericina B, 1g de bicarbonato de sódio e 250µL de vermelho de fenol. A solução, depois de ser totalmente diluída e antes de ser utilizada, foi filtrada por uma membrana esterilizante de 0,22µm. Quando as células se expandiam formando uma monocamada, eram infectadas com taquizoítos de *N. caninum* e em seguida incubadas nas mesmas condições anteriores, exceto pela exclusão do uso de soro fetal bovino nesse estágio do cultivo.

As culturas foram observadas diariamente, usando microscópio invertido para verificar o crescimento e multiplicação dos taquizoítos. Quando aproximadamente 80%

da monocamada estavam infectados, recolhiam-se os taquizoítos mediante ruptura mecânica das células, sendo em seguida destinados:

- a) à manutenção da mesma garrafa;
- b) à replicação em outras garrafas;
- c) ao congelamento em nitrogênio líquido para uso ulterior; e
- d) para confecção de inóculos.

Para a obtenção dos inóculos, após ruptura mecânica das células e taquizoítos, todo o conteúdo das garrafas foi transferido para tubos de centrifugação tipo Falcon, esperando-se decantar por 30 minutos e o sobrenadante retransferido para outro tubo, sendo centrifugado durante 10 minutos a 1.225 G. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* resultante foi ressuscitado em 1mL de PBS estéril para o cálculo de concentração (taquizoítos/mL), em Câmara de Neubauer espelhada melhorada, e o volume final adaptado em virtude da concentração específica de cada garrafa, de acordo com o desejado ( $1,0 \times 10^7$  ou  $2,0 \times 10^7$  taquizoítos).

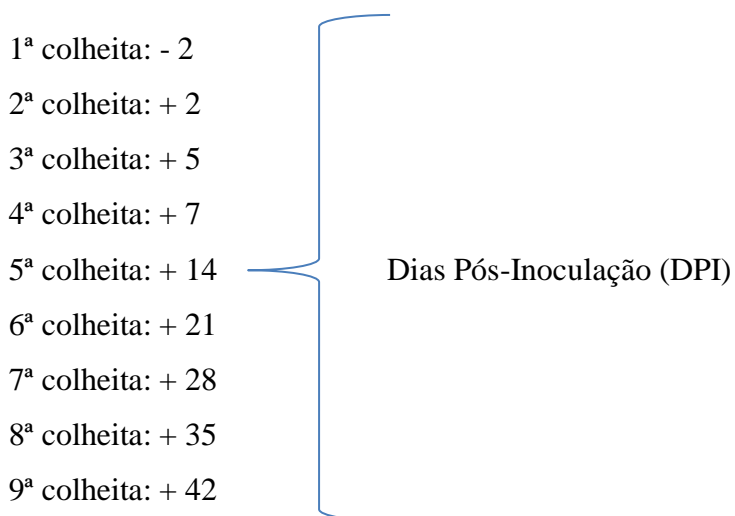
### 3.4 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

Os diagnósticos de gestação foram realizados por meio da ultrassonografia transretal quando prenhez recente (até 30 dias de gestação) e, após esse período, de forma transabdominal, com frequência mensal, para avaliar o *status* reprodutivo de cada ovelha, ou seja, a persistência da gestação e viabilidade do feto, a fim de investigar morte embrionária.

### 3.5 COLHEITA DE AMOSTRAS DE SANGUE E EXAMES CLÍNICOS

#### 3.5.1 Colheitas das amostras de sangue

Foram colhidas amostras de sangue com EDTA (para realização de hemograma) e sem EDTA (para obter o soro para realização da RIFI) de todas as ovelhas, em um calendário pré-fixado, contado a partir da data da inoculação, totalizando nove colheitas por animal:



### 3.5.2 Exames clínicos

Os animais inoculados foram avaliados por exames clínicos (frequências cardíaca e respiratória e temperatura retal) do dia -2 ao dia 14 pós-inoculação e, na sequência, semanalmente até o final do experimento (42 DPI).

A aferição da temperatura retal procedeu-se com termômetro clínico digital (Termo Med®; Incoterm), sendo que o bulbo de metal permaneceu todo o tempo direcionado para o assoalho do reto, em contato direto com a mucosa, até a estabilização do valor, indicado por aviso sonoro. Como parâmetro clínico de normotermia em ovinos adultos, adotou-se o intervalo de 38,5 a 40°C, segundo Feitosa (2014).

A auscultação cardíaca indireta entre os 3º e 5º espaços intercostais esquerdos ocorreu com auxílio de estetoscópio. Os batimentos cardíacos eram cronometrados e contados durante 15 segundos e depois multiplicados por quatro, revelando o resultado final em batimentos cardíacos por minuto (bpm). Como parâmetro clínico normal em ovinos adultos, adotou-se o intervalo mínimo de 70 (PUGH, 2004) e o intervalo máximo de 115 (FEITOSA, 2014) bpm.

A frequência respiratória foi avaliada com o animal a distância (sem excitá-lo, observando-se movimentos costoabdominais) ou, caso não parasse de se movimentar, com a ausculta dos ruídos das vias respiratórias, sendo então cronometrados e contados por 15 segundos, sendo multiplicados por quatro, chegando ao resultado final em movimentos respiratórios por minuto (mpm). Como parâmetro clínico normal da frequência respiratória em ovinos adultos, adotou-se o intervalo de 20 a 30 mpm, de acordo com Pugh (2004) e Feitosa (2014).



### 3.6 SOROLOGIA

Para a pesquisa de anticorpos IgG contra *N. caninum*, os soros dos ovinos foram diluídos em PBS (1:50). Doze microlitros de cada diluição das amostras séricas foram adicionados nos poços das lâminas contendo o antígeno. As lâminas, assim preparadas, foram acondicionadas em câmara úmida e incubadas a 37°C por 40 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes (em tampão PBS, 10 minutos cada vez) e colocadas para secarem (seis minutos em estufa a 37°C).

Posteriormente, foi adicionado o conjugado gamaglobulina anti-IgG total de ovino marcado com isotiocianato de fluoresceína e as lâminas foram novamente incubadas em câmara úmida (37°C por 40 minutos) em estufa, lavadas duas vezes com tampão PBS e uma vez com água bidestilada (10 minutos cada lavagem) para remoção do excesso de sais. Após a secagem definitiva das lâminas, glicerina tamponada foi adicionada às mesmas, que foram então recobertas com lamínulas e examinadas ao microscópio de fluorescência (objetiva de 40x). Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram títulos  $\geq 50$  (JOLLEY et al., 1999). Soros-controles positivo e negativo foram utilizados a fim de comparação. As amostras positivas foram diluídas sequencialmente, em múltiplos de dois, até à diluição máxima reativa para a titulação. Os testes sorológicos em questão foram realizados no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias do CAV/ UDESC, no Município de Lages, SC.

### 3.7 HEMOGRAMAS

A contagem de eritrócitos e leucócitos foi realizada de forma não automatizada, sendo que para a contagem de eritrócitos foi utilizada a diluição em tubo de ensaio (macrodiluição), com o diluente líquido de Hayem. Já para a contagem total de leucócitos, as amostras de sangue foram diluídas, na proporção de 1:20, utilizando como diluente o líquido de Turk.

Em ambos os casos procedeu-se contagem em câmara de Neubauer. Para diferencial de leucócitos foi realizado esfregaço sanguíneo, corados pelo Método de May-Grunwald-Giemsa. O diferencial de leucócitos e a análise morfológica das células procederam-se em um total de 100 leucócitos, que foram classificados e lidos sobre microscopia de luz em aumento de objetiva em 1000x.

Para a dosagem de hemoglobina utilizou-se o método de cianometemoglobina e para determinação do hematócrito foi realizada a técnica de microematócrito.

Em se tratando dos valores de referência de hemograma completo para ovinos adultos, foram definidos:

- Eritrócitos: 8- 15x10<sup>6</sup>/μL (MEYER; HARVEY, 2004).
- Hemoglobina: 8- 16g/dL (MEYER; HARVEY, 2004).
- Hematócrito: 24- 49% (MEYER; HARVEY, 2004).
- Leucócitos: 4- 12x10<sup>3</sup>/μL (MEYER; HARVEY, 2004).
- Neutrófilos totais: 700- 6.000/μL (THRALL, 2006).
- Linfócitos: 2.000- 9.000/μL (THRALL, 2006).
- Monócitos: 200- 900/μL (MEYER; COLES; RICH, 1995).
- Eosinófilos: 0- 1.000/μL (THRALL, 2006).
- Basófilos: 0- 300/μL (THRALL, 2006).

### 3.8 CORDEIROS

Dos cordeiros, (todos nasceram a termo), procedeu-se a pesagem e exame clínico. Amostras de sangue (pré-colostral, quando possível), com e sem EDTA, foram colhidas uma única vez, no exato momento antes de serem submetidos à eutanásia e tão logo após o nascimento.

A eutanásia foi realizada por intermédio de um método indolor, sem sofrimento e excitação do animal, por meio de injeção intravenosa de um eutanásico, à base de iodeto de mebezônio, embutramida e cloridrato de tetracaína (T-61®; Intervet), cujo volume final a ser injetado seguiu a proporção de 6mL/50kg, de acordo com o peso individual de cada animal ao nascer. Anteriormente à injeção letal, os cordeiros foram sedados com cloridrato de quetamina a 10% (30mg/kg IV).

Durante a necropsia, foram colhidas amostras de SNC (cérebro, cerebelo e medula), pulmão, coração, fígado e placenta para exame histopatológico. Os órgãos foram fixados em solução de formalina tamponada a 10%, sendo processados rotineiramente e embebidos em parafina e corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE). Tanto a necropsia quanto a leitura das lâminas foram realizadas no Laboratório de Patologia Veterinária do IFC-Campus Concórdia.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. INFECÇÃO EXPERIMENTAL

#### 4.1.1. Avaliação por meio da sorologia

Os três animais do grupo A, inoculados aos 30 dias antes da concepção com  $1 \times 10^7$  taquizoítos da cepa Nc-1 de *N. caninum*, por via intravenosa (IV), apresentaram resultado negativo na sorologia em todas as nove colheitas (e também em uma sorologia adicional realizada aos 163 DPI), indicando que o inóculo não foi adequado ou em quantidade insuficiente para causar infecção nesses animais.

Como forma de aumentar o desafio, os animais dos grupos B, C e D foram inoculados, via IV, com  $2 \times 10^7$  taquizoítos.

No Grupo B (65 dias pós-concepção) uma das ovelhas soroconverteu fracamente a partir do 7º dia pós-inoculação (DPI) e a outra, a partir do 14º DPI, persistindo a soropositividade em ambas as ovelhas até o final (42 DPI) das avaliações.

No Grupo C (100 dias pós-concepção), uma ovelha soroconverteu a partir do 5º DPI, tornou-se negativa aos 7 DPI e voltou a ser positiva aos 14 DPI. Outra ovelha soroconverteu a partir do 7º DPI. Ambas persistiram soropositivas até o último dia (42 DPI) das avaliações.

No Grupo D (120 dias pós-concepção), uma das ovelhas foi soropositiva nos 14 e 28 DPI e outra a partir dos 28 DPI, persistindo a soropositividade até o final (42 DPI) das colheitas em ambas as ovelhas.

As duas ovelhas-controles (Grupo E) não soroconverteram em momento algum, durante todas as colheitas (até 42 DPI).

Conrad et al. (1993) citaram que em bovinos, os níveis de anticorpos contra *N. caninum* flutuam e, eventualmente, podem estar abaixo do ponto de corte utilizado. Dessa forma, resultados falso-negativos podem ocorrer, o que pode ter acontecido com uma ovelha do Grupo C aos 7 DPI e em outra ovelha do Grupo D aos 21 DPI.

Os resultados da sorologia ora apresentados indicam que a inoculação, via IV, de  $2 \times 10^7$  taquizoítos de *N. caninum* (cepa Nc-1) obtidos de cultivo celular resultou positiva, indicando infecção das ovelhas inoculadas, mesmo na ausência de sinais clínicos.

Os dados referentes aos resultados da sorologia das ovelhas inoculadas estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1- Resultado da sorologia (RIFI, 1:50) para a pesquisa de anticorpos IgG contra *Neospora caninum* em ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1.**

Animal	Grupo	RIFI / Dias Pós-Inoculação									
		-2	2	5	7	14	21	28	35	42	
81	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
117	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
123	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
126	B	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
128	B	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
87	C	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
94	C	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
150	D	-	-	-	-	+	-	+	+	+	
116	D	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
96	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
132	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

(+) Positivo; (-) Negativo.

Grupos A (-30 dias), B (65 dias), C (100 dias), D (120 dias), e E (controle).

RIFI= Reação de Imunofluorescência Indireta.

**Tabela 2- Recíproca de títulos de anticorpos contra *Neospora caninum* em ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1.**

Animal	Grupo	RIFI / Dias Pós-Inoculação									
		-2	2	5	7	14	21	28	35	42	
81	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
117	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
123	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
126	B	-	-	-	-	1:50	1:200	1:200	1:100	1:100	
128	B	-	-	-	1:50	1:100	1:100	1:100	1:100	1:800	
87	C	-	-	1:100	-	1:50	1:50	1:50	1:400	1:50	
94	C	-	-	-	1:50	1:50	1:200	1:50	1:50	1:200	
150	D	-	-	-	-	1:50	-	1:50	1:50	1:50	
116	D	-	-	-	-	-	-	1:50	1:50	1:100	
96	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
132	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

(-) Negativo.

Grupos A (-30 dias), B (65 dias), C (100 dias), D (120 dias), e E (controle).

McAllister et al. (1996) observaram que de 24 ovelhas inoculadas experimentalmente aos 65, 90 e 120 dias de gestação, todas soroconverteram aos 21 DPI, inclusive com aumento da titulação aos 42 DPI. No entanto, os valores encontrados foram maiores (variando de 1:400 a 1:12.800) se comparados aos deste trabalho (1:100 a 1:800).

Em cabras inoculadas experimentalmente aos 90 e 120 dias de gestação, os títulos encontrados variaram de 1:400 a 1:1.600 e 1:200 a 1:800, respectivamente (PORTO et al., 2016). Nos grupos C e D, essa variação foi de 1:50 a 1:400 e 1:50 e 1:100.

Em estudo realizado por Weston et al. (2009), borregas inoculadas aos 90 dias de gestação, 35% (14/40) dos animais analisados se apresentaram sororreagentes aos 14 DPI, com valores de títulos de anticorpos entre 1:100 e 1:800, enquanto que ambas as ovelhas do Grupo C tiveram a titulação de 1:50 neste período. Aos 28 DPI, 31 (78%) dos 40 animais soroconverteram, enquanto que as duas ovelhas do Grupo C continuaram a ter o título de anticorpos de 1:50, apesar de uma delas ter esse valor aumentado para 1:200 aos 21 DPI. Já aos 42 DPI, 16 (50%) dos 32 animais avaliados foram soropositivos, igualmente com títulos de anticorpos entre 1:100 e 1:800, enquanto que uma ovelha do Grupo C apresentou título de 1:50, a outra teve título de 1:200.

#### **4.1.2 Avaliações clínicas das ovelhas**

##### *4.1.2.1 Temperatura retal (°C)*

As três ovelhas do Grupo A apresentaram aumento de temperatura (40,2°C; 40,5°C; 40,5°C) nos **21** DPI. No entanto, o mesmo ocorreu com uma ovelha do grupo-controle (40,8°C), sendo que as avaliações aconteceram em um dia com temperatura ambiental elevada. Ainda neste Grupo A, foi observada hipertermia no animal 117 nos dias **1** (40,1°C) e **6** (40,9°C) DPI e no animal 123 no dia **12** (40,5°C) DPI.

Já do Grupo B, o animal 126 apresentou aumento de temperatura nos **9** (40,1°C) e **11** (40,2°C) DPI e a ovelha 128 nos **-1** (40,1°C) e **11** (40,1°C) DPI. Entretanto, outra ovelha do grupo-controle também apresentou hipertermia no **-1** (40,1°C) DPI, apenas.

Em ambos os animais do Grupo C, foi observado aumento de temperatura em **1** (40,3°C; 40,8°C) e **4** (40,6°C; 40,7°C) DPI.

Buxton et al. (1998) em ovelhas inoculadas experimentalmente com  $5 \times 10^5$  taquizoítos da cepa Nc-1 de *N. caninum* aos 65 e 90 dias de gestação, relataram início de aumento de temperatura a partir de **3** DPI, com pico aos **7** DPI e decréscimo a partir de **9** DPI. Buxton et

al. (2001), com uma dose menor ( $1 \times 10^5$ ), em ovelhas inoculadas por via subcutânea com a mesma cepa aos 90 dias de gestação, observaram aumento de temperatura a partir de **2** DPI, com pico aos **3** DPI, retornando aos valores normais a partir de **8** DPI. Tal como o presente trabalho, três, de um total de 10 ovelhas inoculadas aos 90 dias de gestação com  $1 \times 10^6$  taquizoítos de três diferentes cepas de *N. caninum* da Nova Zelândia (NcNZ-1, NcNZ-2 e NcNZ-3), apresentaram febre 24 horas após a inoculação (WESTON et al., 2009).

No grupo D, esse aumento foi observado nos dias **1** (40,3°C; 40,4°C), **10** (40,4°C em ambas), **11** (40,9°C; 41°C) e **12** (40,2°C; 40,4°C) DPI.

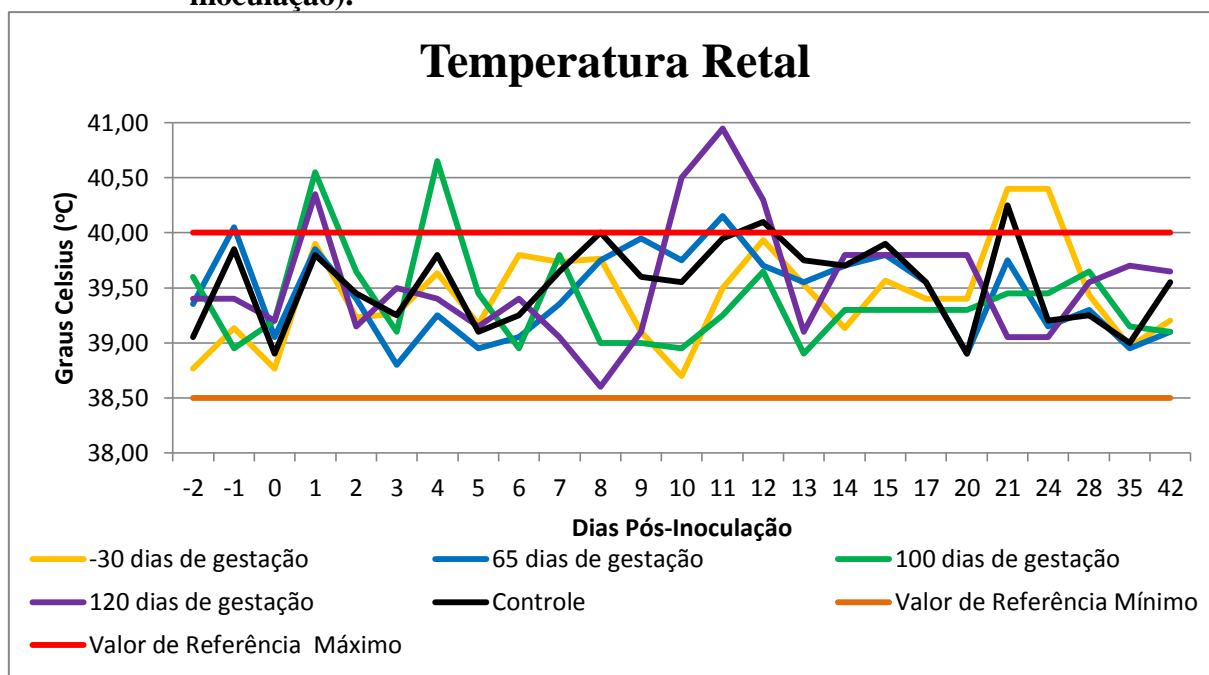
No grupo-controle, enquanto uma ovelha apresentou leve hipertermia apenas no **-1** (40,1°C) DPI, a outra apresentou em **4** (40,4°C), **8** (40,4°C), **11** (40,3°C), **12** (40,6°C), **13** (40,1°C), **21** (40,8°C) e **42** (40,1°C) DPI.

De seis ovelhas não prenhas inoculadas experimentalmente por via subcutânea com  $2,5 \times 10^6$  taquizoítos da cepa Nc-1, apenas três apresentaram hipertermia ao **3º** DPI, somente (RETTIGNER et al., 2004).

Todas as 21 cabras inoculadas experimentalmente com a cepa Nc-Spain7 aos 40, 90 e 120 dias de gestação apresentaram hipertermia entre os **5** a **9** DPI, com picos em **6-7** DPI, sem nenhum valor alterado a partir de **14** DPI (PORTO et al., 2016).

Os resultados da aferição da temperatura retal dos animais estão apresentados no Gráfico 1.

**Gráfico 1- Resultado da média por grupo da aferição da temperatura retal das ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum* em calendário pré-fixado (-2 a 42 dias pós-inoculação).**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

#### 4.1.2.2 Frequência cardíaca (bpm)

No Grupo A, uma ovelha apresentou taquicardia aos **8** (156bpm) DPI. A outra nos **21** (116bpm) e **42** (140bpm) DPI e a terceira ovelha nos **8** (128bpm) e **42** (132bpm) DPI.

No Grupo B, uma ovelha apresentou taquicardia em **-2** (160bpm), **-1** (176bpm), **0** (132bpm), **3** (132bpm), **4** (128bpm), **8** (168bpm), **9** (140bpm), **14** (128bpm), **21** (132bpm) e **28** (124bpm) DPI e a outra em **-1** (168bpm), **3** (116bpm), **8** (116bpm), **9** (140bpm), **14** (124bpm) e **24** (116bpm) DPI.

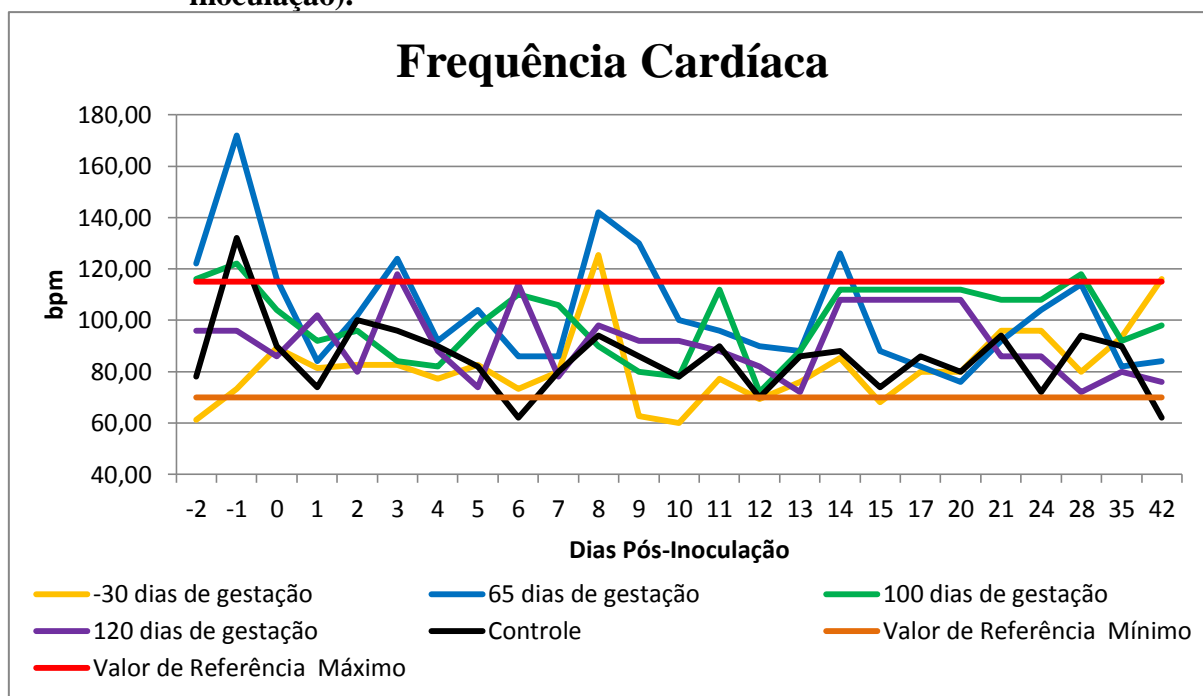
No Grupo C, uma ovelha apresentou batimentos cardíacos aumentados em **-2** (140bpm), **-1** (120bpm), **14** e **28** (116bpm) DPI e a outra em **-1** (124bpm), **0**, **6**, **7** e **11** (116bpm), **21** e **28** (120bpm) DPI.

No Grupo D, uma ovelha apresentou aumento de frequência cardíaca nos **14** (116bpm) DPI e a outra nos **3** (128bpm) e **6** (140bpm) DPI.

No grupo E (controle), um ovelha apresentou taquicardia em **-1** (164bpm) DPI e a outra em **2** (120bpm) DPI, apenas.

Os resultados da contagem da frequência cardíaca dos animais estão apresentados no Gráfico 2.

**Gráfico 2- Resultado da média por grupo da frequência cardíaca (bpm) das ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizóitos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum* em calendário pré-fixado (-2 a 42 dias pós-inoculação).**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

#### 4.1.2.3 Frequência respiratória (mpm)

Todas as ovelhas, em todas as avaliações, exibiram taquipneia em graus variáveis (acima de 30mpm), exceto uma ovelha do grupo A em -2 DPI (24mpm) e uma ovelha do Grupo D em 21 DPI (28mpm).

Apesar de os exames clínicos serem realizados sempre no mesmo horário, houve variações diárias de manejo (esforço físico recente ao voltar da pastagem, estresse de contenção), bem como fatores ambientais, tais como: temperatura ambiental diária, umidade relativa do ar, alimentação, estágio da gestação, idade, tamanho e peso, além de estarem lanadas em todo o período do experimento.

A frequência respiratória apresentou-se aumentada em quase todas as avaliações. Possivelmente, essas alterações não são consequência da inoculação, mas resultado da ação de um ou mais fatores, isolada ou conjuntamente, citados no parágrafo anterior.

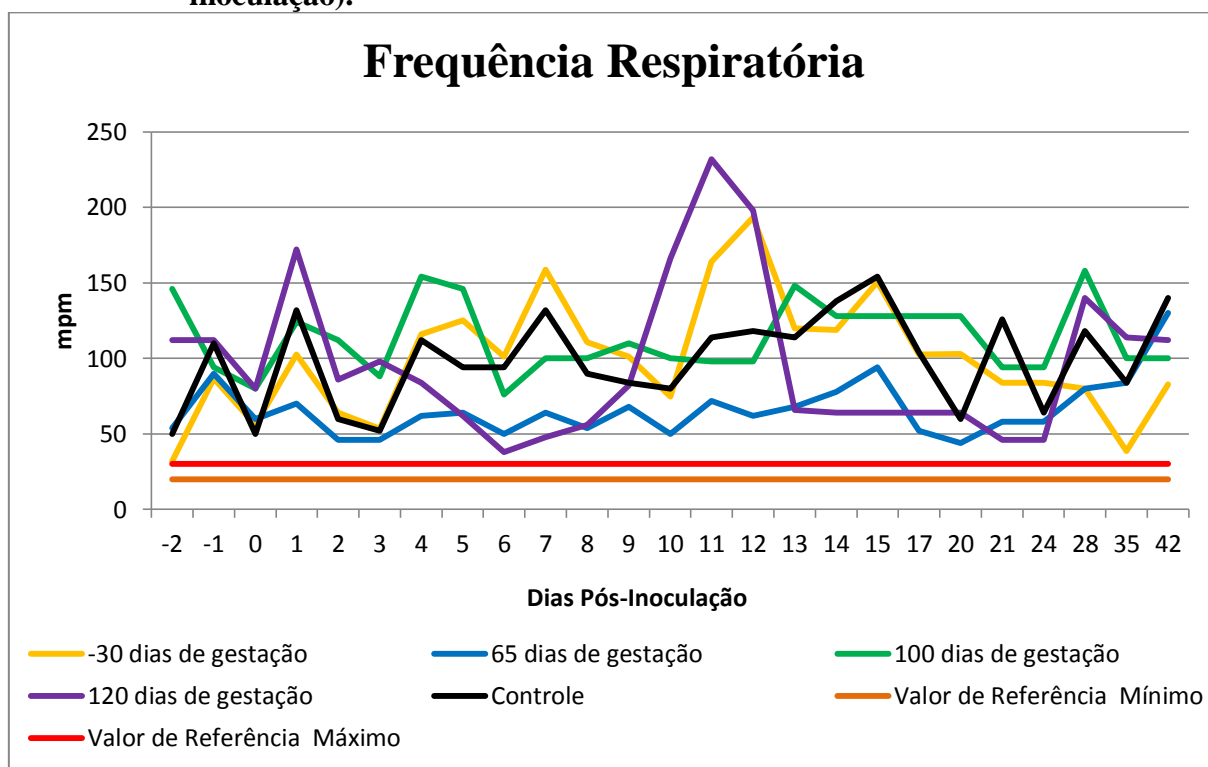
Em todas as avaliações em que ocorreu hipertermia, houve também aumento da frequência respiratória, a fim de diminuir a temperatura corporal por meio da respiração (ofego), já que uma das formas dos ovinos perderem calor é pela evaporação (FEITOSA, 2014).



Portanto, não se considera que os episódios de taquipneia observados tenham origem patológica pela inoculação do protozoário, mas sim, uma resposta fisiológica às variações do quadro de homeostase do animal.

Os resultados da aferição da frequência respiratória dos animais estão apresentados no Gráfico 3.

**Gráfico 3 - Resultado da média por grupo da frequência respiratória (mpm) das ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum* em calendário pré-fixado (-2 a 42 dias pós-inoculação).**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

### 4.1.3 Hemograma das ovelhas

#### 4.1.3.1 Eritrócitos ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )

Do grupo A, uma ovelha apresentou contagem de eritrócitos abaixo do normal aos -2 (7,18), 21 (7,8) e aos 28 (7,9) DPI. Outra ovelha em -2 (6,05), 5 (6,8), 7 (7,2), 21 (6,9), 28 (6,3) e 35 (6,7) DPI. Por fim, a terceira ovelha aos -2 (6,3), 28 (7,5) e 35 (7,0) DPI.

Do grupo B, uma ovelha apresentou número de eritrócitos abaixo do normal em todas as avaliações realizadas, com valores entre  $5,0$  a  $7,14 \times 10^6/\mu\text{L}$ , caracterizando, portanto, um

quadro individual do animal. Do contrário, a outra ovelha do mesmo grupo manteve-se dentro dos valores de normalidade em todas as avaliações.

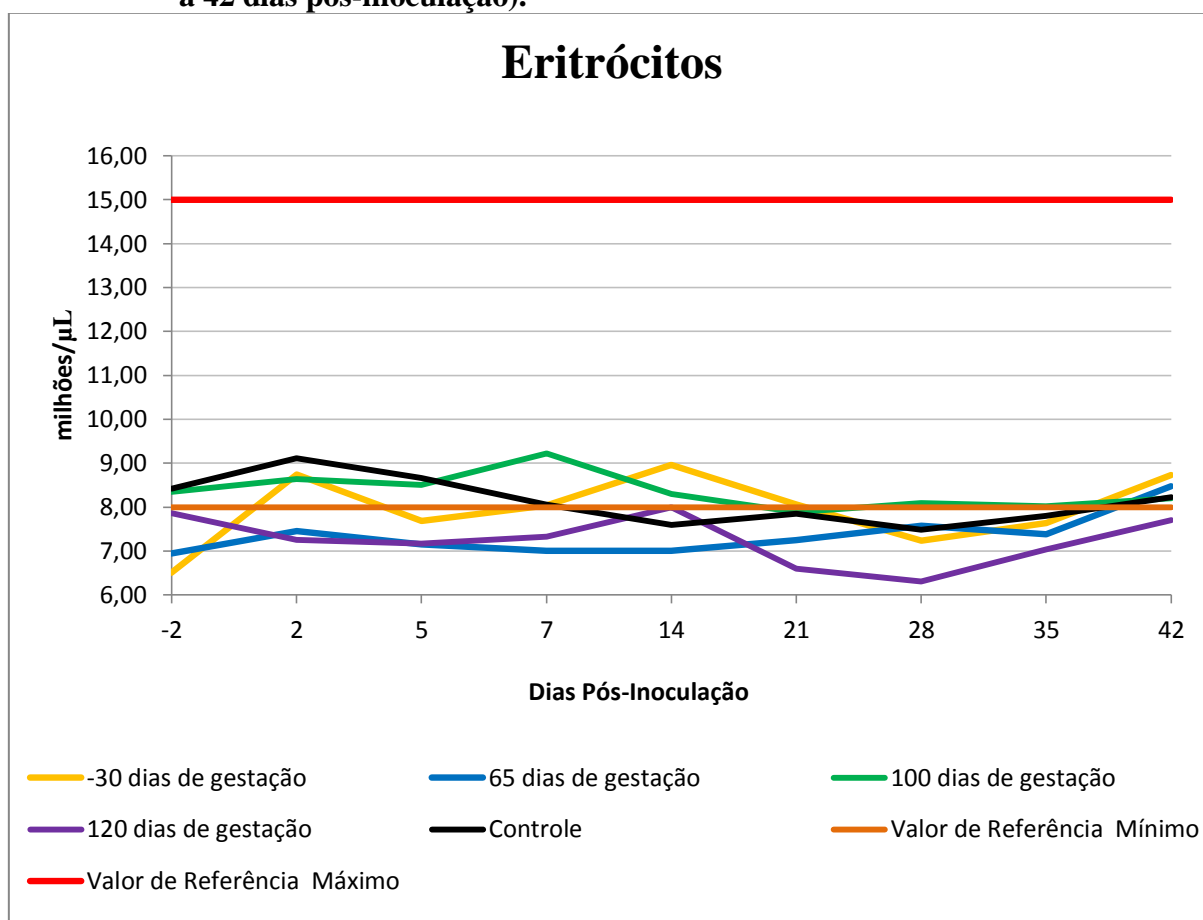
Do Grupo C, uma ovelha teve baixa contagem de eritrócitos em **21** (7,67), **28** (7,52), **35** (7,71) e **42** (7,45) DPI. A outra do mesmo grupo, apenas em **-2** (7,9) DPI.

Do Grupo D, essa variação ocorreu em **2** (7,9), **5** (7,66), **21** (7,61), **28** (7,45) e **35** (7,92) DPI. A outra ovelha do mesmo grupo apresentou baixa contagem de eritrócitos em todas as avaliações realizadas, com valores variando de 5,17 a  $7,41 \times 10^6/\mu\text{L}$ , caracterizando, portanto, um quadro individual do animal.

Do Grupo E (controle) o mesmo episódio ocorreu com uma ovelha em **-2** (7,75), **7** (7,9), **14** (7,5), **21** (7,4), **28** (6,9) e **35** (7,5) DPI. A outra ovelha do mesmo grupo, aos **-2** (7,7) DPI, apenas.

Os resultados do número de eritrócitos dos animais estão apresentados no Gráfico 4.

**Gráfico 4 - Resultado da média por grupo da contagem de eritrócitos ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ) das ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizóitos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum* em calendário pré-fixado (-2 a 42 dias pós-inoculação).**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

#### 4.1.3.2 Hemoglobina (g/dL)

Do Grupo A, uma ovelha apresentou teor de hemoglobina diminuído aos **28** (7,5) DPI.

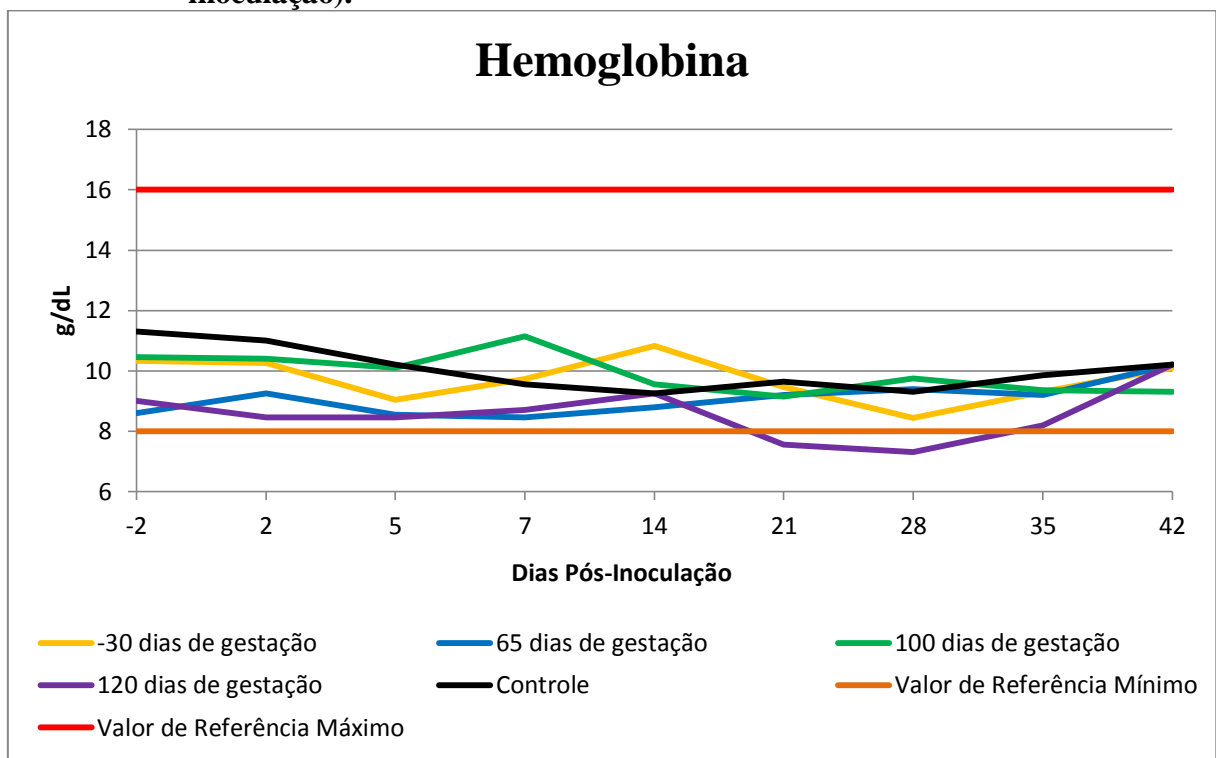
Do Grupo B, o mesmo ocorreu em apenas uma ovelha aos **-2** e **5** (7,3), **7** (7,5), **14** (6,7) e **21** (7,4) DPI.

Do Grupo D, os valores de hemoglobina se apresentaram diminuídos em um único animal em **2** (7,6), **5** (7,9), **7** (7,6), **21** (6,4), **28** (6,0) e **35** (7,3) DPI.

O teor de hemoglobina dos animais do Grupo C e E (controle) não se mostraram alterados.

Os resultados do teor de hemoglobina dos animais estão apresentados no Gráfico 5.

**Gráfico 5 - Resultado da média por grupo de hemoglobina (g/dL) das ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum* em calendário pré-fixado (-2 a 42 dias pós-inoculação).**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

#### 4.1.3.3 Hematócrito (%)

Do Grupo A, uma ovelha apresentou hematócrito abaixo do normal aos **5** (23), **21** (23), **28** (21) e **35** (22) DPI.

O mesmo ocorreu no grupo B com uma ovelha aos **-2** (23), **5** (22), **7** (23), **14** (19) e **21** (22) DPI.

No Grupo D, hematócrito diminuído foi observado em uma ovelha aos **28** (19) DPI e em outra outra, aos **2** (22), **5** (23), **7** (22), **21** (20), **35** (22) e **42** (23) DPI.

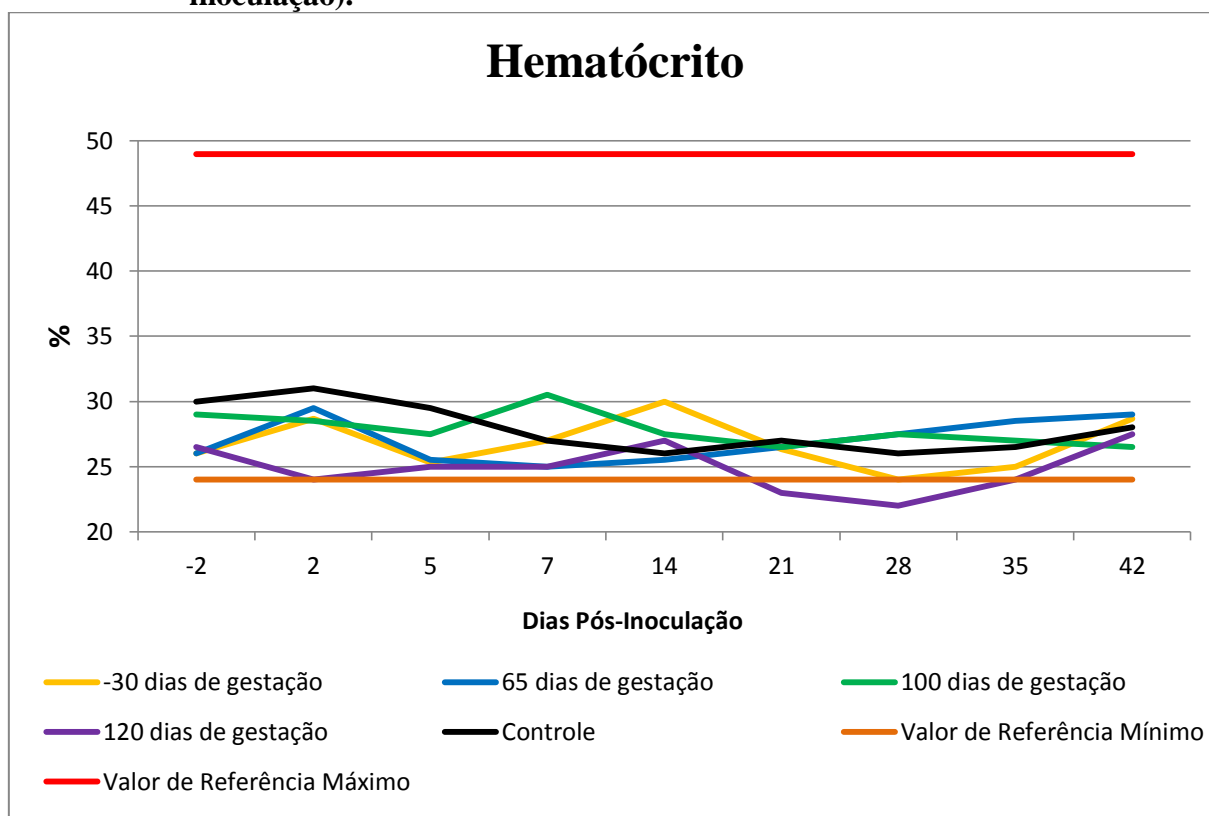
Em bovinos, Calzada et al. (2002) encontraram valores significativamente menores no hematócrito em vacas sorologicamente positivas ao *N. caninum* se comparadas às soronegativas, entretanto, todos os outros parâmetros de hemograma completo não se mostraram alterados.

Semelhantemente, fêmeas de bisão (*Bison bison*) naturalmente infectadas por *N. caninum* também apresentaram decréscimo do hematócrito durante a gestação (SHOEMAKER, 2014).

Os hematócritos dos animais do Grupo C e E (controle) não se mostraram alterados.

Os resultados da percentagem de hematócrito dos animais estão apresentados no Gráfico 6.

**Gráfico 6 - Resultado da média por grupo do hematócrito (%) das ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum* em calendário pré-fixado (-2 a 42 dias pós-inoculação).**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

#### 4.1.3.4 Leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )

Uma ovelha do Grupo A apresentou leucocitose (por eosinofilia) aos **14** (14,05), **21** (12,75) e **42** (13) DPI. O mesmo ocorreu com outra ovelha do mesmo grupo aos **-2** (12,4) DPI (por eosinofilia) e aos **14** (17,25) DPI, sendo este último pela linfocitose.

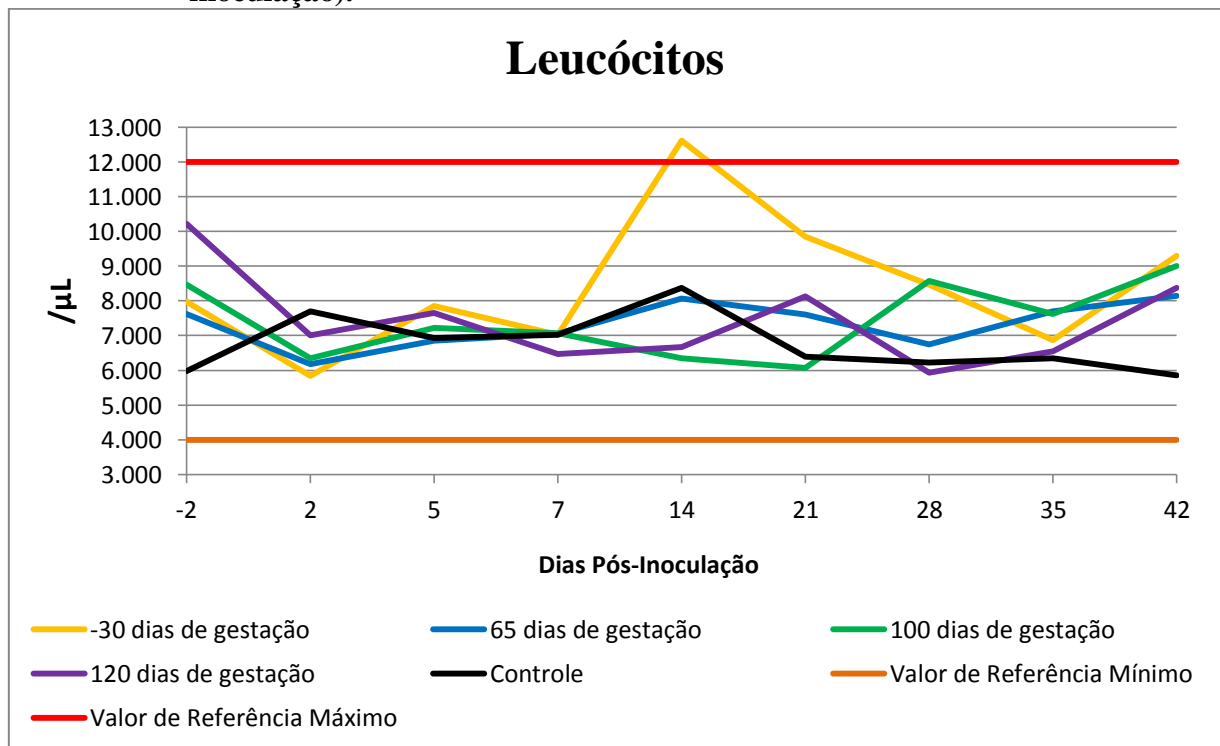
Uma ovelha do Grupo D teve aumento do número de leucócitos aos **-2** (12,75) DPI, somente.

Os resultados encontrados neste item destoam de estudo realizado com vacas primíparas, cronicamente infectadas por *N. caninum*, e que não abortaram, realizado por Serrano et al. (2011). Os autores detectaram níveis menores de leucócitos totais para esse grupo, se comparadas ao grupo-controle. Da mesma forma, Shoemaker (2014) encontrou decréscimo de níveis de leucócitos em fêmeas de bisão (*Bison bison*) naturalmente infectadas por *N. caninum* durante a gestação, sugerindo imunodepressão.

Não houve alterações do número de leucócitos nas ovelhas dos Grupos B, C e E (controle).

Os resultados do número de leucócitos dos animais estão apresentados no Gráfico 7.

**Gráfico 7 - Resultado da média por grupo da contagem de leucócitos ( $/\mu\text{L}$ ) das ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Gupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum* em calendário pré-fixado (-2 a 42 dias pós-inoculação).**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

4.1.3.4.1 Neutrófilos (/ $\mu$ L)

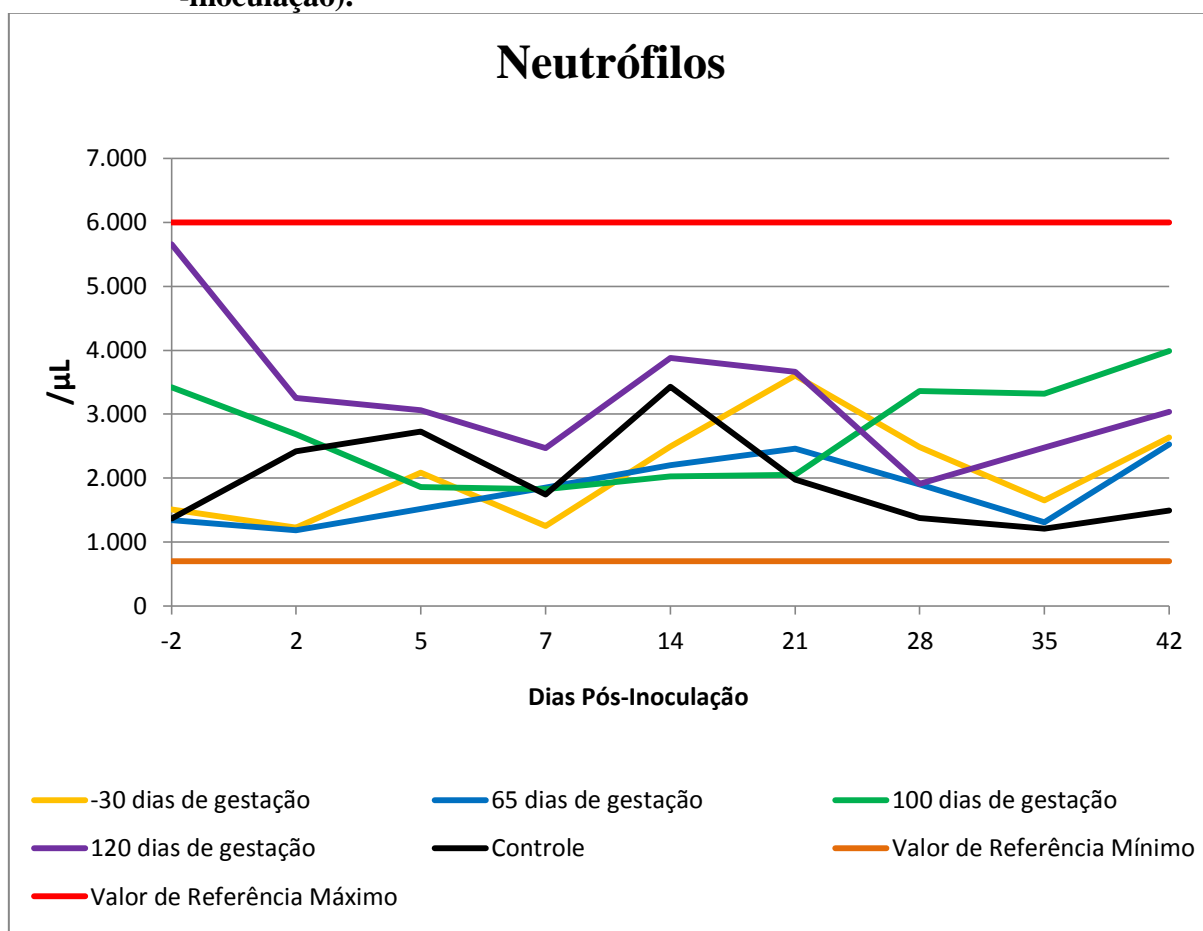
No Grupo A, uma ovelha apresentou neutropenia (518/ $\mu$ L) aos -2 DPI, enquanto que outra ovelha do Grupo D apresentou neutrofilia (8.543/ $\mu$ L) aos -2 DPI. Dessa forma, essas alterações não devem ser atribuídas ao *N. caninum*, haja vista terem ocorrido anteriormente à inoculação.

Serrano et al. (2011) encontraram menor número de neutrófilos totais em vacas primíparas cronicamente infectadas por *N. caninum* e que não abortaram, diferindo dos resultados obtidos das ovelhas deste trabalho.

Não houve alterações do número de neutrófilos das ovelhas de todos os grupos e em todas as colheitas efetuadas.

Os resultados do número de neutrófilos dos animais estão apresentados no Gráfico 8.

**Gráfico 8 - Resultado da média por grupo da contagem de neutrófilos (/ $\mu$ L) das ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum* em calendário pré-fixado (-2 a 42 dias pós-inoculação).**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

#### 4.1.3.4.2 Linfócitos (/ $\mu$ L)

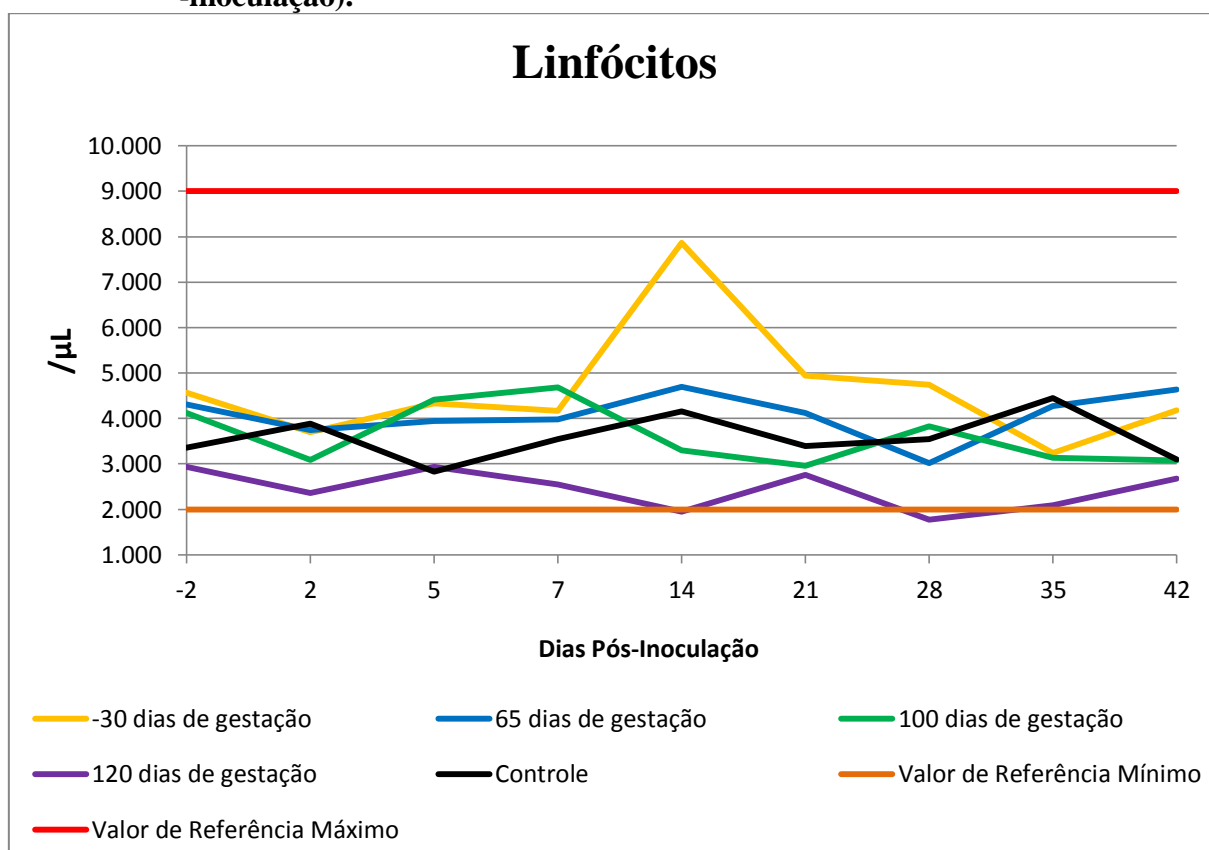
Do grupo A, um ovelha apresentou discretas linfopenia (1.924/ $\mu$ L) aos 7 DPI e linfocitose (12.765/ $\mu$ L) aos 14 DPI.

Do Grupo D, uma ovelha evidenciou linfopenia aos 2 (1.968/ $\mu$ L) e 35 (1.766/ $\mu$ L) DPI e a outra nos 7 (1.922/ $\mu$ L), 14 (1.536/ $\mu$ L) e 28 (1.380/ $\mu$ L) DPI.

Nas demais ovelhas dos outros grupos não houve alteração na contagem de linfócitos em todas as colheitas realizadas.

Os resultados do número de linfócitos dos animais estão apresentados no Gráfico 9.

**Gráfico 9 - Resultado da média por grupo da contagem de linfócitos (/ $\mu$ L) das ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum* em calendário pré-fixado (-2 a 42 dias pós-inoculação).**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

#### 4.1.3.4.3 Monócitos (/ $\mu$ L)

Uma ovelha do Grupo A demonstrou monocitose aos 5 (1.045/ $\mu$ L), 7 (1.362/ $\mu$ L), 35 (1.200/ $\mu$ L) e 42 (1.040/ $\mu$ L) DPI. Outra ovelha do mesmo grupo aos 14 (1.725/ $\mu$ L) DPI.

Do Grupo B, uma ovelha teve aumento do número de monócitos aos **-2** (979/ $\mu$ L), **7** (1.184/ $\mu$ L) e **35** (1.164/ $\mu$ L) DPI e a outra do mesmo grupo, somente aos **5** (1.048/ $\mu$ L) DPI.

Do Grupo C, apenas uma ovelha exibiu o mesmo evento aos **5** (960/ $\mu$ L), **21** (1.256/ $\mu$ L), **28** (1.560/ $\mu$ L) e **42** (1.128/ $\mu$ L) DPI.

Do Grupo D, em um animal ocorreu monocitose em **7** (1.013/ $\mu$ L) e **28** (995/ $\mu$ L) DPI e em outra do mesmo grupo aos **-2** (1.020/ $\mu$ L) e **5** (1.155/ $\mu$ L) DPI.

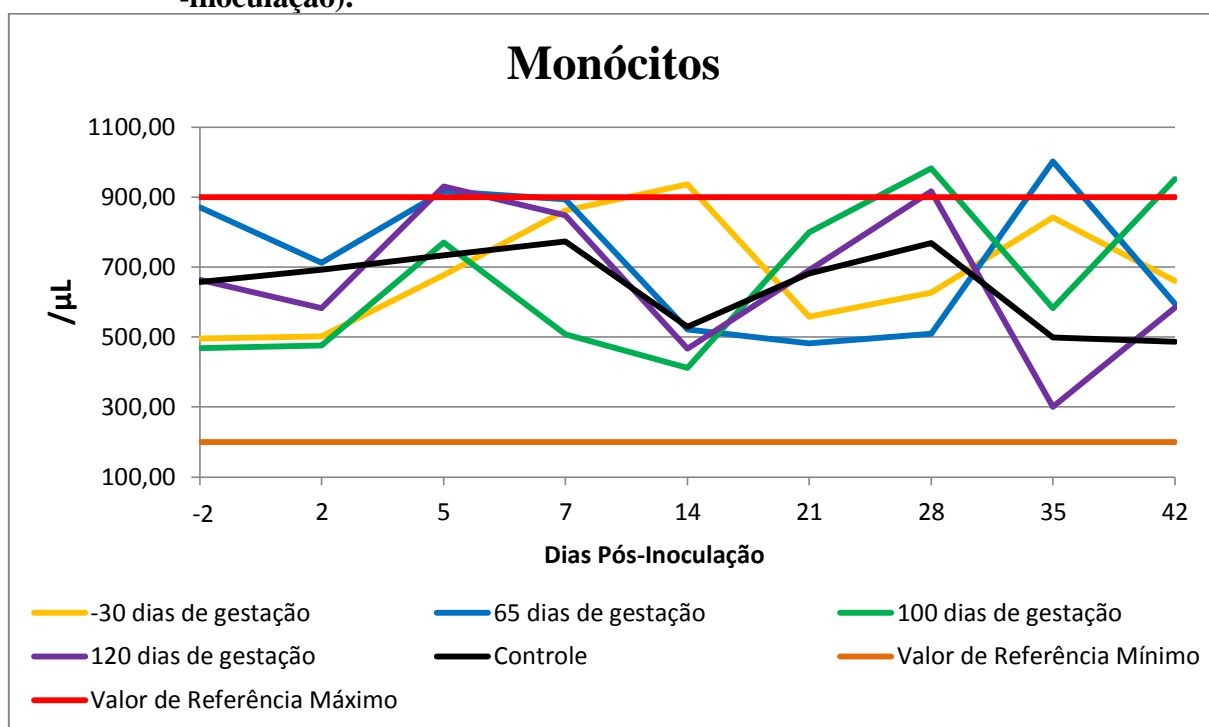
Do Grupo E (controle), apenas uma ovelha apresentou valores aumentados em **21** (908/ $\mu$ L) e **28** (1.163/ $\mu$ L) DPI.

Os valores encontrados estão de acordo com Serrano et al. (2011), que obtiveram significante acréscimo do número de monócitos em vacas primíparas cronicamente infectadas por *N. caninum* e que não abortaram, aumento este ocorrido no início do último trimestre de gestação.

Do contrário, búfalas leiteiras sorologicamente positivas ao *N. caninum*, no Paquistão, apresentaram contagem de monócitos relativamente menor, se comparadas às soronegativas, em todas as épocas do ano, exceto o inverno (NASIR, 2011).

Os resultados do número de monócitos dos animais estão apresentados no Gráfico 10.

**Gráfico 10 - Resultado da média por grupo da contagem de monócitos ( $\mu$ L) das ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum* em calendário pré-fixado (-2 a 42 dias pós-inoculação).**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.



#### 4.1.3.4.4 Eosinófilos (/ $\mu$ L)

Uma ovelha do Grupo A apresentou eosinofilia aos **5** (1.463/ $\mu$ L), **7** (1.476/ $\mu$ L), **14** (2.810/ $\mu$ L), **21** (1.403/ $\mu$ L), **28** (1.040/ $\mu$ L), **35** (2.000/ $\mu$ L) e **42** (3.250/ $\mu$ L) DPI. E a outra aos **-2** (2.604/ $\mu$ L) e **42** (1.680/ $\mu$ L) DPI.

Do grupo B, o mesmo ocorreu em **-2** (1.958/ $\mu$ L), **28** (1.820/ $\mu$ L) e **35** (1.790/ $\mu$ L) DPI em apenas um animal.

Do Grupo C, uma ovelha aos **42** (1.473/ $\mu$ L) DPI, apenas.

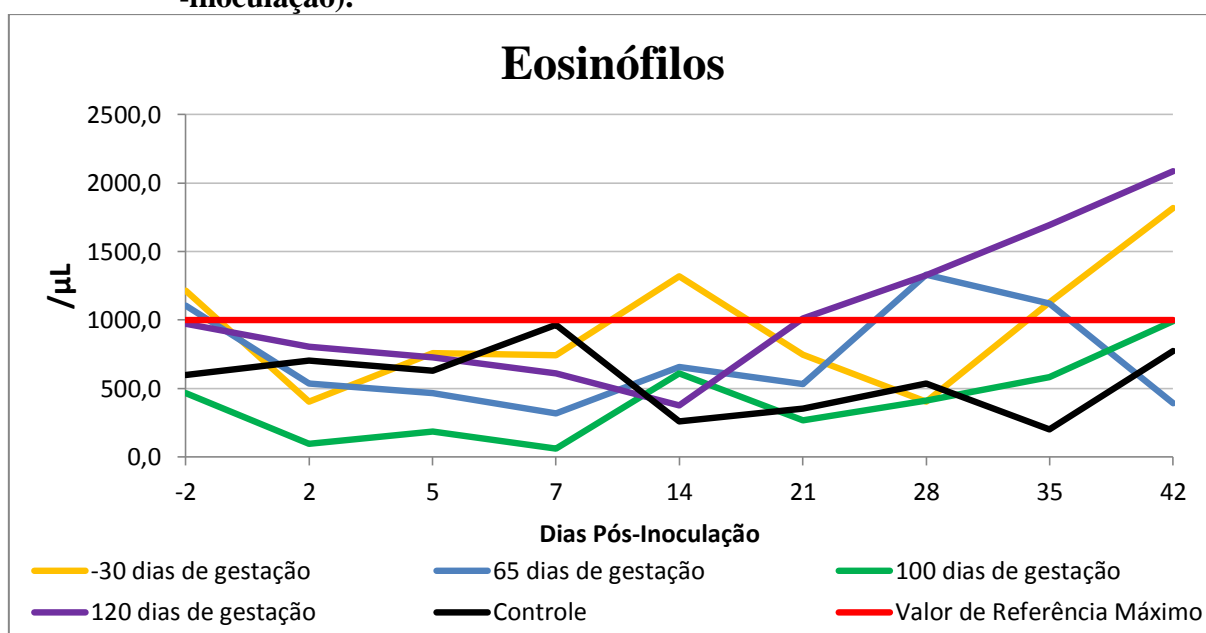
Do Grupo D, o aumento do número de eosinófilos verificou-se aos **-2** (1.309/ $\mu$ L), **5** (1.128/ $\mu$ L), **21** (1.610/ $\mu$ L), **28** (1.872/ $\mu$ L), **35** (1.445/ $\mu$ L) e **42** (2.364/ $\mu$ L) e em outra aos **35** (1.938/ $\mu$ L) e **42** (1.806/ $\mu$ L) DPI, apenas.

Do Grupo E (controle) em uma ovelha verificou-se eosinofilia aos **-2** (1.064/ $\mu$ L), **2** (1.188/ $\mu$ L) e **7** (1.240/ $\mu$ L) DPI.

Não houve correlação entre os episódios de eosinofilia com endoparasitos. Os resultados dos OPGs (Técnica de Gordon e Whitlock), realizados quinzenalmente ao longo de todo o experimento, demonstraram a eficácia do protocolo de everminações adotado para os animais.

Os resultados do número de eosinófilos dos animais estão apresentados no Gráfico 11.

**Gráfico 11 - Resultado da média por grupo da contagem de eosinófilos (/ $\mu$ L) das ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum* em calendário pré-fixado (-2 a 42 dias pós-inoculação).**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

#### 4.1.3.4.5 Basófilos (/μL)

A presença de basófilos foi observada em apenas uma ovelha do Grupo B, aos **28** (65/μL) DPI e está de acordo com os valores de referência para ovinos adultos. No entanto, esse resultado singular do animal em questão e de todo projeto (ovelha n. 126), pode ou não estar correlacionado com resultado importante do objeto de estudo deste trabalho (vide **4.2.2 Sorologia dos cordeiros**).

Raros são os estudos das alterações hematológicas em animais sororreagentes ao *N. caninum*, e esses trabalhos abrangem principalmente a espécie canina. Em ovinos, Silva (2011) não encontrou alteração hematológica alguma em animais naturalmente infectados por *N. caninum*. A escassez de dados nesse âmbito impede uma comparação mais aprofundada com os dados de literatura.

## 4.2 TRANSMISSÃO CONGÊNITA

### 4.2.1 Partos

Durante os diagnósticos de gestação realizados, todos os fetos permaneceram viáveis sendo, portanto, visualizados motilidade, batimentos cardíacos e placentomas viáveis.

Todas as ovelhas (inoculadas e controle), com exceção de uma, pariram animais hígdos, sem sinais clínicos neurológicos, com pesos normais e clinicamente saudáveis. Uma ovelha do Grupo A (-30 dias) e uma ovelha do Grupo D (120 dias) apresentaram partos gemelares. Somente uma ovelha do grupo B (inoculada aos 65 dias pós-concepção), pariu uma cordeira fraca, com hipotermia grave (36,6°C), considerada pequena e de baixo peso (2 kg) segundo Radostits et al. (2002) e cuja mãe apresentou retenção de placenta. Os mesmos autores citaram que cordeiros com peso ao nascer de 2,5 a 3 kg aumenta o fator de risco de mortalidade e que o retardo do crescimento intrauterino pode ser resultado de distúrbios no fluxo sanguíneo uteroplacentário ou de enfermidade da placenta, bem como o nascimento de gêmeos ou trigêmeos (todavia, o parto em questão foi simples). Uma ovelha do Grupo D apresentou endometrite, apesar de o parto não ter sido distócico.

A proposta inicial do projeto era obter sangue pré-colostral de todos os cordeiros nascidos vivos, entretanto, dos 13 cordeiros no total, três mamaram o colostro. A primeira ovelha a parir (Grupo C), fê-lo durante o período noturno, período este em que não há

ninguém no local onde descansam as ovelhas. Inclusive a placenta sequer foi encontrada, que pode ter sido ingerida pela própria mãe, pelo hábito frequente da placentofagia da espécie ovina. A não-colheita de sangue pré-colostral deste cordeiro é justificada pelo fato desta ovelha ter parido precocemente (aos 140 dias de gestação), período no qual a vigilância de partos ainda não havia sido propriamente implementada.

Portanto se iniciou, a partir desse acontecimento, um trabalho de vigilância na maior parte da madrugada, com a ajuda de guardas-noturnos. Tanto uma ovelha do Grupo B, quanto uma ovelha do Grupo D (esta última com amojó muito discreto) pariram entre 01h30 e 06h30 da manhã, horas essas que ficaram desassistidas durante o experimento, por motivos burocráticos.

Observando-se as outras ovelhas do rebanho que não aquelas do experimento, o tempo médio em que a mãe chega ao segundo estágio do parto até o cordeiro mamar o colostro foi relativamente rápido- de aproximadamente uma hora. Sendo assim, não se conseguiu obter o sangue pré-colostral dos cordeiros das três mães anteriormente citadas.

Duas ovelhas do Grupo A pariram aos 147 e a outra aos 146 dias de gestação (média 146,66); as duas ovelhas do Grupo B pariram aos 141 e 145 dias (média 143); do Grupo C, aos 140 e 142 dias (média 141); do Grupo D, aos 144 e 147 dias (média 145,5); e do Grupo E (controle), aos 143 e 146 dias (média 144,5).

De acordo com Jainudeen e Hafez (2004), o período gestacional de uma ovelha varia de 145-148 dias. Portanto, uma ovelha do Grupo B, as duas ovelhas do Grupo C, uma ovelha do Grupo D e uma ovelha do Grupo E pariram antes do previsto, não caracterizando, entretanto, um parto prematuro, assim considerado quando este ocorre em período igual ou menor que 137 dias de gestação (MOBINI; HEATH; PUGH, 2004). Não houve casos de aborto, mumificação ou maceração fetal em nenhum dos cordeiros do projeto.

Os dados do tempo gestacional estão apresentados no Quadro 1, na página seguinte.

**Quadro 1- Número de dias de gestação (individual e média de cada grupo) de ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum*.**

	Ovelha 1	Ovelha 2	Ovelha 3	Média
Grupo A	147	146	147	146,66
Grupo B	141	145	-	143
Grupo C	140	142	-	141
Grupo D	144	147	-	145,5
Grupo E	143	146	-	144,5

Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

#### 4.2.2. Sorologia dos cordeiros

Do Grupo A, das três ovelhas, uma teve parto gemelar (casal), portanto com quatro cordeiros no total do grupo, sendo um macho e três fêmeas, hígdos, com peso variando de 2,5 a 4,5 kg. Nenhum cordeiro nascido das ovelhas desse grupo mamou o colostro e todos eles foram soronegativos (RIFI) para *N. caninum*. Em virtude das mães não terem soroconvertido com a dose inicial de inóculo ( $1 \times 10^7$ ), a fim de poupar a vida dos cordeiros em questão, optou-se em não submetê-los à eutanásia (apenas sangue foi colhido).

Dos cordeiros nascidos das ovelhas do grupo B (inoculadas aos 65 dias pós-concepção), um deles era uma fêmea que nasceu fraca, com hipotermia grave ( $36,6^\circ \text{C}$ ), considerada pequena e de baixo peso (2 kg), segundo Radostits et al. (2002) e cuja mãe apresentou retenção de placenta. Essa cordeira não mamou o colostro e foi soropositiva (RIFI, 1:400) para *N. caninum*. A mesma titulação foi encontrada por Mesquita et al. (2013) em quatro cabritos (36,36%), dentre 11 positivos, de um total de 16 animais, nascidos de cabras naturalmente infectadas por *N. caninum*. A outra ovelha desse grupo pariu um macho hígdio, com 5,5 kg, que, embora soropositivo (RIFI, 1:200), mamou o colostro. A mesma titulação foi encontrada por Mesquita et al. (2013) em um cabrito soropositivo, nascido de cabra naturalmente infectada por *N. caninum*, dois dias após ter mamado o colostro.

Dos cordeiros nascidos das ovelhas do grupo C (inoculadas aos 100 dias pós-concepção), um era uma fêmea hígida (5,5 kg), que não mamou colostro e foi soronegativa para *N. caninum*. O outro, um macho hígido (5 kg), que mamou o colostro e foi soropositivo.

Do grupo D (ovelhas inoculadas aos 120 dias pós-concepção), todos os três cordeiros (parto gemelar ocorreu nesse grupo) foram machos, hígidos, com peso ente 3,5 e 4,5 kg. Destes, um mamou (ovelha 150) e dois (ovelha 116) não mamaram o colostro e todos foram soronegativos para *N. caninum*.

Dos cordeiros nascidos das ovelhas do grupo E (controle – não inoculadas), ambos foram machos, hígidos, com peso de 4,0 e 4,6 kg, que não mamaram colostro e foram soronegativos para *N. caninum* na RIFI.

Os dados referentes à sorologia dos cordeiros estão apresentados no Quadro 2.

**Quadro 2- Recíproca de títulos de anticorpos contra *Neospora caninum* em cordeiros nascidos de ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1.**

CORDEIRO	GRUPO	RESULTADO
81	A	NEGATIVO
117M	A	NEGATIVO
117F	A	NEGATIVO
123	A	NEGATIVO
126	B	POSITIVO (1:400)
128*	B*	POSITIVO (1:200)*
87	C	NEGATIVO
94*	C*	POSITIVO (1:100)*
150*	D*	NEGATIVO*
116M1	D	NEGATIVO
116M2	D	NEGATIVO
96	E (controle)	NEGATIVO
132	E (controle)	NEGATIVO

Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

\*Cordeiros que mamaram o colostro.

Dos treze cordeiros nascidos, três foram positivos (RIFI) para *N. caninum* e destes, somente um não havia mamado o colostro. Dos dez cordeiros que foram negativos para *N. caninum*, apenas um mamou o colostro.

A imunoglobulina G (IgG) é sintetizada e secretada por plasmócitos (derivados de linfócitos B) no baço, linfonodos e na medula óssea. Na vida embrionária do cordeiro, os linfonodos e os linfócitos B são detectados por volta do 50º e 48º dia após a concepção. Na polpa branca do baço, órgão linfoide secundário rico em linfócitos, é onde ocorre resposta imune adquirida e produção de anticorpos, antes mesmo da formação das Placas de Peyer jejunais (75- 80 dias) e as ileais (110-115 dias), sendo esta última considerada a fonte mais importante de linfócitos B em cordeiros (TIZARD, 2008).

Dessa forma, sugere-se que o início formação desse anticorpo ocorra a partir de pouco antes do segundo mês de gestação de uma ovelha, para que posteriormente seja detectado na técnica de RIFI.

Sendo assim, os resultados da sorologia indicam a ocorrência de transmissão vertical de *N. caninum* em um cordeiro do Grupo B (cuja mãe foi inoculada aos 65 dias pós-concepção). Buxton et al. (1998) verificaram que em apenas um cordeiro que nasceu a termo (145 dias de gestação), foi soropositivo para *N. caninum*, RIFI (1:16.384), dentre 11 cordeiros (reabsorvidos ou abortados) de ovelhas inoculadas com  $5 \times 10^5$  taquizoítos. McAllister et al. (1996) tiveram 100% de abortos nas 12 ovelhas inoculadas experimentalmente aos 65 dias de gestação, com doses de  $1 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$ .

No Grupo C, a cordeira que não mamou o colostro e se apresentou soronegativa para *N. caninum*, pode-se supor que não houve infecção transplacentária. Weston et al. (2009) mencionaram que a técnica de RIFI, para pesquisa de neosporose ovina, apresentou menor sensibilidade que a técnica de ELISA e PCR. Howe et al. (2012) citaram que, a depender do método de diagnóstico utilizado para a identificação de *N. caninum* em ovinos, os resultados podem ser subestimados. Assim, sugere-se aplicação de outro teste com maior sensibilidade em material biológico desta cordeira em questão. Entretanto, a não-soroconversão também ocorreu com três, no total de 11 soros fetais cujas mães foram inoculadas experimentalmente por via subcutânea aos 90 dias de gestação com  $5 \times 10^5$  taquizoítos (BUXTON et al., 1998) e, em outro estudo, sete de 12 amostras de fluidos fetais, sendo que as mães também foram inoculadas por via subcutânea aos 90 dias de gestação, porém com dose menor-  $1 \times 10^5$  taquizoítos (BUXTON et al., 2001), ambos os trabalhos com a cepa Nc-1, a mesma utilizada no presente estudo.

Dois outros cordeiros (um do Grupo B e outro do Grupo C) apresentaram sorologia positiva, que permite pressupor a transmissão congênita. Entretanto, pelo fato destes cordeiros terem ingerido colostro antes da colheita do sangue, os anticorpos detectados podem ter origem tanto da infecção vertical quanto resultado de imunidade passiva. Radostis et al. (2002) afirmaram que raças de ovinos com aptidão de lã e para corte (neste caso, da raça Texel) possuem maiores concentrações de imunoglobulinas no colostro se comparadas àquelas com aptidão leiteira. Sendo assim, sugere-se aplicação de testes mais específicos para evitar a atribuição de resultados que sejam falso-positivos.

Por outro lado, um cordeiro do Grupo D apresentou-se soronegativo mesmo tendo mamado o colostro. A provável explicação para este evento seria o intervalo menor entre a colheita de sangue e o início da absorção das imunoglobulinas no trato gastrintestinal, que de acordo com Tizard (2008), atinge seu pico entre 12-24 horas. Ademais, as imunoglobulinas do tipo G podem ser detectadas no soro somente após duas horas da ingestão do colostro. Portanto, é provável que não tenha ocorrido transmissão transplacentária. Todavia, o intervalo da inoculação da mãe (que soroconverteu de forma contínua a partir dos 28 DPI) até o nascimento deste cordeiro, foi de apenas 22 dias. Os cordeiros gêmeos da outra ovelha deste Grupo D, que não mamaram o colostro e não foram sororreagentes, da mesma forma, sugere-se que não houve a transmissão congênita. Essa mãe também teve soroconversão contínua a partir dos 28 DPI, e o intervalo da inoculação na mãe até o nascimento dos cordeiros gêmeos foi de apenas 25 dias.

À vista disso, presume-se que possa ter ocorrido um intervalo muito pequeno para soroconversão da prole desse grupo em níveis detectáveis pela RIFI (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007), ou insuficiente estímulo imunológico para a detecção de anticorpos ao nascimento ou, ainda, uma menor concentração de anticorpos em animais recém-nascidos que nos adultos (PARÉ; THURMOND; HIETALA, 1996). Por conseguinte, não se pode descartar completamente a possibilidade de infecção transplacentária das ovelhas do Grupo D.

De modo igual ao explanado, em estudo realizado por Arranz-Solíz et al. (2015), ovelhas inoculadas experimentalmente com  $1 \times 10^6$  taquizoítos da cepa Nc-Spain7 aos 120 dias de gestação, apresentaram quatro cordeiros soronegativos (44,44%) em um total de nove. Dos cinco cordeiros soropositivos, três apresentaram títulos menores (1:8, 1:8 e 1:16) que o utilizado neste trabalho (1:50) e os outros dois, títulos maiores (1:64 e 1:128). Vale destacar que, em sete cabras inoculadas experimentalmente por via intravenosa com  $1 \times 10^6$  taquizoítos da cepa Nc-Spain7 de *N. caninum* aos 120 dias de gestação, observou-se o nascimento de oito cabritos no total, sendo três cabritos soropositivos e cinco soronegativos. Dentre os oito

nascidos, seis (três sororreagentes e três soronegativos) apresentaram-se como animais fracos, incapazes de se levantarem e mamar o colostro e, os outros dois, cabritos hígidos soronegativos, este último resultado corroborando com o que foi encontrado nos cordeiros das ovelhas do Grupo D deste trabalho (PORTO et al., 2016).

Outrossim, há relatos de baixa sensibilidade no diagnóstico de neosporose bovina na sorologia fetal pela RIFI (BAAR et al., 1995; SÖNDGEN et al., 2001).

Mesquita et al. (2013) observaram que não houve transmissão transplacentária endógena de *N. caninum* para cabritos cujas mães apresentaram títulos de anticorpos menores que 1:200 na RIFI, durante a gestação. Com titulação igual ou maior que 1:200, duas ovelhas do Grupo B (1:200 e 1:800) e a uma ovelha do Grupo C (1:200), pariram cordeiros com presença de títulos de anticorpos, indicando transmissão congênita. Seguindo o mesmo raciocínio, as duas ovelhas do Grupo D que tiveram títulos de anticorpos menores que 1:200 (1:50 e 1:100), pariram cordeiros soronegativos. Do contrário, uma ovelha do Grupo C, cujo título chegou a 1:400 (maior que 1:200), pariu cordeira soronegativa.

Embora diferentes, a similaridade entre as espécies ovina e caprina e os poucos trabalhos de inoculação de *N. caninum* em ovinos, permitem a comparação dos resultados.

Os quatro cordeiros nascidos das ovelhas do Grupo A e os três cordeiros nascidos das ovelhas do Grupo E (controle) não mamaram o colostro e se apresentaram soronegativos.

### **4.2.3 Avaliações clínicas dos cordeiros**

#### *4.2.3.1 Temperatura retal (°C)*

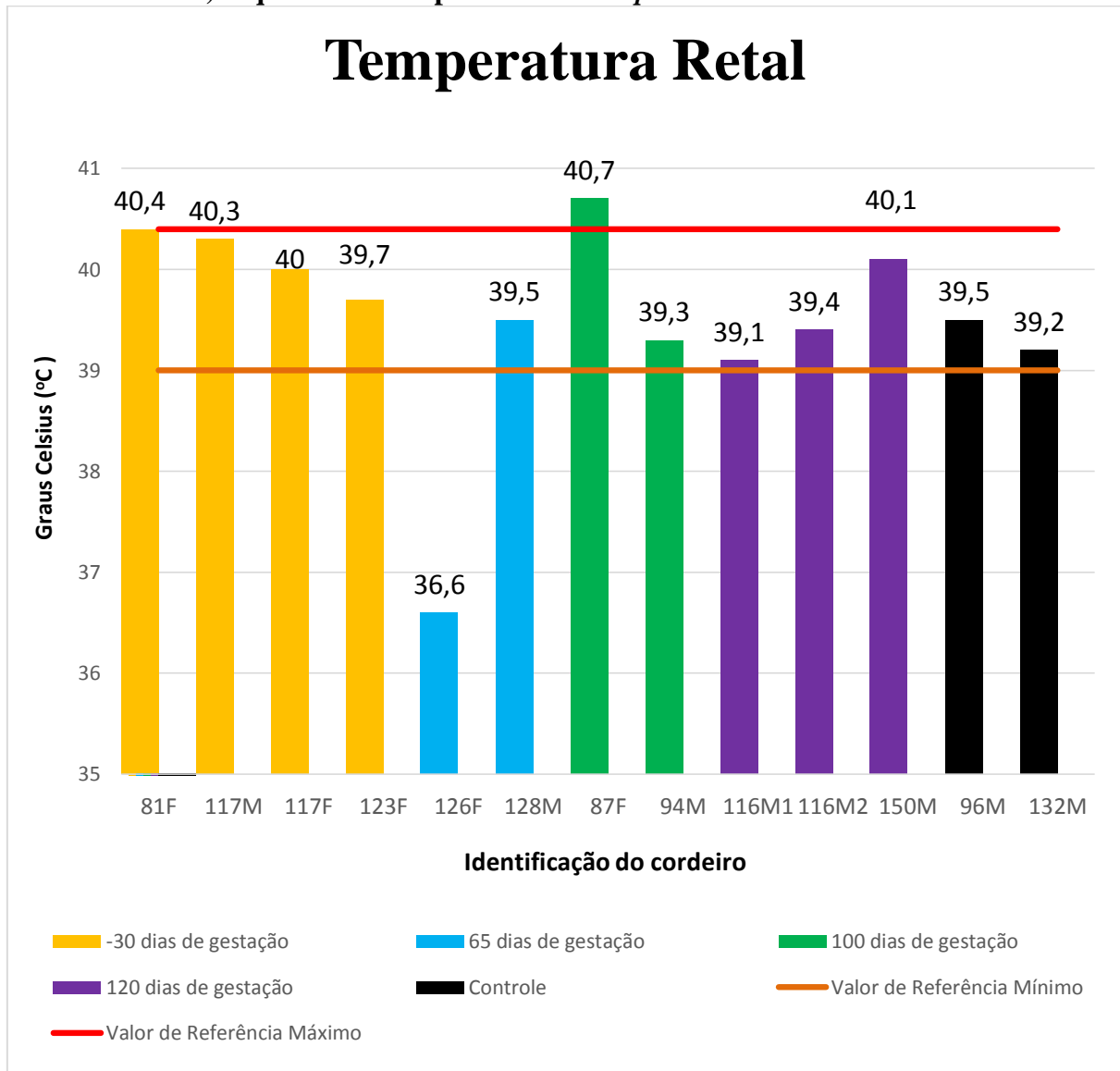
Tendo como base estudo realizado por Avila (2013), apenas uma cordeira, nascida do Grupo C, apresentou hipertermia (40,7°C), cujo valor clínico máximo, segundo a autora, seria de 40,4°C.

Uma cordeira do Grupo B apresentou-se hipotérmica (36,6°C), cujo valor clínico mínimo, segundo a autora, seria de 39°C.

A temperatura retal individual de todos os cordeiros está expressa no Gráfico 12, na página seguinte.



**Gráfico 12 - Resultado da aferição da temperatura retal individual dos cordeiros nascidos de ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum*.**



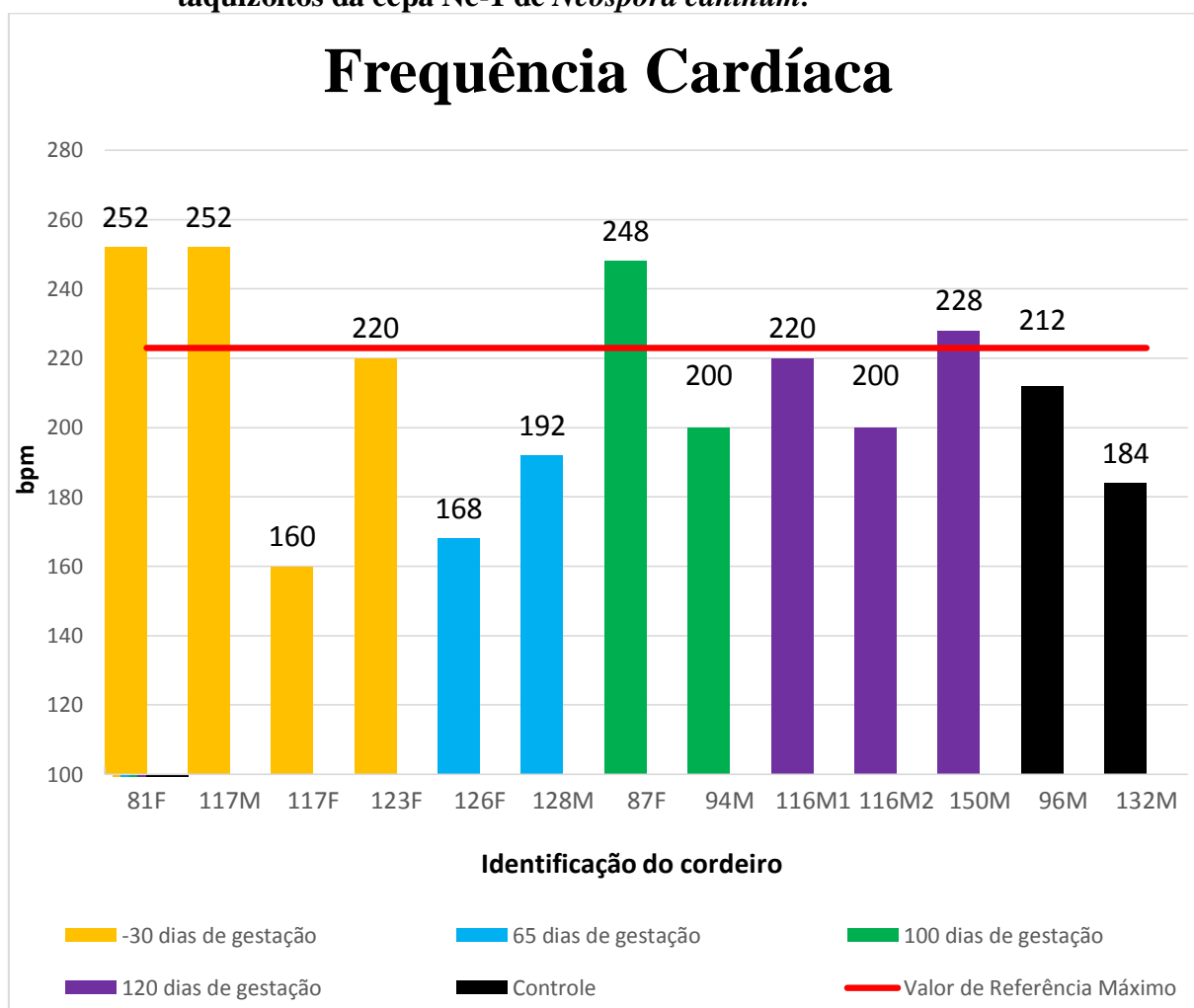
#### 4.2.3.2 Frequência cardíaca (bpm)

Avila (2013) encontrou como parâmetro clínico máximo para frequência cardíaca em ovinos, o valor de 223bpm para cordeiros ao nascimento.

Sendo assim, dois cordeiros (81F e 117M) do Grupo A (252 e 252bpm); uma cordeira (87F) do Grupo C (248bpm) e um cordeiro (150M) do Grupo D (228bpm) apresentaram taquicardia.

Os valores da frequência cardíaca individuais dos cordeiros nascidos estão apresentados no Gráfico 13.

**Gráfico 13 – Resultado da frequência cardíaca (bpm) individual dos cordeiros nascidos de ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum*.**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

#### 4.2.3.3 Frequência respiratória (mpm)

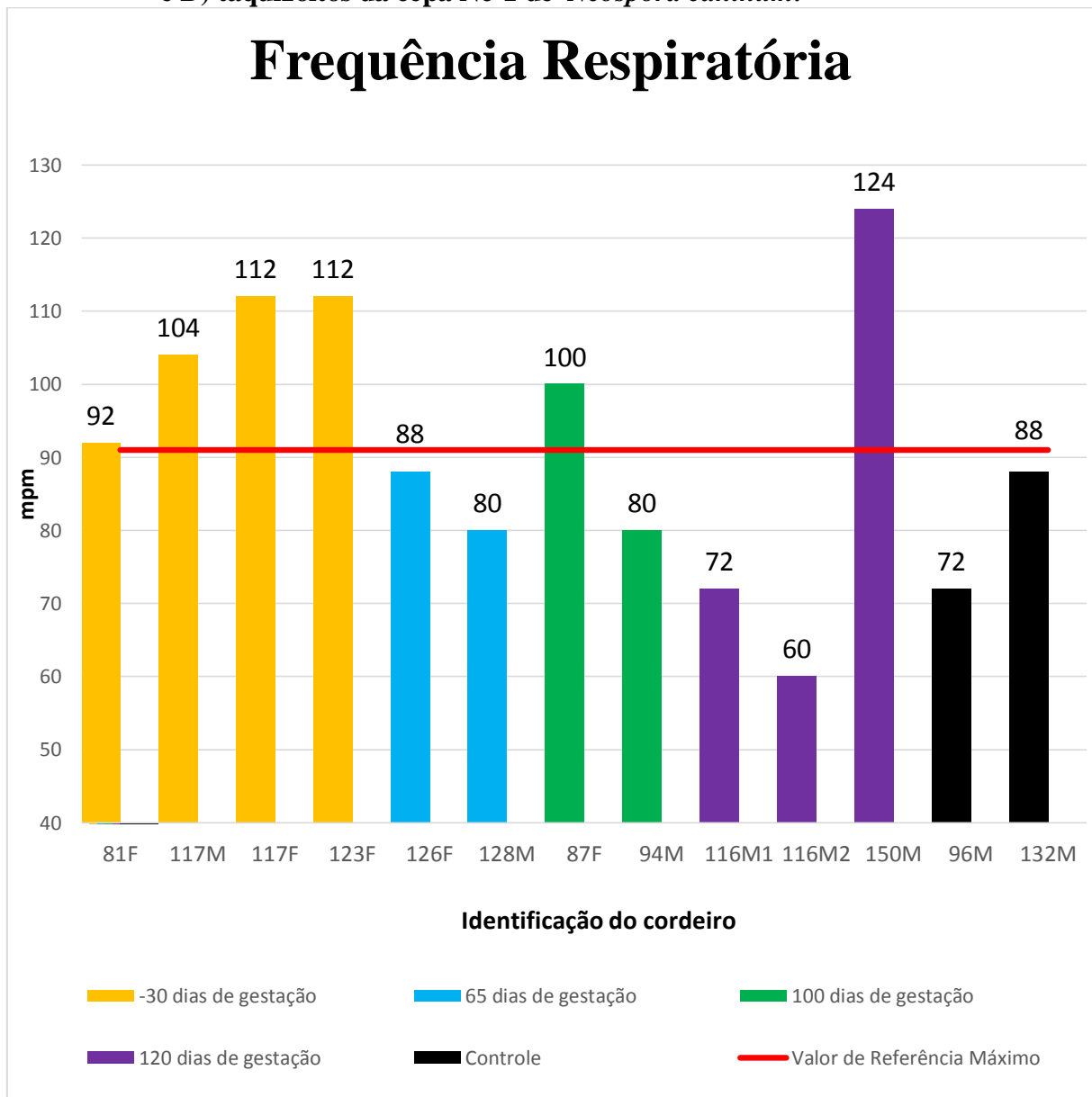
Bovino (2011) elucidou como parâmetro clínico máximo, em cordeiros recém-nascidos, o valor de 91mpm.

Dessa forma, os quatro cordeiros nascidos do Grupo A (92, 104, 112 e 112mpm); uma cordeira do Grupo C (100mpm) e um cordeiro do Grupo D (124mpm) apresentaram-se taquipneicos.

No entanto, deve-se atentar para o que Radostits et al. (2002) explicaram sobre o que chamam de “taquipneia transitória”, devida à hipóxia passageira que eventualmente pode ocorrer no momento da parturição.

Os dados da frequência respiratória dos cordeiros estão descritos no Gráfico 14.

**Gráfico 14 – Resultado da frequência respiratória (mpm) individual dos cordeiros nascidos de ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum*.**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

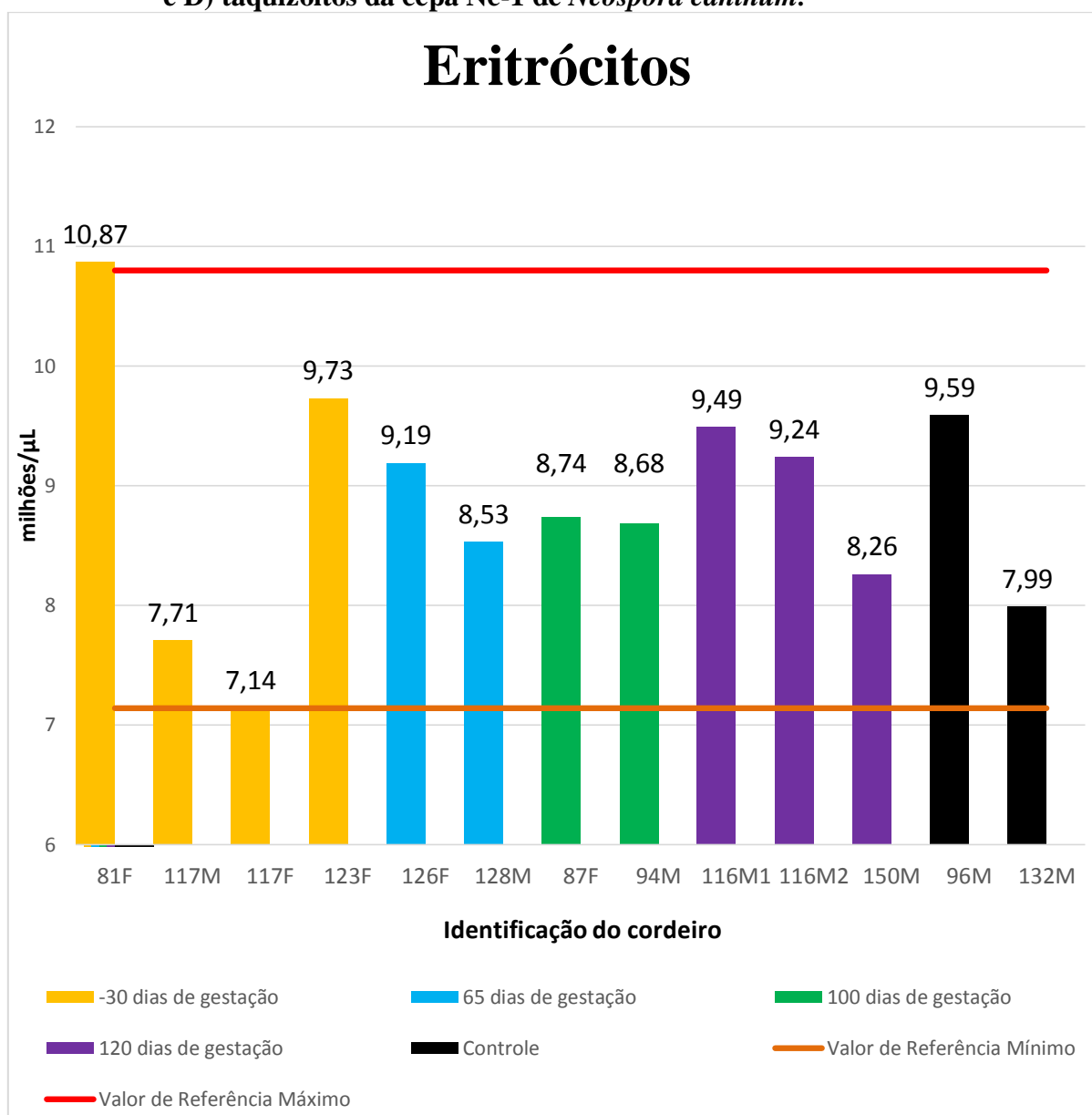
Radostits et al. (2002) citaram que não há um aspecto particular do exame clínico em neonatos, enquanto Feitosa (2014) argumentou da escassez de dados para a prática médico-clínica em animais recém-nascidos, sobretudo os de pecuária, nas quais compreendem os ovinos. A extrapolação de dados clínicos de animais adultos para nupernascidos é preocupante, haja vista fisiologia ímpar destes últimos, pouco comparável entre animais com faixas etárias distintas.

## 4.2.4 Hemograma dos cordeiros

### 4.2.4.1 Eritrócitos ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )

A contagem eritrócitária figurou entre os valores de referência de normalidade em todos os cordeiros (MEYER; HARVEY, 2004; BEZERRA et al., 2013), com valores obtidos variando de 7,14 a 10,8. Os dados da contagem eritrócitária dos cordeiros estão descritos no Gráfico 15.

**Gráfico 15 - Resultado da contagem de eritrócitos ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ) individual dos cordeiros nascidos de ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizóitos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum*.**



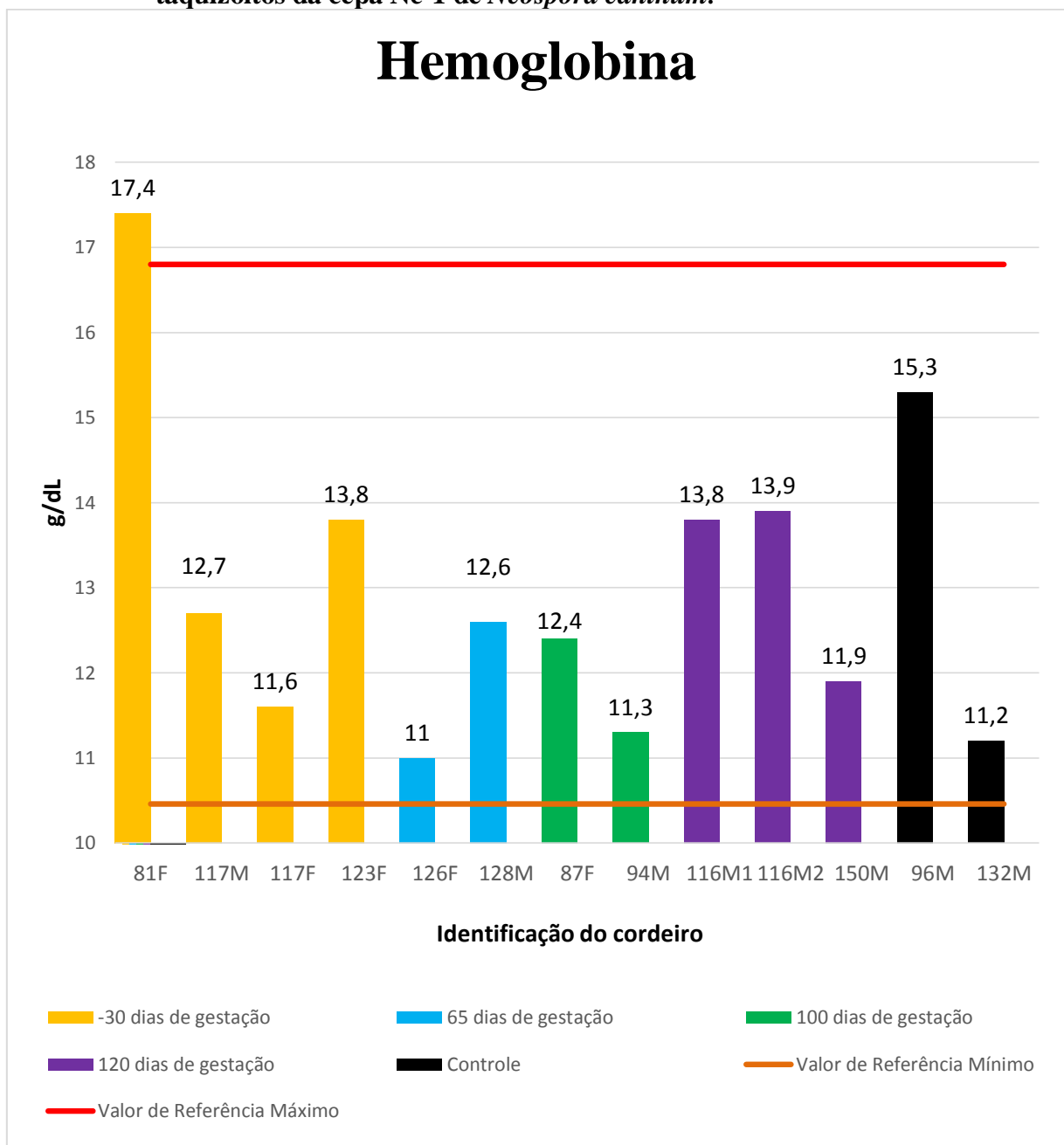
Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

#### 4.2.4.2 Hemoglobina (g/dL)

Somente uma cordeira do Grupo A apresentou valor maior (17,4g/dL) do limite superior (16,8g/dL) encontrado por Avila (2013). Não houve valor menor de hemoglobina, se comparado ao trabalho de David et al. (2012), cujo valor mínimo seria de 10,46g/dL.

Os dados da dosagem de hemoglobina dos cordeiros estão descritos no Gráfico 16.

**Gráfico 16 - Resultado da hemoglobina (g/dL) individual dos cordeiros nascidos de ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum*.**



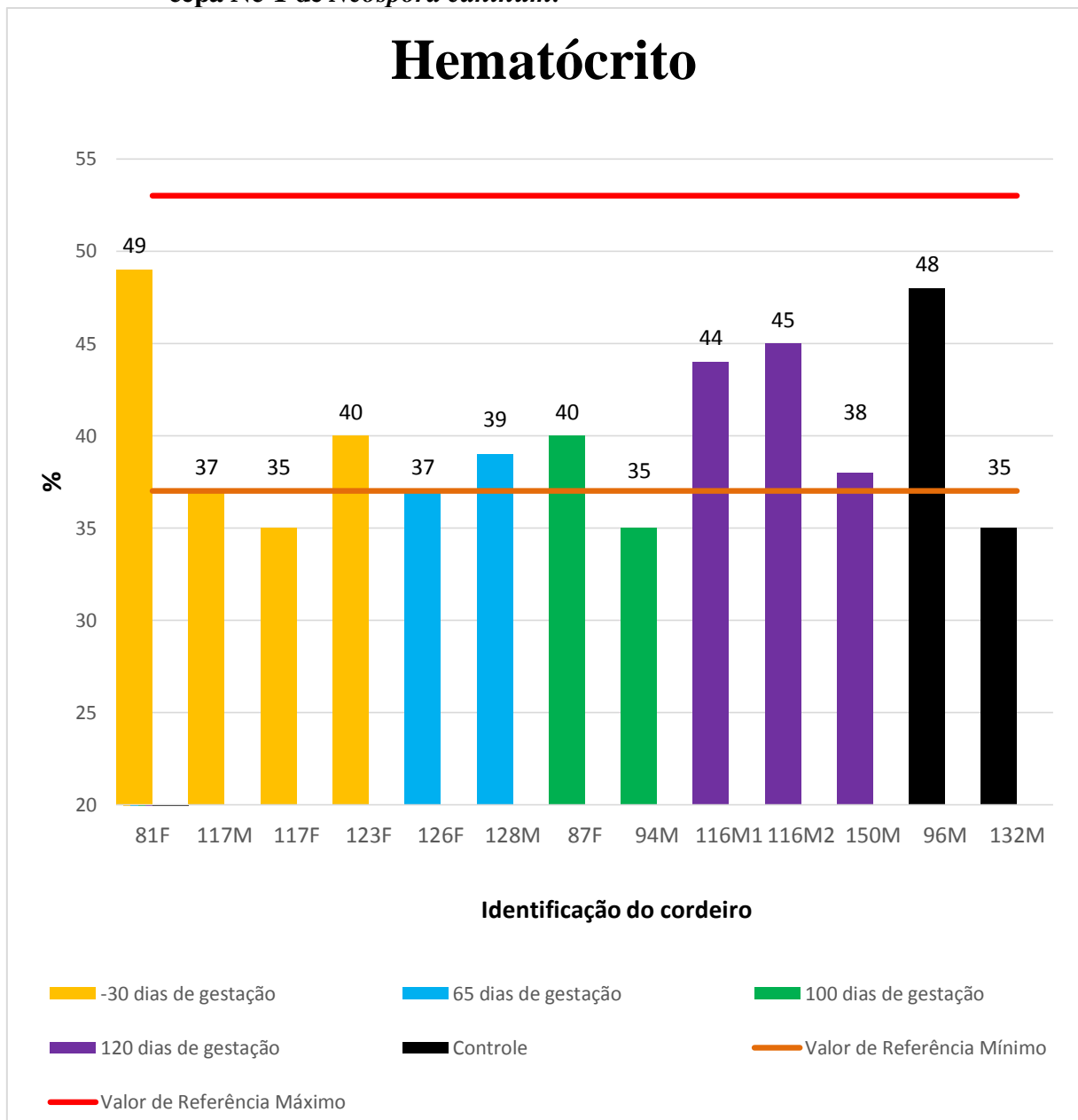
Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

#### 4.2.4.3 Hematócrito (%)

Uma cordeira do Grupo A, um cordeiro do Grupo C e um cordeiro do Grupo E (controle), apresentaram hematócrito de 35%, abaixo dos encontrados por Avila (2013), cujos valores de referência para cordeiros recém-nascidos variaram de 37-53%. No entanto, em ovinos adultos saudáveis, esses valores são considerados fisiológicos (THRALL, 2006).

Os dados da contagem de hematócrito dos cordeiros estão descritos no Gráfico 17.

**Gráfico 17 - Resultado do hematócrito (%) individual dos cordeiros nascidos das ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum*.**

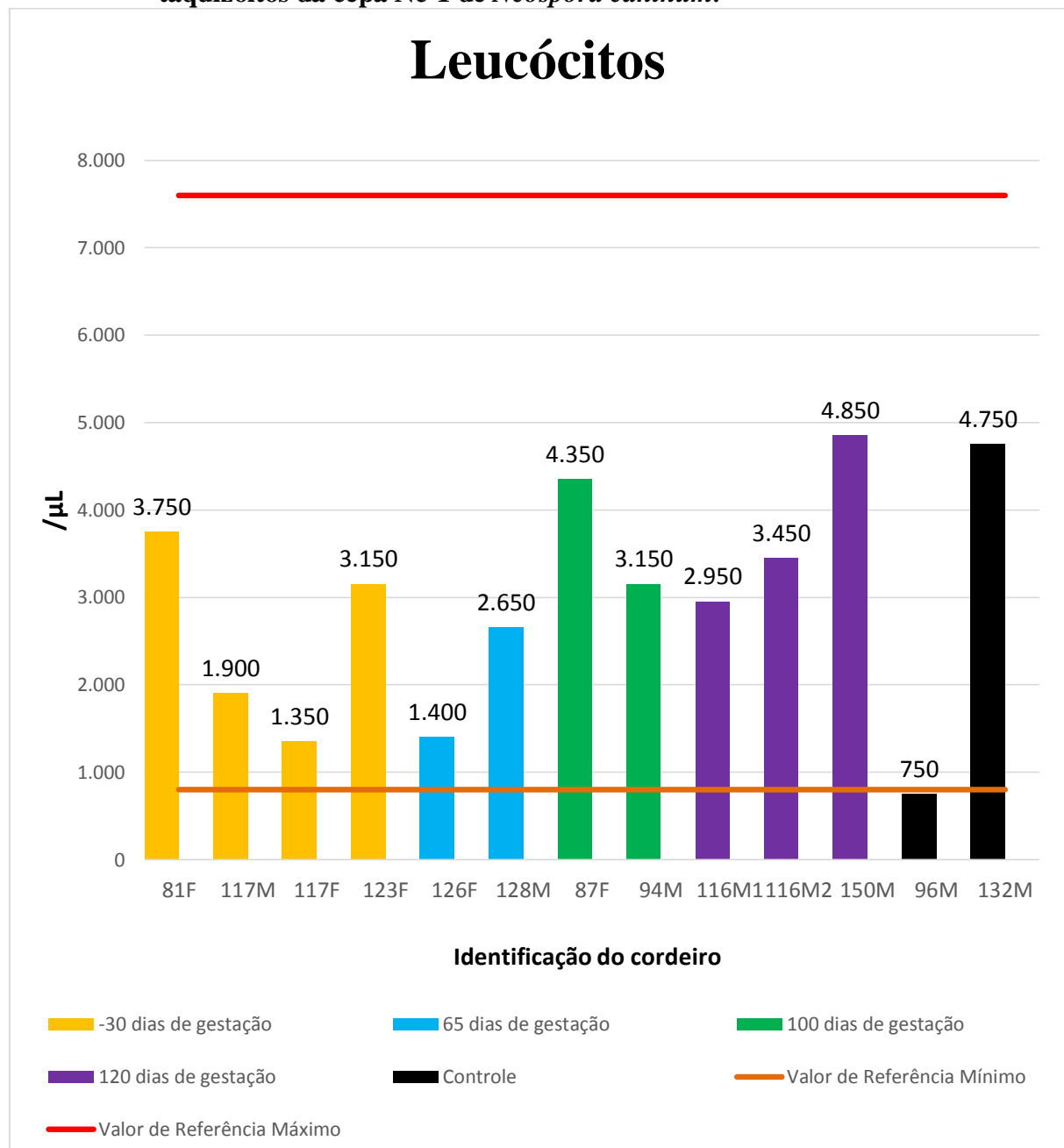


Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

#### 4.2.4.4 Leucócitos ( $\mu\text{L}$ )

Apenas um cordeiro do Grupo E (controle) teve sutil leucopenia ( $750/\mu\text{L}$ ) comparados aos resultados obtidos ( $800-7.600/\mu\text{L}$ ) por Avila (2013). Os dados da contagem de leucócitos dos cordeiros estão descritos no Gráfico 18.

**Gráfico 18 - Resultado da contagem de leucócitos ( $\mu\text{L}$ ) individual dos cordeiros nascidos das ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizóitos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum*.**



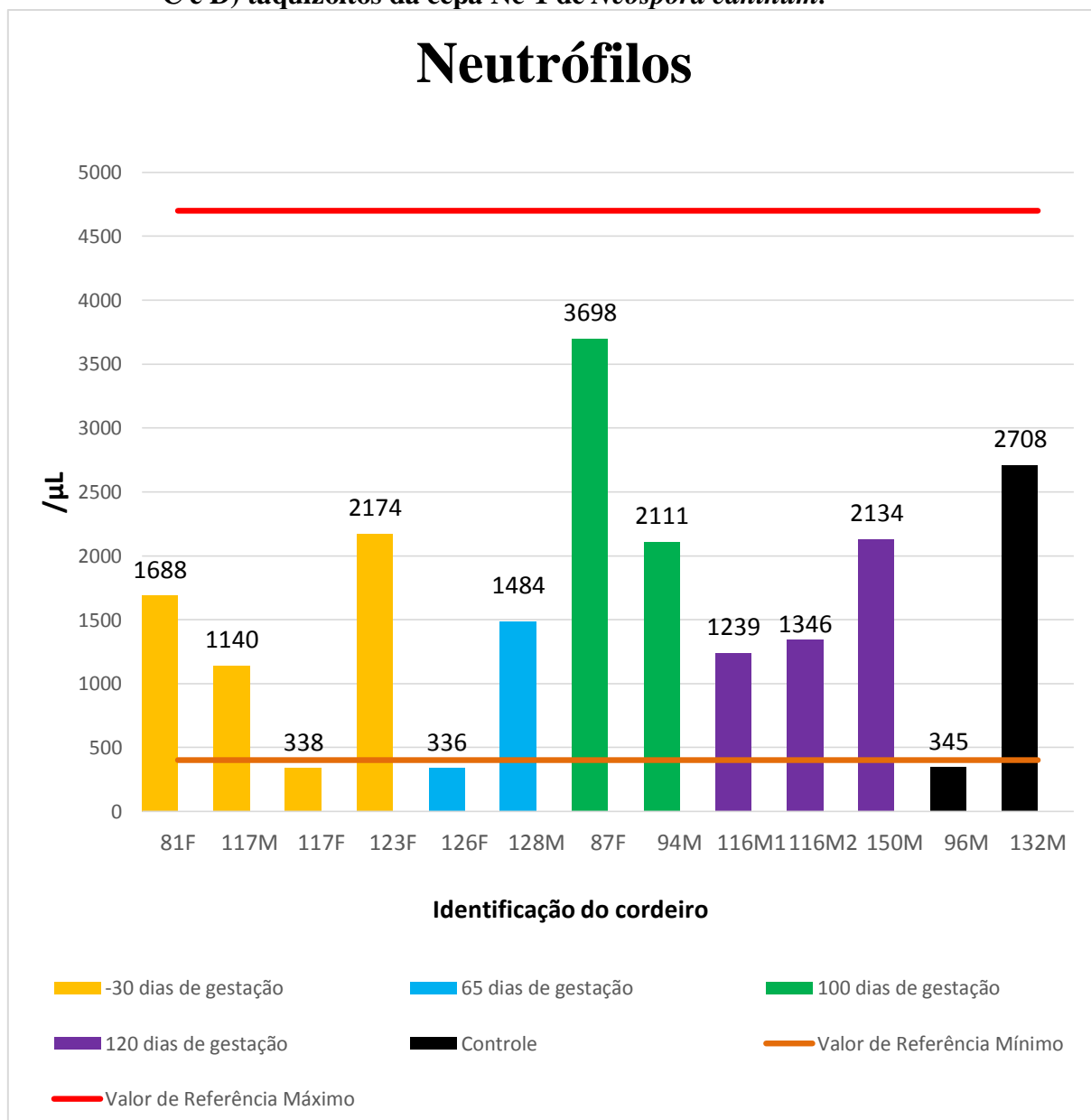
Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

4.2.4.4.1 Neutrófilos (/ $\mu$ L)

Todos os valores de neutrófilos dos cordeiros, em todas as avaliações, estavam dentro dos limites (400-4.700/ $\mu$ L) segundo Avila (2013), exceto em uma cordeira do Grupo A (338/ $\mu$ L), uma cordeira do Grupo B (336/ $\mu$ L) e um cordeiro do Grupo E (Controle) (345/ $\mu$ L), que demonstraram leve neutropenia.

Os dados da contagem de neutrófilos dos cordeiros estão descritos no Gráfico 19.

**Gráfico 19 - Resultado da contagem de neutrófilos (/ $\mu$ L) individual dos cordeiros nascidos das ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum*.**



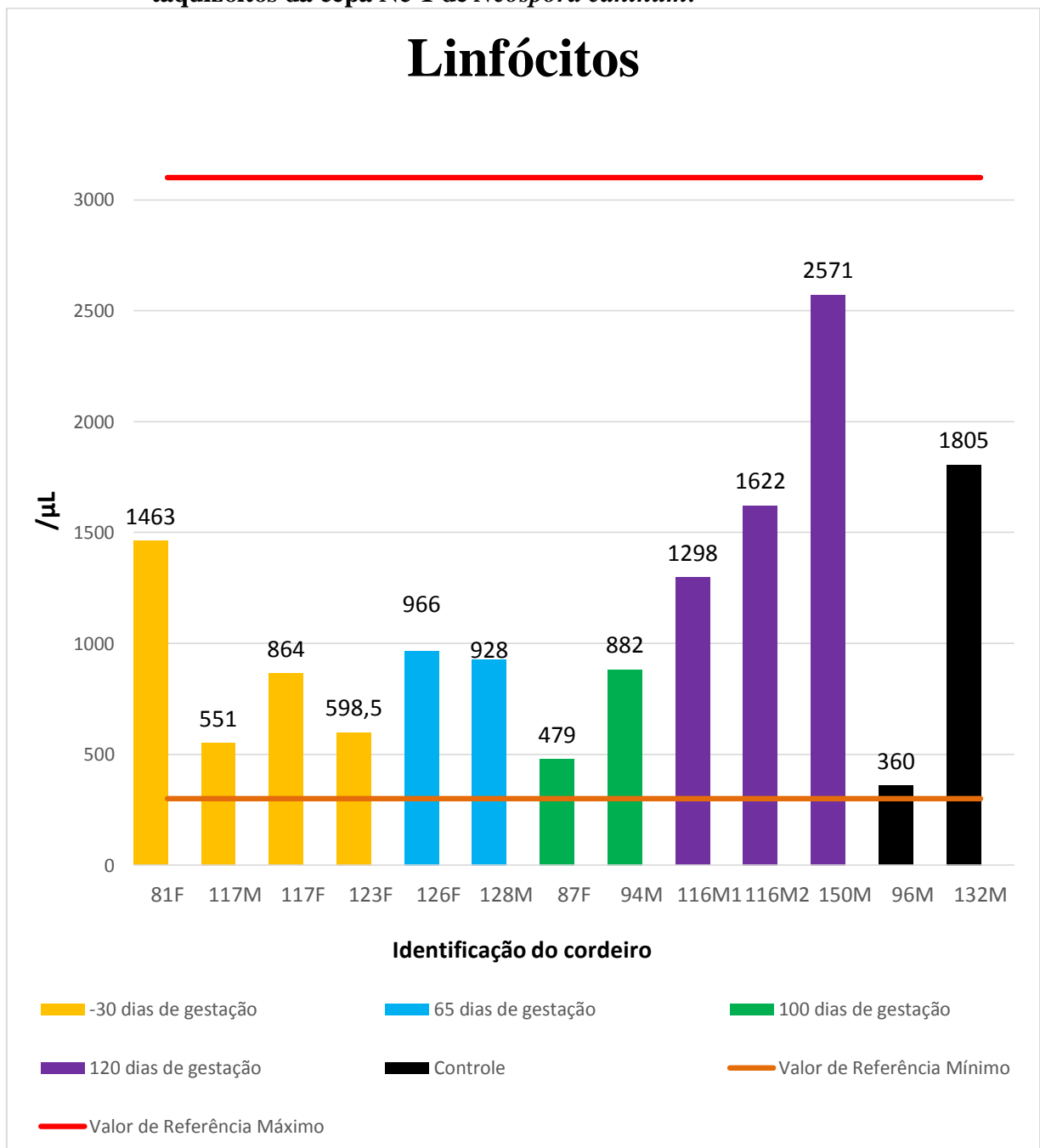
Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.



#### 4.2.4.4.2 Linfócitos ( $\mu\text{L}$ )

Todos os valores de linfócitos dos cordeiros, em todas as avaliações, estavam dentro dos limites ( $300\text{-}3.100/\mu\text{L}$ ) estipulados por Avila (2013). Os dados da contagem de linfócitos dos cordeiros estão descritos no Gráfico 20.

**Gráfico 20 - Resultado da contagem de linfócitos ( $\mu\text{L}$ ) individual dos cordeiros nascidos das ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizóitos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum*.**



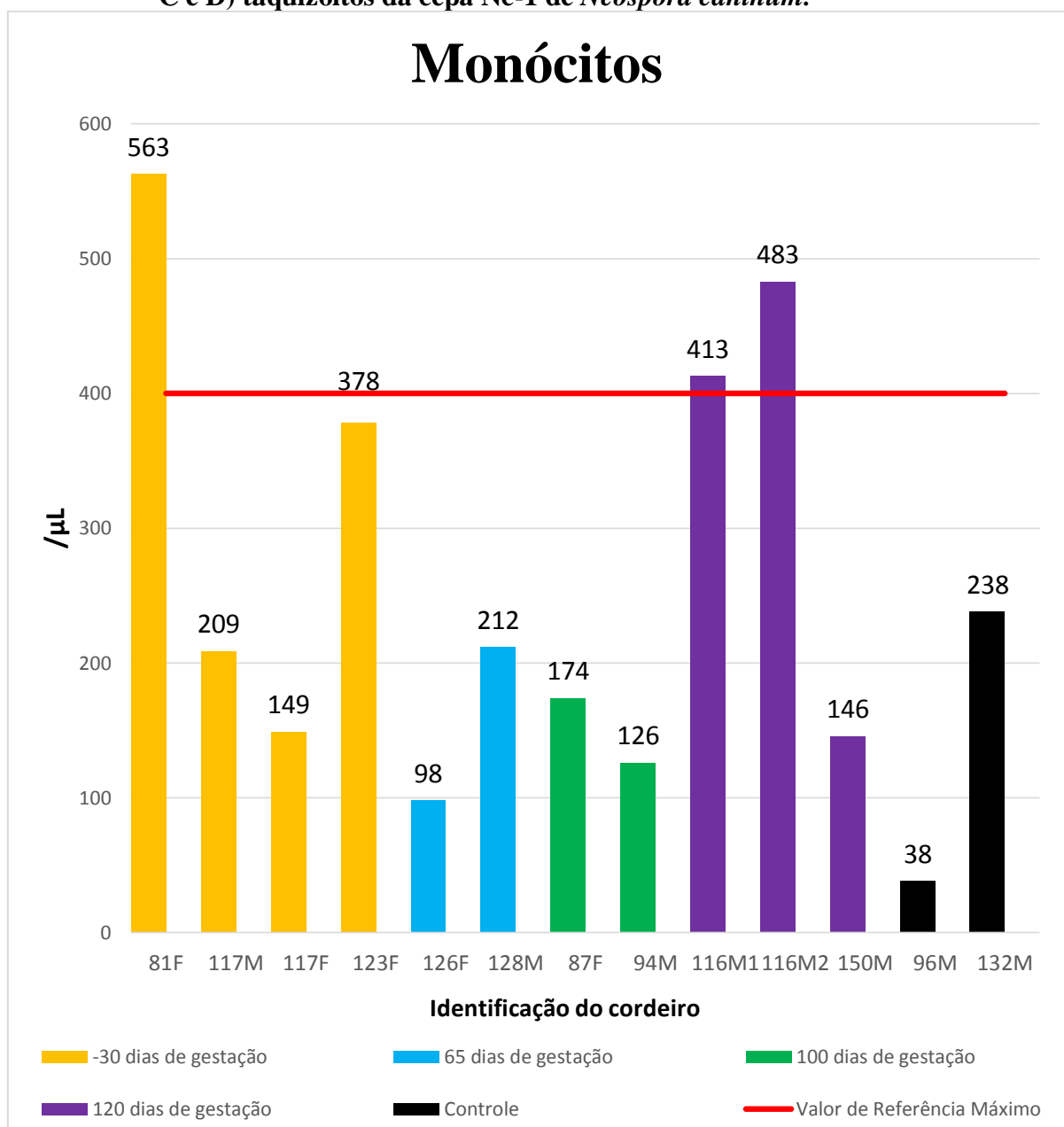
Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

4.2.4.4.3 Monócitos ( $\mu\text{L}$ )

Uma cordeira do Grupo A (563/ $\mu\text{L}$ ), e os dois cordeiros gêmeos nascidos de uma ovelha do Grupo D (413; 483/ $\mu\text{L}$ ) apresentaram contagem maior de monócitos, diferindo dos valores máximos (0-400/ $\mu\text{L}$ ) encontrados por Avila (2013).

Os dados da contagem de monócitos dos cordeiros estão descritos no Gráfico 21.

**Gráfico 21 - Resultado da contagem de monócitos ( $\mu\text{L}$ ) individual dos cordeiros nascidos das ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum*.**



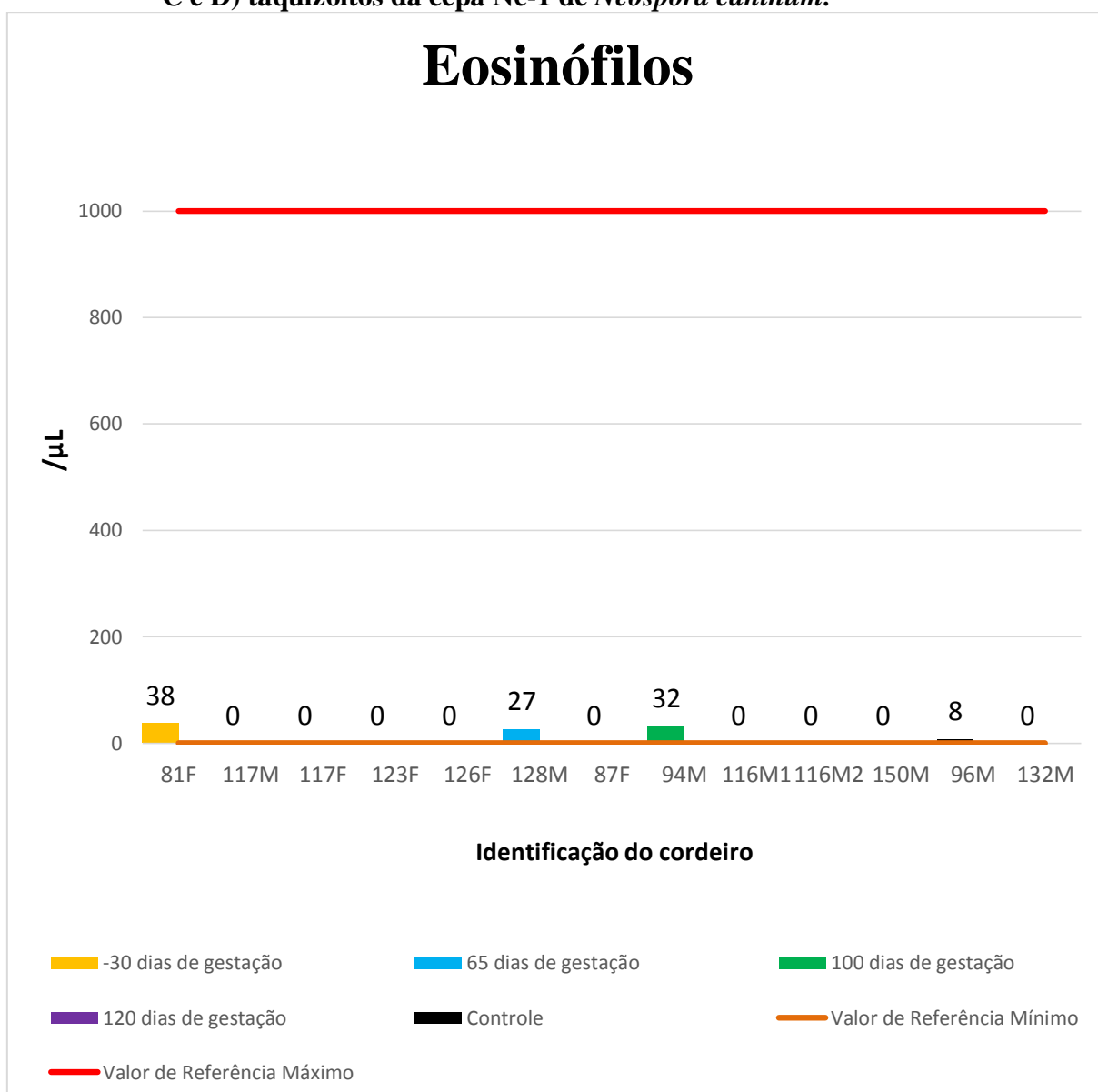
Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

#### 4.2.4.4.4 Eosinófilos ( $/\mu\text{L}$ )

Uma cordeira do Grupo A ( $38/\mu\text{L}$ ), um cordeiro do Grupo B ( $27/\mu\text{L}$ ), um cordeiro do Grupo C ( $32/\mu\text{L}$ ) e um cordeiro do Grupo E ( $8/\mu\text{L}$ ), apresentam eosinófilos na contagem, sendo que não foi observada a presença nos demais cordeiros. No entanto, todos esses valores estão dentro da referência de normalidade para ovinos adultos ( $0-1.000/\mu\text{L}$ ), de acordo com Thrall (2006).

Os dados da contagem de eosinófilos dos cordeiros estão descritos no Gráfico 22.

**Gráfico 22 - Resultado da contagem de eosinófilos ( $/\mu\text{L}$ ) individual dos cordeiros nascidos das ovelhas inoculadas com  $1 \times 10^7$  (Grupo A) ou  $2 \times 10^7$  (Grupos B, C e D) taquizoítos da cepa Nc-1 de *Neospora caninum*.**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

#### 4.2.4.4.5 Basófilos (/ $\mu$ L)

Não houve a presença de basófilos em todas as avaliações de todos os cordeiros nascidos, resultado este considerado normal na espécie ovina (0- raros), de acordo com Thrall (2006).

Para Bauer et al. (1984), em estudos com potros recém-nascidos, alertaram que se deve ter cautela na interpretação de resultados hematológicos em neonatos, por que os valores normais são frequentemente muito diferentes dos valores de referência atribuídos aos animais adultos.

### 4.2.5 Avaliação histopatológica

Não houve eutanásia e colheita de órgãos dos quatro cordeiros nascidos do Grupo A (apenas colheita de sangue), em virtude das mães não terem soroconvertido em momento algum, poupando a vida da prole.

Do grupo B, macroscopicamente, um cordeiro apresentou moderada quantidade de líquido translúcido na cavidade abdominal. Não foram verificadas alterações na cordeira acometida por transmissão vertical confirmada pela RIFI em soro pré-colostral.

Do Grupo C, a placenta de uma das ovelhas apresentou pequena quantidade de macrófagos contendo pigmento acastanhado no interior do citoplasma (hemossiderina) moderada multifocal. A placenta de outra ovelha, excepcionalmente, foi o único órgão não analisado, por não ter sido encontrada, provavelmente ingerida por ela própria na parturição (parto não assistido, o primeiro dentre todos).

Do Grupo D, uma ovelha teve, na placenta, moderada quantidade de macrófagos contendo moderada quantidade de pigmento acastanhado no citoplasma (hemossiderina).

Do Grupo E (controle), uma ovelha teve, na placenta, hemorragia moderada focalmente extensa associada à pequena quantidade de macrófagos contendo pigmento acastanhado no interior do citoplasma (hemossiderina). Macroscopicamente, no saco pericárdico de seu respectivo cordeiro, havia moderada quantidade de líquido translúcido pouco viscoso.

Com bases nos resultados obtidos, as lesões macro e microscópicas não foram significativas neste trabalho, diferindo de estudos similares existentes, sejam eles nacionais ou internacionais, os quais todos encontraram lesões sugestivas da infecção por *N. caninum*, sobretudo àqueles trabalhos que utilizaram a mesma cepa (Nc-1) e com dose de inóculo

próxima ( $2,5 \times 10^5$ ;  $1 \times 10^7$ ;  $1 \times 10^7$ ;  $1,5 \times 10^7$ ) ao utilizado neste trabalho (BUXTON et al., 1998; 2001; INNES et al., 2001; DUBEY; LINDSAY, 1990), respectivamente. No entanto, como não houve abortos ou natimortos, não eram esperadas alterações, de maior monta na placenta, normalmente associadas ao óbito dos conceptos por injúria placentária causada pelos taquizoítos, o que efetivamente não ocorreu.

Para Anderson, Andrianarivo e Conrad (2000), a identificação do protozoário é difícil, haja vista as lesões macroscópicas serem infrequentes e o número de parasitos ser de quantidade muito reduzida nos tecidos, atenuando as chances de visualização em cortes histológicos corados pela Hematoxilina-Eosina.

Sendo assim, o que foi encontrado não se trata de lesões patológicas, mas achados considerados normais, como explicam Nascimento e Santos (2011, p.75-76) sobre hemorragia e eritrofagocitose no placentoma de ruminantes:

A hemorragia do tecido materno seguida da eritrofagocitose pelas células do trofoblasto não tem se constituído em patologia, uma vez que, entre os ruminantes, este é o principal mecanismo de transferência de ferro da mãe para o feto. Entre os pequenos ruminantes, ocorre a formação de verdadeiros hematomas no placentoma, junto à base das vilosidades coriônicas (na região conhecida como zona arcada).



## CONCLUSÕES

- O presente estudo indicou infecção transplacentária exógena em uma cordeira nascida de uma ovelha inoculada com  $2 \times 10^7$  taquizoítos IV aos 65 dias de gestação, por meio da detecção de imunoglobulina G pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), com titulação de 1:400.
- Os resultados ainda sugerem que o mesmo ocorreu com outras duas ovelhas (inoculadas aos 65 e aos 100 dias de gestação), no entanto, testes com maior especificidade (PCR/Imunoistoquímica) são necessários para a confirmação da transmissão congênita nestes animais que, embora soropositivos, mamaram o colostro antes da colheita do sangue.
- Recomenda-se aplicação de técnicas com maior sensibilidade (PCR/Imunoistoquímica) em cordeiros que se apresentaram sorologicamente negativos (não evidenciando a transmissão congênita) pela técnica da RIFI (uma cordeira do Grupo C e três cordeiros do Grupo D), para excluir resultados falso-negativos do objeto de estudo em questão.
- Sugere-se a realização de outros estudos hematológicos (hemogramas completos) referentes ao parasitismo pelo *N. caninum*, sobretudo em animais de produção, a fim de se obter dados para melhor comparação, em virtude de escassa literatura.





## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. A. O. Epidemiologia de *Neospora caninum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, supl. 1, p. 37-40, set. 2004.
- ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 417-431, jul. 2000.
- ARRANZ-SOLÍS, D. et al. Influence of the gestational stage on the clinical course, lesional development and parasite distribution in experimental ovine neosporosis. **Veterinary Research**, v. 46, n. 19, p. 1-13, mar. 2015.
- ARRANZ-SOLÍS, D. et al. Systemic and local immune responses in sheep after *Neospora caninum* experimental infection at early, mid and late gestation. **Veterinary Research**, v. 47, n. 1, p. 1-13, dez. 2016.
- AVILA, L. G. **Avaliação clínico-laboratorial de cordeiros nascidos a termo e prematuros**. 2013. 100 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2013.
- BAAR, B. C. et al. *Neospora*-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure and immunoreactivity. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 3, n. 1, p. 39-46, jan. 1991.
- BAAR, B. C. et al. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. **Laboratory Investigation**, v. 71, n. 2, p. 236-242, ago. 1994.
- BAAR, B. C. et al. Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. **Veterinary Record**, v. 137, n. 24, p. 611-613, dez. 1995.
- BAUER, J. E. et al. Clinical chemistry reference values of foals during the first year of life. **Equine Veterinary Journal**, v. 16, n. 4, p. 361-363, jul. 1984.
- BEZERRA, L. R. et al. Influence of concentrate supplementation and the animal category in the hemogram of Morada Nova sheep. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 6, p. 1738-1744, dez. 2013.
- BISHOP, S. et al. The first report of ovine cerebral neosporosis and evaluation of *Neospora caninum* prevalence in sheep in New South Wales. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 1-2, p. 137-142, maio. 2010.

BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **Internacional Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1497-1507, out. 1999.

BOVINO, F. **Determinação de escore APGAR, dos valores hemogasométricos e do proteinograma sérico em cordeiros (*Ovis aries*) nascidos de partos normais e cesarianas.** 2011. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2011.

BUXTON, D. et al. Experimental infection of non-pregnant and pregnant sheep with *Neospora caninum*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 117, n. 1, p. 1-16, jul. 1997.

BUXTON, D. et al. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v. 118, n. 4, p. 267-279, maio. 1998.

BUXTON, D. et al. Immunity to experimental neosporosis in pregnant sheep. **Parasite Immunology**, v. 23, n. 2, p. 85-91, fev. 2001.

CALZADA, P. C. et al. Valores hematológicos en vacas de raza Holstein-Friesian seropositivas a *Neospora caninum* de la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo, México. **Veterinaria México**, v. 33, n. 2, p. 119-124, abr. 2002.

CONRAD, P. A. et al. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, n. 4, p. 572-578, out. 1993.

DAVID, C. M. G. et al. Padrão hematológico de cordeiros da raça Santa Inês criados sob manejo semi-extensivo da região oeste de São Paulo. **Boletim de Indústria Animal**, v. 69, n. 1, p. 79-84, jan./jun. 2012.

DUBEY, J. P. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, maio. 1988.

DUBEY, J. P. et al. Fatal congenital *Neospora caninum* in a lamb. **Journal of Parasitology**, v. 76, n. 1, p. 127-130, fev. 1990.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, n. 3, p. 230-233, jul. 1990.

DUBEY, J. P. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 8, p. 929-946, jul. 2002.

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

DUBEY, J. P. et al. Gray Wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 2-4, p. 382-387, set. 2011.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals- The last five years. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1-2, p. 90-108, ago. 2011.

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

FAOSTAT - **Food and agriculture organization of the United Nations** (2016).  
Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em: 22 out. 2016.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária: a arte do diagnóstico**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2014. 628 p.

GONDIM, L. F. P. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 159-161, fev. 2004.

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. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 6, p. 1159-1163, dez. 2002.

HASSIG, M. et al. *Neospora caninum* in sheep: a herd case report. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 3, p. 213-220, nov. 2003.

HELMICK, B. et al. Serological investigation of aborted sheep and pigs for infection by *Neospora caninum*. **Research in Veterinary Science**, v. 73, n. 2, p. 187-189, out. 2002.

HOWE, L. et al. The role of *Neospora caninum* in three cases of unexplained ewe abortions in the southern North Island of New Zealand. **Small Ruminant Research**, v. 75, n. 2-3, p. 115-122, mar. 2008.

HOWE, L. et al. Potential involvement of *Neospora caninum* in naturally occurring ovine abortions in New Zealand. **Veterinary Parasitology**, v. 185, n. 2-4, p. 64-71, abr. 2012.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estatísticas sobre Pecuária (Efetivo/Rebanho)**, 2015. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2&z=t&o=23&u1=1&u2=1&u3=1>>. Acesso em: 20 out. 2016.

INNES, E. A. et al. A previous infection with *Toxoplasma gondii* does not protect against a challenge with *Neospora caninum* in pregnant sheep. **Parasite Immunology**, v. 23, n. 3, p. 121-132, dez. 2001.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Gestação, fisiologia pré-natal e parto. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. p. 141-155.

JENKINS, M.; TUO, W.; DUBEY, J. Evaluation of vaccination with *Neospora caninum* protein for prevention of fetal loss associated with experimentally induced neosporosis in sheep. **American Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 10, p. 1404-1408, out. 2004.

JOLLEY, W. R. et al. Repetitive abortion in *Neospora*-infected ewes. **Veterinary Parasitology**, v. 82, n. 3, p. 251-257, abr. 1999.

KING, J. S. et al. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 8, p. 945-950, jul. 2010.

KOBAYASHI, Y. et al. Naturally occurring *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 2, p. 434-436, abr. 2001.

LOBATO, J. et al. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by Human Immunodeficiency Virus or have neurological disorders. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 1, p. 84-89, jan. 2006.

MADRUGA, M. S. et al. Qualidade da carne de cordeiros Santa Inês terminados em diferentes dietas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 1, p. 309-315, jan./fev. 2005.

MASALA, G. et al. Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, n. 1, p. 96-98, jan. 2007.

McALLISTER, M. M. et al. Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. **Veterinary Pathology Journal**, v. 33, n. 6, p. 647-655, nov. 1996.

- McALLISTER, M. M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1473 -1478, set. 1998.
- MESQUITA, L. P. et al. Antibody kinetics in goats and conceptuses naturally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3-4, p. 327-333, set. 2013.
- MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Medicina de Laboratório Veterinário: Interpretação e Diagnóstico**. São Paulo: Roca, 1995. 293 p.
- MEYER, D. J.; HARVEY, J. W. **Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation and Diagnosis**. 3. ed. St. Louis: Saunders, 2004. 351 p.
- MOBINI, S.; HEATH, A. M.; PUGH, D. G. Teriogenologia de ovinos e caprinos. In: PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2004. p. 145-208.
- MOURA, A. B. de. et al. *Neospora caninum*: seroprevalence and risk factors for ewes from Santa Catarina Plateau, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 5, p. 2.591-2.600, set./out. 2014.
- NASCIMENTO, E. F. do; SANTOS, R. L. **Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 154 p.
- NASCIMENTO, M. C. O. do. ***Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em tecido cerebral de raposa-do-campo (*Pseudalopex vetulus*) no Estado da Paraíba, Brasil**. 2013. 42 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2013.
- NASIR, A. **Sero-epidemiology transmission dynamics and hematological studies on *Neospora caninum* in dairy buffaloes**. 2011. 152 p. Tese (PhD em Medicina Clínica) – Universidade de Ciências Veterinária e Animal, Departamento de Clínica Médica e Cirúrgica, Laore, 2011.
- O'HANDLEY, R. et al. Vaccination of ewes for prevention of vertical transmission of *Neospora caninum*. **American Journal Veterinary Research**, v. 64, n. 4, p. 449-452, abr. 2003.
- OTTER, A. et al. Results of a survey to determine whether *Neospora* is a significant cause of ovine abortion in England and Wales. **Veterinary Record**, v. 140, n. 7, p. 175-177, fev. 1997.

PANADERO, R. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild and domestic ruminants sharing pastures in Galicia (Northwest Spain). **Research in Veterinary Science**, v. 88, n. 1, p. 111-115, fev. 2010.

PARÉ, J.; THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhoo mortality. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 2, p. 133-139, abr. 1996.

PORTO, W. J. N. et al. Experimental caprine neosporosis: the influence of gestational stage on the outcome of infection. **Veterinary Research**, v. 47, n. 29, p 1-10, fev. 2016.

PUGH, D. G. **Clínica de Ovinos e Caprinos**. São Paulo: Roca, 2004. 528 p.

RADOSTITS, O. M. et al. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1.737p.

REICHEL, M. P.; ROSS, G. P.; McALLISTER, M. M. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of *Neospora caninum* infection in sheep and determination of the apparent prevalence of infection in New Zealand. **Veterinary Parasitology**, v. 151, n. 2-4, p. 323-326, fev. 2008.

RETTIGNER, C. et al. Immune response and antigen recognition in non-pregnant ewes experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 261-271, ago. 2004.

ROMANELLI, P. R. et al. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 82, n. 2, p. 202-207, abr. 2007.

ROSSI, G. F. et al. Evaluation of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Uberlândia, Minas Gerais State, Brazil, by different serological methods. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 3-4, p. 252-259, fev. 2011.

SERRANO, B. et al. Peripheral white blood cells count throughout pregnancy in non-aborting *Neospora caninum*-seronegative and seropositive high-producing dairy cows in a Holstein Friesian herd. **Research in Veterinary Science**, v. 90, n. 3, p. 457-462, jun. 2011.

SHOEMAKER, M. E. **The Effect of Stress on the Ecology of *Neospora caninum* in Bison (*Bison bison*)**. 2014. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Medicina Veterinária Preventiva- Universidade Estadual de Ohio, Columbus, 2014.

SILVA, A. F. da. **Anatomo-histopatologia, imuno-histoquímica e análises clínicas de ovinos infectados naturalmente por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* no Estado do Rio de Janeiro**. 2011. 134 p. Dissertação (Mestrado em Clínica e Reprodução Animal)- Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2011.

SILVA, C. H. S. **Estudo da transmissão vertical de *Neospora caninum* em ovelhas deslanadas**. 2005. 47 p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, 2005.

SOARES, H. S. et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in sheep from Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 3-4, p. 211-214, mar. 2009.

SOCARRÁS, T. J. O. **Infecção experimental de ovelhas deslanadas com *Neospora caninum***. 2001. 70 p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, 2001.

SÖNDGEN, P. et al. Bovine neosporosis: immunoblot improves foetal serology. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n. 4, p. 279-290, dez. 2001.

SPILOVSKA, S.; REITEROVA, K. Seroprevalence of *Neospora caninum* in aborting sheep and goats in the Eastern Slovakia. **Folia Veterinaria**, v. 52, n. 1, p. 33-35, abr. 2008.

SYED-HUSSAIN, S. S. et al. Detection of *Neospora caninum* DNA in semen of experimental infected rams with no evidence of horizontal transmission in ewes. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3-4, p. 534-542, nov. 2013.

SYED-HUSSAIN, S. S. et al. Vertical transmission in experimentally infected sheep despite previous inoculation with *Neospora caninum* NcNZ1 isolate. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 3-4, p. 150-158, mar. 2015.

SYED-HUSSAIN, S. S. et al. Study on the use of toltrazuril to eliminate *Neospora caninum* in congenitally infected lambs born from experimentally infected ewes. **Veterinary Parasitology**, v. 210, n. 3-4, p. 141-144, jun. 2015.

THRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2006. 582 p.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 587 p.

TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. Endogenous and exogenous transplacental infection on *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 12, p. 558-561, dez. 2005.

VIANA, J. G. A. Panorama geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, Porto Alegre, n. 12, p. 1-9, mar. 2008.

WEST, D. M. et al. A possible role for *Neospora caninum* in ovine abortion in New Zealand. **Small Ruminant Research**, v. 62, n. 1-2, p. 135-138, mar. 2006.

WESTON, J. F. et al. Dose-titration challenge of young pregnant sheep with *Neospora caninum* tachyzoites. **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2-4, p. 183-191, out. 2009.