

LEONARDO SILVA DA COSTA

NEOSPOROSE COMO CAUSA DE ABORTAMENTO EM BOVINOS DO ESTADO DE SANTA CATARINA: CARACTERIZAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA, MOLECULAR E SOROLÓGICA

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

Orientadora: Renata Assis Casagrande

LAGES, SC

2020

Costa, Leonardo Silva da
NEOSPOROSE COMO CAUSA DE ABORTAMENTO EM
BOVINOS DO ESTADO DE SANTA CATARINA :
CARACTERIZAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA, MOLECULAR
E SOROLÓGICA / Leonardo Silva da Costa. -- 2020.
87 p.

Orientadora: Renata Assis Casagrande
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2020.

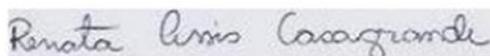
1. protozoário. 2. perda reprodutiva. 3. doença infecciosa. 4.
patologia. I. Assis Casagrande, Renata . II. Universidade do Estado
de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa
de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

LEONARDO SILVA DA COSTA

NEOSPOROSE COMO CAUSA DE ABORTAMENTO EM BOVINOS DO ESTADO DE SANTA CATARINA: CARACTERIZAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA, MOLECULAR E SOROLÓGICA

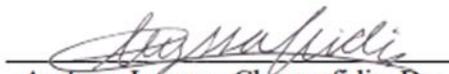
Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Banca Examinadora:

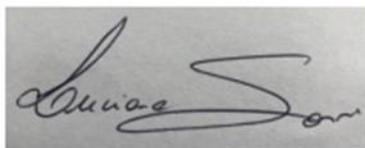


Renata Assis Casagrande, Dra.
Orientadora
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Membros:



Andreas Lazaros Chryssafidis, Dr.
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)



Luciana Sonne, Dra.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Lages-SC, 31 de Julho de 2020

Dedico este trabalho ao meu avô Pedro José da Costa, meu grande incentivo por tentar ser uma pessoa melhor a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Durante os anos de execução desta pesquisa tive muitos motivos para agradecer, vários momentos e pessoas que se fizeram presentes neste período serão inesquecíveis na minha vida. Desde 2015 cada pequeno resultado era uma conquista e um motivo para acreditar, em meio a tantas dificuldades impostas. Agradeço a Deus por me manter com saúde durante todos esses anos e por me guiar em cada passo. Meus agradecimentos à minha família por me apoiarem em todas as decisões e por serem a base de meu caráter. Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Renata Assis Casagrande, uma grande pessoa e profissional na qual me inspiro e me espelho, agradeço pelo grande exemplo demonstrado para a minha profissão durante todos esses anos de convívio.

Um dos principais incentivos para a busca pelos resultados foi a possibilidade de auxiliar no controle de propriedades afetadas por esta enfermidade, propriedades que sustentam muitas famílias e abastecem importantes pilares da produção alimentícia, por isso agradeço aos produtores rurais e médicos veterinários envolvidos nesta pesquisa.

Agradeço ao Professor Anderson Barbosa de Moura e Alessandra Snak do Laboratório de Doenças Parasitárias e Parasitologia Veterinária (CAV-UDESC), pelo auxílio com algumas das análises moleculares e pelo auxílio na realização das análises sorológicas. Prof. Dr. Luiz Claudio Miletti e Gabriella Bassi das Neves do Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores (CAV-UDESC) pelo auxílio na padronização da técnica de PCR para *N. caninum* e na realização da técnica. Agradeço a Hilda Fátima Jesus Pena do Laboratório de Parasitologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (Universidade de São Paulo-USP) pela realização das nossas primeiras detecções de *N. caninum* por PCR. Agradeço a Sara Krasilchik, Camila Conti, Ricardo Sfaciotti e a Prof. Dra. Sandra Maria Ferraz do Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA- CAV/UDESC) pelo isolamento bacteriano de amostras para diagnóstico diferencial nas causas de abortamento. Ao professor Cláudio Wageck Canal, do Laboratório de Virologia Favet/UFRGS, pela realização de PCR para BVDV.

Meus agradecimentos a Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante esse período e pela Fundação de amparo à pesquisa e inovação do estado de Santa Catarina (FAPESC) pelo auxílio e investimento na realização de análises (Edital FAPESC 05/2018 - Nº: 2019TR702).

Agradeço a minha amiga Jéssica Aline Withoef por ser minha parceira em grande parte dessa minha caminhada e por me acompanhar neste período de grandes mudanças pessoais e profissionais, obrigado por sempre estar comigo em momentos bons ou ruins em casa, no laboratório, no campo ou nos treinos. Agradeço aos meus colegas e amigos da Pós-graduação pela

ajuda em coletas, processamentos e desabafos rotineiros, Sara Elis Schmitt, Thierry Grima de Cristo, Giovana Biezus, Fábio Santiani e Aline da Rosa Maciel. Obrigado por tudo!

Agradeço a todos os estagiários e bolsistas do Grupo de Patologia Veterinária (GPV-CAV/UDESC) que em algum momento da pesquisa me auxiliaram com coleta de dados e processamento de análises, em especial ao João Vitor Bilicki e Isadora Cristina Melo. Meus agradecimentos também a todos os funcionários e colaboradores do Laboratório de Patologia Animal (CAV- UDESC).

RESUMO

Neosporose é a principal causa infecciosa de abortamentos em bovino em todo mundo. O objetivo deste trabalho é descrever a ocorrência de abortamentos bovinos causados por *Neospora caninum* no estado de Santa Catarina, através da caracterização anatomopatológica e a análise molecular, associando ao perfil sorológico das propriedades. Relata-se ainda neosporose como causa de abortamento em bovinos em uma propriedade acompanhada ao longo de quatro anos. Fetos bovinos abortados foram necropsiados, amostras de todos os órgãos foram fixadas em formalina tamponada a 10% e processados para avaliação histopatológica. Fragmentos de encéfalo foram submetidos a reação em cadeia da polimerase (PCR) para *N. caninum*. Foi realizado inquérito epidemiológico e coleta de sangue dos bovinos para sorologia por reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para pesquisa de IgG anti *N. caninum*. Entre junho de 2015 e junho de 2020, foram realizadas necropsias de 85 fetos bovinos, obtendo um índice de diagnóstico conclusivo em 61,17% (52/85). O diagnóstico de abortamento por *N. caninum* foi estabelecido em 53,84% (28/52) dos casos. Na avaliação histopatológica, havia lesão em 75% (21/28), observando encefalite necrotizante mononuclear (71,42%-15/21), miocardite mononuclear (66,66%-14/21) e miosite mononuclear (61,90%-13/21). Na PCR o agente foi detectado em 20 casos (71,42%-20/28). Das 18 propriedades com diagnóstico de neosporose, foi possível realizar avaliação epidemiológica em 61,11%, sorologia em 33,33% e em 38,88% avaliação das estratégias de controle. A soroprevalência foi de 26,71% (74/277), sendo que 39,18% (29/74) apresentavam distúrbios reprodutivos. Por avaliação epidemiológica, a grande maioria das propriedades tinham cães com acessos às pastagens e instalações dos bovinos, assim como a maioria descartava restos fetais e placentários de maneira incorreta. Como resultado das estratégias de controle, foi observado que houve redução de casos de abortamentos e das taxas de retorno ao cio. Algumas propriedades obtiveram a eliminação completa dos cães e houve descarte de vacas soropositivas. No segundo estudo, dez fetos bovinos abortados foram avaliados entre 2015 e 2019. No ano de 2015 foi enviado um feto, 2016 foram três, em 2017, dois fetos e em 2019 quatro fetos, todos originados de uma propriedade leiteira na região sul de Santa Catarina com sistema semi-confinado e ordenha tipo mecânica canalizada. Desde o ano de 2014 houve um aumento significativo do retorno ao cio e no número de abortos, com taxas de abortamento chegando a 28,6% no rebanho. Tanto vacas primíparas quanto múltiparas apresentavam distúrbios reprodutivos. Foi realizado inquérito epidemiológico e sorologia por RIFI e por ensaio imunoenzimático (ELISA) para pesquisa de IgG anti *N. caninum*. Histologicamente havia encefalite necrotizante, miosite e miocardite mononuclear em sete fetos. Na PCR, *N. caninum* foi detectado em cinco. Por RIFI de 26 vacas, 50,0% foram soropositivas, dessas 61,5% apresentavam distúrbios reprodutivos, já o ELISA de todo rebanho apresentou positividade de 26,54% (43/162), sendo que 39,5% apresentavam distúrbios reprodutivos, houve relação de distúrbios reprodutivos apresentados por mãe e filha. Quanto as estratégias de controle, houve descarte de animais com distúrbios reprodutivos, apenas reposição própria dos animais da propriedade, restos placentários e fetais são enterrados ou incinerados, além da eliminação dos cães. Conclui-se que *N. caninum* é o principal agente etiológico associado a causas de abortamento em bovinos neste estudo. A soroprevalência das propriedades com diagnóstico etiológico definitivo de neosporose avaliadas é elevada. Destaca-se a importância do diagnóstico de neosporose em fetos bovinos abortados para a efetivação de medidas de controle nas propriedades, diminuindo as perdas reprodutivas e econômicas.

Palavras-chave: protozoário, perda reprodutiva, doença infecciosa, patologia.

ABSTRACT

Neosporosis is the most important abortion cause in cattle worldwide. This study aims to investigate the occurrence of bovine abortions due to *Neospora caninum* in Santa Catarina state, Brazil, with anatomopathological and molecular characterization, and serological description of the affected farms. This study also reports neosporosis as bovine abortion cause in a farm monitored over four years in the Southern of the state. Fetuses were necropsied, samples of all organs were fixed in 10% buffered formalin and processed for histopathological evaluation. Brain samples were analyzed using polymerase chain reaction (PCR) for *N. caninum*. Epidemiological research was made, and serum samples collection of bovines were analyzed by Indirect Immunofluorescence (RIFI) reaction for IgG anti-*N. caninum*. From June 2015 to June 2020, 85 bovine fetuses were necropsied, 61.17% (52/85) of the diagnosis were conclusive, and 53.84% (28/52) were aborted due to *N. caninum* infection. In the histopathological evaluation, there were lesions in 21 (75%), with mononuclear necrotizing encephalitis (71.42%-15/21), mononuclear myocarditis (66.66% - 14/21) and mononuclear myositis (61.90% -13 / 21). The agent was detected in 20 cases (71.42%-20/28) at PCR. Of the 18 farms diagnosed with neosporosis, it was possible to perform an epidemiological evaluation in 61.11%, serology in 33.33%, and evaluation of control strategies in 38.88%. The seroprevalence was 26.71% (74/277), with reproductive disorders in 39.18% (29/74). In epidemiological evaluation, a large majority of the farms had dogs with access to pasture and cattle installations, and the majority discarded fetal and placental tissues incorrectly. As a result of the control strategies, there was a reduction in cases of abortion and reduction in repeat breeding. Some farms obtained complete elimination of dogs and discarded some seropositive cattle. In the second study, ten aborted bovine fetuses were analyzed from 2015 to 2019, from a dairy farm in the southern region of Santa Catarina. In 2015 one aborted bovine fetus was analyzed, while in 2016 were three, in 2017 were two fetuses and in 2019 four fetuses were analyzed. The system of production was semi-confined, and the milking system was mechanical type. Since 2014, there has been a significant increase in abortions cases and repeat breeding, with abortion rates reaching 28.6% in the herd. Both primiparous or multiparous cows had reproductive disorders. Epidemiological research and serology by RIFI and immunoenzymatic assay (ELISA) for IgG anti-*N. caninum* detection were performed. Histologically, there were necrotizing encephalitis, myositis and mononuclear myocarditis in seven fetuses. In PCR, *N. caninum* was detected in five. By RIFI of 26 cows, 50% were seropositive, 61.5% had reproductive disorders. In ELISA of all herd 26.54% (43/162) were seropositive, with 39.5% showing reproductive disorders, including a relationship of reproductive disorders presented in some cows and its daughters. In the analysis of strategies control, the animals with reproductive disorders were removed from the farm, in addition, now only replacement of owned animals, placental and fetal tissues are discarded, incinerating or burying and the elimination of dogs. In conclusion, *N. caninum* is the main etiological agent associated with abortion causes in cattle in Santa Catarina. The seroprevalence of affected farms is high. The importance of diagnosing neosporosis in aborted bovine fetuses is highlighted for the effectiveness of control measures on farms, reducing reproductive and economic losses.

Keywords: protozoan, reproductive loss, infectious disease, pathology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Representação do ciclo de vida heteroxeno do protozoário *Neospora caninum*. . 25
- Figura 2 - Período gestacional dos abortamentos por *Neospora caninum* em bovinos..... 46
- Figura 3 - Alterações histopatológicas em fetos bovinos com neosporose. (A) Encefalite mononuclear focal discreta (seta) insert: Maior aumento. (B) multifocal moderada (seta). (C) focal acentuada (seta). (D) Miocardite mononuclear multifocal moderada (seta). (E) Miosite mononuclear focal discreta (seta). (F) Placentite mista multifocal moderada (setas). Hematoxilina e Eosina..... 49
- Figura 4 - Mapa representativo dos municípios de origem dos casos de neosporose em bovinos no estado de Santa Catarina: relação com inquérito epidemiológico, sorologia anti-*Neospora caninum* e estratégias de controle. 50
- Figura 5 - Resultados das titulações da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Neospora caninum* em rebanhos bovinos com neosporose no estado de Santa Catarina. 53
- Figura 6 - Relação de bovinos positivos para *Neospora caninum* por Imunofluorescência Indireta (RIFI) de acordo com a idade (em anos). 54
- Figura 7 - Abortamento em bovinos por *Neospora caninum*. A) Encefalite necrotizante mononuclear focal discreta. B) Miocardite linfoplasmocitária multifocal discreta..... 67
- Figura 8 - Abortamento em bovinos de leite por *Neospora caninum* no Sul do estado de estado Santa Catarina. A) Canino da propriedade com livre acesso as instalações de ordenha. B) Caninos com acesso as pastagens. 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Neosporose como causa de abortamento em bovinos: dados anatomopatológicos, moleculares e perfil sorológico anti-Neospora caninum.	47
Tabela 2 - Correlação entre os resultados da histopatologia e PCR de abortamentos por Neospora caninum em bovinos.	48
Tabela 3 - Fatores epidemiológicos associados à ocorrência de Neospora caninum em propriedades com diagnóstico de neosporose no estado de Santa Catarina.	52
Tabela 4 - Resultados sorológicos de propriedades diagnosticadas com neosporose, através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) anti-N.caninum.....	53
Tabela 5 - Correlação da titulação dos animais positivos para Neospora caninum por Imunofluorescência Indireta (RIFI) com os distúrbios reprodutivos apresentados.....	54
Tabela 6 - Relação de soropositividade e distúrbios reprodutivos entre mãe e filha em rebanhos bovinos com neosporose no estado de Santa Catarina.	55
Tabela 7 - Medidas instituídas para o controle da neosporose nas propriedades de criação de bovinos no estado de Santa Catarina.	55
Tabela 8- Relação de fetos bovinos avaliados em uma propriedade afetada por Neospora caninum durante um período de quatro anos.....	66
Tabela 9- Recíproca de títulos de anticorpos contra Neospora caninum por RIFI em vacas leiteiras com (n=8) e sem (n=6) distúrbios reprodutivos de um plantel na região Sul de Santa Catarina. ...	67
Tabela 10 - Correlação entre bovinos avaliados por ELISA para Neospora caninum e apresentação de distúrbios reprodutivos em um rebanho afetado por neosporose na região Sul de Santa Catarina.	68

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1 ETIOLOGIA E HISTÓRICO DA NEOSPOROSE	23
3.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA NEOSPOROSE.....	23
3.3 CICLO BIOLÓGICO DO <i>Neospora caninum</i>	24
3.4 RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO À INFECÇÃO POR <i>Neospora caninum</i>	26
3.5 PATOGENIA DA NEOSPOROSE.....	26
3.5 SINAIS CLÍNICOS DA NEOSPOROSE	28
3.6 EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO DA NEOSPOROSE	28
3.7 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO <i>Neospora caninum</i>	30
3.8 DIAGNÓSTICO DE NEOSPOROSE.....	31
3.8.1 Necropsia e Histopatologia	32
3.8.2 Imuno-histoquímica para <i>Neospora caninum</i>	33
3.8.3 Análise molecular para <i>Neospora caninum</i>	34
3.8.4 Sorologia para <i>Neospora caninum</i>	34
3.10 AGENTES ASSOCIADOS À NEOSPOROSE	35
3.11 TRATAMENTO DE NEOSPOROSE.....	36
3.11 CONTROLE DA NEOSPOROSE	36
4 Diagnóstico anatomopatológico, molecular e caracterização sorológica de abortamentos causados por <i>Neospora caninum</i> em bovinos do Estado de Santa Catarina, Brasil	39
ABSTRACT	40
4.1 INTRODUÇÃO	41
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.2.1 Avaliação anatomopatológica e exames complementares	42
4.2.2 Perfil sorológico anti- <i>N. caninum</i> em propriedades com neosporose.....	43
4.2.3 Avaliação epidemiológica das propriedades com neosporose	44
4.2.4 Análise estatística	45
4.2.4 Comitê de ética	45

4.3 RESULTADOS.....	45
4.3.1 Avaliação anatomopatológica e molecular.....	45
4.3.2 Distribuição geográfica das propriedades com neosporose	50
4.3.3 Avaliação epidemiológica das propriedades com neosporose	50
4.3.4 Perfil sorológico anti- <i>N. caninum</i> das propriedades com neosporose	52
4.3.5 Estratégias de controle da neosporose	55
4.4 DISCUSSÃO	56
4.5 CONCLUSÕES.....	61
5 Abortamento por <i>Neospora caninum</i> em bovinos de leite no Sul do estado de Santa Catarina: acompanhamento dos casos por quatro anos.	62
5.1 INTRODUÇÃO	64
5.2 RELATO DE CASO	64
5.3 DISCUSSÃO	69
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
REFERÊNCIAS.....	73

INTRODUÇÃO

A neosporose é uma enfermidade parasitária caracterizada como a principal causa infecciosa de abortamentos na espécie bovina na maior parte do mundo. O agente etiológico é o protozoário *Neospora caninum*, um parasita intracelular obrigatório, cosmopolita, de ciclo heterógeno facultativo, pertencente ao filo Apicomplexa (DUBEY et al., 1988a). Este protozoário infecta uma grande variedade de espécies, incluindo animais domésticos e selvagens (KOYAMA et al., 2001; DUBEY, 2003; DONAHOE et al., 2015). O desencadeamento desta enfermidade acarreta grandes perdas produtivas e econômicas mundialmente, principalmente relacionadas a perdas reprodutivas em rebanhos bovinos, gerando grande impacto na cadeia de produção leiteira e no setor de bovinocultura de corte (REICHEL et al., 2013).

Para desenvolver seu ciclo, este protozoário necessita de mais de um hospedeiro (DUBEY e SCHARES, 2011). Como hospedeiro definitivo, a principal relação é definida pelos canídeos, sendo domésticos ou selvagens, já os hospedeiros intermediários são principalmente bóvidos e ovinos (DUBEY & LINDSAY, 1996). A transmissão por *N. caninum* ocorre pelas vias vertical e pela horizontal; a primeira é caracterizada pela transmissão transplacentária, onde vias infectantes do agente acometem os tecidos do feto, já a segunda ocorre através da ingestão de oocistos esporulados ou de cistos teciduais por carnívoros (McALLISTER et al., 1998). A via transplacentária é considerada a mais impactante por contribuir para a persistência da infecção no rebanho, visto que vacas soropositivas para *N. caninum* possuem maiores chances de gerarem proles soropositivas ou abortamentos (ANDERSON et al., 2000; McALLISTER, 2016).

A patogenia deste distúrbio é desencadeada por uma parasitemia materna persistente ou gestacional e as lesões induzidas por *N. caninum* são causadas, principalmente, pela multiplicação de taquizoítos, que atingem as células alvo pelas vias sanguínea e linfática, podendo danificar tanto os anexos placentários como os tecidos fetais, com isso os sinais clínicos descritos em animais afetados são principalmente o abortamento e retorno ao cio (BUXTON et al., 2002; DUBEY et al., 2006; FARIAS, 2007). Raramente há descrição de sinais clínicos não relacionados ao sistema reprodutor; porém este agente pode provocar lesões neurológicas e gastrointestinais em animais adultos (MALAGUTI et al., 2012; DONAHOE et al., 2015; McALLISTER et al., 2016).

Por ter um ciclo de vida heterógeno, o protozoário utiliza de vários fatores epidemiológicos que facilitam a proliferação e a sua manutenção no rebanho, sendo considerados como fatores de risco aos animais e requerem uma detalhada análise epidemiológica para evidenciar tais características no rebanho ou na propriedade. Um dos principais fatores de risco observados é a presença de cães e animais silvestres nas propriedades. Quanto ao clima, temperaturas mais altas favorecem uma esporulação mais rápida de oocistos em forragens ou pastagens onde os bovinos circulam (DUBEY et al., 2007). A alta umidade nas

pastagens e períodos de chuva prolongados também favorecem a esporulação e sobrevivência de oocistos no ambiente (BARTELS et al., 1999; LOPEZ-GATIUS et al., 2005).

O diagnóstico da neosporose é baseada na avaliação anatomopatológica de tecidos fetais e placentários, investigando lesões compatíveis com a infecção causada pelo protozoário, além disso, se faz necessária a associação com técnicas para a detecção do agente, como análises moleculares ou imunohistoquímicas (DUBEY et al., 2007). Além disso, a avaliação sorológica é uma forma de triagem do rebanho essencial para complementar o diagnóstico, sendo realizada pelo teste de Imunofluorescência Indireta (RIFI) ou ensaio imunoenzimático (ELISA) (DUBEY & SCHARES 2011). A avaliação epidemiológica é uma ferramenta essencial para a investigação, possibilitando a evidenciação de fatores de risco para a infecção por este protozoário no rebanho ou nas propriedades (GUIDO et al., 2016; MCALLISTER, 2016).

A bovinocultura no estado de Santa Catarina é uma importante atividade econômica, representando importante papel na produção nacional. O estado possui a maior produtividade média de rebanho leiteiro do país, sendo considerado um dos principais estados na produção leiteira nacional (SANTOS et al., 2006; IBGE 2017). O leite é a atividade agropecuária que mais cresce em Santa Catarina, e vem aumentando muito nos últimos anos, ampliando em 82% a sua capacidade produtiva nos últimos dez anos (IBGE 2017). Apesar da grande representatividade do estado na produção nacional, há poucos estudos referentes à neosporose em rebanhos catarinenses no cenário nacional (CERQUEIRA-CEZAR et al., 2017), os estudos são principalmente regionais e relacionados a soroprevalência para *N. caninum*, como na região Oeste (LORENZETT et al., 2016) e Serra Catarinense (PADILHA et al., 2017).

Portanto, descrever a ocorrência de abortamentos bovinos causados por *N. caninum* no estado de Santa Catarina, através da caracterização anatomopatológica e a análise molecular, associando com a soroprevalência e evidenciação de possíveis fatores associados a infecção é de fundamental importância.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo sobre o abortamento causado por *Neospora caninum* em bovinos no Estado de Santa Catarina, determinando a frequência deste diagnóstico e descrevendo as características anatomopatológicas da doença, associando com a detecção do agente por análise molecular, assim como determinar o perfil sorológico de propriedades positivas e avaliar os fatores epidemiológicos das propriedades afetadas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar as alterações anatomopatológicas da neosporose, a partir da necropsia e avaliação histopatológica de fetos bovinos abortados;
- b) Empregar a técnica de PCR para a detecção de *N. caninum* em todos os casos de fetos bovinos abortados;
- c) Determinar a ocorrência de *N. caninum* em vacas provenientes de propriedades com diagnóstico de neosporose;
- d) Por meio de questionário, investigar as condições epidemiológicas da neosporose nas propriedades acometidas e acompanhar as medidas de controle da doença.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ETIOLOGIA E HISTÓRICO DA NEOSPOROSE

Neospora caninum é um parasita intracelular obrigatório, cosmopolita e de ciclo heterógeno, pertencente ao filo Apicomplexa (DUBEY et al., 1988a). A sua primeira descrição foi no ano de 1984 em cães (BJERKAS et al., 1984) e depois em bovinos com sinais neurológicos (PARISH et al., 1987), porém, o agente ainda não havia sido isolado, identificado e classificado até 1988 (DUBEY et al., 1988a,b). Este protozoário possui semelhanças estruturais, biológicas e filogenéticas com o protozoário *Toxoplasma gondii*, e em virtude destas semelhanças, muitos quadros de neosporose foram identificados inicialmente como casos de toxoplasmose, que na época tratava-se de uma enfermidade já descrita em cães (DUBEY et al., 1988b).

Este protozoário já foi isolado em uma vasta diversidade de espécies, e por mais que seja principalmente descrita em bovinos e cães, a infecção já foi observada em ovinos, felinos, búfalos, suínos, equinos, raposas, lobos, veados, psitacídeos, entre outros. A infecção experimental já foi realizada em primatas não humanos, porém ainda faltam evidências de infecção por *N. caninum* em humanos, portanto não é considerada uma zoonose (KOYAMA et al., 2001; DUBEY, 2003; RODRIGUES et al., 2004; GONDIM et al., 2001; DONAHOE et al., 2015).

3.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA NEOSPOROSE

Globalmente, as perdas medianas estimadas devido aos abortamentos induzidos por *N. caninum* foram estimadas em mais de US\$ 1.298,3 milhões, com perdas anuais mais acentuadas na América do Norte (US\$852,4 milhões [65,7%]), seguida pela América do Sul (US\$ 239,7 milhões [18,5%]) e Oceania (US\$137,5 milhões [10,6%]). As perdas por neosporose na Europa, representaram 5,3% das perdas globais ou cerca de US\$ 68,7 milhões (REICHEL et al., 2013). Na Califórnia 40.000 abortamentos causados por *N. caninum* foram estimados, o que levou a uma perda de US\$ 35 milhões por ano (LINDSAY; DUBEY; BARR, 1998). Na Austrália e Nova Zelândia, as perdas estimadas foram mais de US\$100 milhões por ano (REICHEL, 2000). Nos Estados Unidos da América, aproximadamente dois terços das perdas são incorridas em bovinos de leite e um terço em bovinos de corte (REICHEL et al., 2013).

A neosporose, por constituir uma importante causa de aborto em bovinos no Brasil, apresenta grande importância econômica, devido principalmente aos custos associados ao valor dos fetos abortados, custos indiretos com auxílio profissional, custo de técnicas diagnósticas, aumento do tempo de lactação com possível diminuição da produção de leite, aumento do descarte e reposição dos animais e redução da vida produtiva (ANDREOTTI, 2003; FARIAS, 2007). São raros os estudos que determinam a perda

reprodutiva por valores econômicos em relação a neosporose no país. Em um estudo no estado do Mato Grosso do Sul, foi observado uma soroprevalência da doença de 14,88%, sendo associada a uma perda econômica de 27,34% ao produtor na receita total na venda de bezerros (BARROS et al., 2010). Em um rebanho de 1000 novilhas, a presença deste protozoário foi relacionada à redução na rentabilidade de R\$66.372,39, sendo considerado um fator importante como barreira sanitária para o desenvolvimento produtivo e reprodutivo para os rebanhos neste estado (BARROS et al., 2010). Em um estudo associando o status sorológico para *N. caninum* com medidas de ganho de peso e carcaça no período pós-desmame em bezerros, houve perda de US\$ 15,62 por bezerro (BARLING et al., 2000). Uma análise internacional estima que produtores de leite brasileiros somam perdas aproximadas de US\$ 51,3 milhões anuais, enquanto as perdas na indústria de bovinos de corte atingem uma média de US\$ 101,0 milhões (REICHEL et al., 2013).

3.3 CICLO BIOLÓGICO DO *Neospora caninum*

Neospora caninum é um protozoário heteroxeno facultativo, ou seja, seu ciclo necessita de ao menos dois hospedeiros (DUBEY e SCHARES, 2011). Alguns canídeos são investigados como possíveis hospedeiros definitivos. Algumas espécies de animais domésticos e selvagens já foram identificados e relatados como hospedeiros intermediários, dentre eles, bovinos, ovinos, caprinos, equinos e cervídeos (DUBEY & LINDSAY, 1996), nos quais pode causar abortamentos e infecções neonatais (DUBEY, 1999). Os bovinos são os principais hospedeiros intermediários, pois uma vez infectados pelo parasito permanecem portadores durante toda a vida (INNES et al., 2002).

O ciclo de vida possui três principais fases, na qual a morfologia se distingue nos diferentes estágios, sendo representado por taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos (GOODSWEN et al., 2013). Oocistos não esporulados são eliminados nas fezes dos hospedeiros definitivos. O oocisto esporulado possui dois esporocistos e cada um possui quatro esporozoítos (DUBEY et al., 2007). Há a ingestão dos oocistos esporulados pelos hospedeiros intermediários, liberando esporozoítos no trato gastrointestinal, esses se transformam em taquizoítos e multiplicam-se, espalhando-se por todo o organismo do hospedeiro (GOODSWEN et al., 2013).

Os taquizoítos são de formato arredondado a oval, invadem o citoplasma das células como macrófagos, endotélio vascular, hepatócitos, células musculares, células neurais e fibroblastos, e se replicam de forma assexuada (DUBEY, 2003). Esta forma infectante é a mais importante e é a principal responsável por causar lesões, seguida de resposta inflamatória, desencadeando os principais sinais clínicos (GOODSWEN et al., 2013). Os bradizoítos são envoltos por uma cápsula de tecido conjuntivo, geralmente de formato circular. Esses são encontrados, principalmente, no sistema nervoso central e na

musculatura dos hospedeiros intermediários, e depois de encistado pode persistir por meses a anos sem causar manifestações clínicas (DUBEY et al., 2007; GOODSWEN et al., 2013).

A infecção por *N. caninum* ocorre pelas vias vertical ou congênita e pela horizontal (Figura 1), através da ingestão de oocistos esporulados ou de cistos teciduais por carnívoros (McALLISTER et al., 1998). O ciclo normalmente se inicia com a ingestão de cistos teciduais ou formas encistadas do protozoário em musculatura esquelética ou outros órgãos de hospedeiros intermediários (via horizontal) que contenham essas formas. Com a ingestão, os bradizoítos são liberados no intestino delgado do hospedeiro definitivo, invadem as células epiteliais e iniciam a fase sexuada do ciclo tendo a formação de oocistos não esporulados, que são eliminados nas fezes, podendo contaminar as pastagens e serem ingeridos pelos hospedeiros definitivos (DIJKSTRA et al., 2002). Outra importante fonte de infecção é a ingestão pelos hospedeiros definitivos de restos placentários ou fetos de ruminantes abortados provenientes de mães soropositivas para *N. caninum* (ANDERSON et al., 2000; DUBEY et al., 2007).

A principal via de transmissão em bovinos é a vertical, pois contribui para a persistência da infecção no rebanho (ANDERSON et al., 2000). Cerca de 95% das vacas soropositivas para *N. caninum* geram abortos ou bezerros soropositivos, destacando a importância desta forma de transmissão no ciclo do agente nos rebanhos (MCALLISTER, 2016). A transmissão horizontal para bovinos ocorre pela presença dos hospedeiros definitivos (DUBEY, 2003). Os oocistos eliminados nas fezes dos cães podem contaminar água, alimentos, pastagens e utensílios utilizados no manejo e alimentação dos bovinos, que uma vez infectados mantém a infecção por meio da transmissão vertical entre as gerações (DUBEY, 2003; DUBEY et al., 2007).

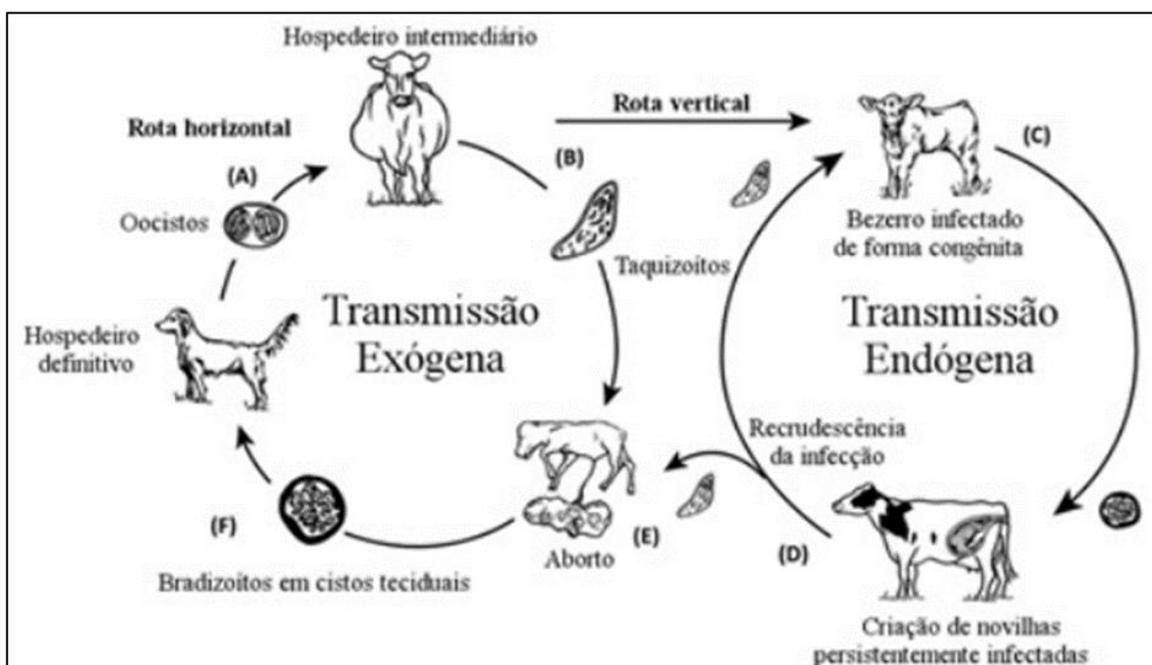


Figura 1 - Representação do ciclo de vida heteroxeno do protozoário *Neospora caninum*.
Fonte: Adaptado de GUIDO et al. (2016).

3.4 RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO À INFECÇÃO POR *Neospora caninum*

A reação imune contra a infecção por *N. caninum* é extremamente importante para desencadear mecanismos de defesa contra o agente, impedindo a proliferação do mesmo, que pode causar morte celular devido a liberação de citocinas (INNES et al., 2005). Estudos realizados em bovinos apresentaram diferentes funções e intensidades nos fatores determinantes para o desenvolvimento de resposta imune dependendo das condições do hospedeiro e período de infecção (ALMERÍA e LÓPEZ-GATIUS, 2013; DUBEY et al., 2017).

As respostas imunes materna e fetal podem variar nos diferentes estágios de gestação (WILLIAMS et al., 2000). Vacas infectadas naturalmente podem abortar a partir dos três meses de gestação até a fase final de gestação, porém, a maioria dos abortamentos causados por *N. caninum* diagnosticados ocorrem aos cinco meses de gestação (DUBEY et al., 2017). A infecção crônica por *N. caninum* antes da gestação pode não causar abortamento, podendo gerar bezerros soronegativos, sem evidenciação de infecção pelo protozoário. Porém a infecção após 90 dias de gestação representa efeito abortivo significativo (DUBEY et al., 2017). Em infecções realizadas experimentalmente em vacas prenhes no 70º dia de gestação foram evidenciados níveis elevados de IFN-g e maior proliferação de linfócitos (BARTLEY et al., 2012).

A capacidade do feto de montar uma resposta imune a um patógeno invasor aumenta progressivamente com o tempo à medida que o sistema imunológico se desenvolve. Em experimentos realizados em diferentes fases da gestação de bovinos apresentaram distintas respostas específicas de anticorpos e respostas celulares do feto contra o protozoário. A infecção no terço inicial da gravidez está associada à disseminação do parasita podendo gerar lesões necróticas características que induzirão a expulsão do feto com o passar do tempo, mas são raras as reações inflamatórias descritas em fetos abortados nesta fase. Em fetos infectados entre o terço médio e final de gestação, se observam lesões mais discretas e redução da multiplicação do parasita (DUBEY et al., 2011). Respostas específicas de anticorpos e respostas celulares do feto contra *N. caninum* foram detectados a partir do centésimo dia de gestação (BARTLEY., et al 2012). Expressão significativa de citocinas foi observada em fetos de novilhas infectadas experimentalmente aos 110 dias de gestação (ALMERÍA et al., 2003). Além disso, quando vacas foram infectadas no dia 210º de gestação, aborto e lesões não foram observadas nos fetos, sugerindo um controle da infecção pelo sistema imunológico materno e pela resposta imune fetal, mesmo que, nesta etapa da gestação uma alta taxa de transmissão seja observada (BENAVIDES et al., 2012).

3.5 PATOGENIA DA NEOSPOROSE

A neosporose bovina é, principalmente, uma doença patogênica à placenta e ao feto, desencadeada primeiramente por uma parasitemia materna persistente ou gestacional (DUBEY et al., 2006). Outros

quadros além do reprodutivo, ocorrem em canídeos adultos, quando assumem a função de hospedeiro definitivo no ciclo, os sinais são gastrointestinais, normalmente apresentando diarreia, já quando se apresentam como hospedeiros intermediários podem apresentar um quadro neuromuscular pela multiplicação do protozoário no sistema nervoso ou muscular (LINDSAY et al., 1999; DONAHOE et al., 2015).

As lesões induzidas por *N. caninum* são causadas, principalmente, pela multiplicação dos taquizoítos, que atingem as células alvo pelas vias sanguínea e linfática. O parasita precisa reconhecer a célula hospedeira para estabelecer a infecção, invadindo a célula por meio do fechamento das membranas até ser completamente englobado para o interior através do vacúolo parasitóforo (HEMPHILL et al., 1996).

No fim do desenvolvimento intracelular, o vacúolo parasitóforo se desintegra antes da lise da célula hospedeira e os taquizoítos vão infectar células adjacentes, se transformam em bradizoítos que são capazes de formar cistos teciduais e persistem em seu interior por vários anos sem provocar sinais clínicos (FUCHS et al., 1998). Porém, antes de ser encistado, em parasitemia, pode levar a uma necrose celular e tecidual, acarretando uma doença neuromuscular nos hospedeiros intermediários, devido à destruição de um número grande de células (BUXTON et al., 2002).

Durante a parasitemia, o protozoário tem grande facilidade de ser transmitido por via transplacentária. Quando a infecção pelo protozoário transcorreu na mãe antes da gestação, a transmissão pela placenta se inicia por reativação de uma infecção desencadeada pela baixa regulação da imunidade mediada por células, que ocorre por volta da metade da gestação (INNES et al., 2002). Para que o abortamento ocorra, a placenta ou o feto devem estar danificados a um ponto em que os tecidos já não sejam mais viáveis, processo este complexo, e desencadeado por vários fatores (BUXTON et al., 2002; INNES et al., 2002). O dano placentário pode comprometer diretamente o feto ou induzir a liberação de prostaglandinas maternas, causando luteólise e aborto, já os danos fetais podem ser primários (lesão causada pela multiplicação do protozoário nos tecidos) ou secundária (insuficiência de oxigênio ou pouca nutrição ocasionada pelo dano placentário). O aborto também pode estar associado com a liberação de citocinas pró-inflamatórias e a resposta imune tipo Th1 na interface materno-fetal (CANTÓN et al., 2014; MCALLISTER, 2016). Ainda, a expulsão fetal pode ocorrer sem que haja dano placentário ou fetal, quando há liberação de citocinas pró-inflamatórias na placenta (ENTRICAN 2002).

O abortamento depende também do período gestacional em que o feto é infectado pelo protozoário, o fator determinante é o seu sistema imunológico que se desenvolve progressivamente (BUXTON et al., 2002; DUBEY et al., 2006). Portanto, o feto no terço inicial de gestação é considerado vulnerável, neste período os tecidos linfoides estão em formação e começam a reconhecer os microorganismos, por isso, no início da gestação, a infecção normalmente é fatal (DUBEY et al., 2006). Já no

terço médio da gravidez, o feto é capaz de desencadear uma resposta imune rudimentar, que ainda pode não ser suficiente para salvá-lo, pois é nesta fase em que a maioria dos abortamentos por este protozoário são relatados. No terceiro trimestre, a resposta imune contra o patógeno é mais competente, e normalmente o feto consegue se desenvolver por completo e nascer saudável, ou fraco e com sinais neurológicos (BUXTON et al., 2002).

3.5 SINAIS CLÍNICOS DA NEOSPOROSE

Em bovinos infectados por *N. caninum* não há apresentação de sinais clínicos específicos (FARIAS, 2007). A principal manifestação da neosporose nesta espécie é caracterizada pelo abortamento, geralmente entre o quinto e o sexto mês de gestação, podendo ocorrer a partir do terceiro mês até o término da gestação (DUBEY, 1999; FARIAS, 2007), podendo ainda, nascerem bezerros fracos que vêm a óbito logo após o nascimento ou normais congenitamente infectados.

Há poucos trabalhos descrevendo os sinais clínicos de animais adultos com neosporose. No Brasil, em um estudo avaliando 302 amostras de bovinos com sinais neurológicos, negativos para raiva, foi diagnosticado um bovino de 20 meses com *N. caninum*. Bovino apresentava sialorreia, incoordenação, decúbito e opistótono, evoluindo para o óbito em quatro dias (MALAGUTI et al., 2012). Em terneiros jovens infectados pelo protozoário, o comprometimento neurológico é descrito como incapacidade de se manter em estação por desequilíbrio, principalmente, de membros pélvicos, subdesenvolvimento e déficit proprioceptivo, apresentando apoio de casco com deslocamento dorsal (MCALLISTER et al., 2016).

Em caninos, há poucos relatos sobre o quadro clínico da neosporose, a maioria desses são assintomáticos. Os sinais normalmente são neurológicos, os animais apresentam incoordenação e paralisia dos membros pélvicos devido a encefalomielite (LINDSAY et al., 1999; GONDIM et al., 2001; DONAHOE et al., 2015). Há também um caso relatado de neosporose cutânea nesta espécie, apresentando dermatite nodular, ulcerativa e granulomatosa (MANN et al., 2016).

3.6 EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO DA NEOSPOROSE

A avaliação epidemiológica, associada a estudos transversais e estudos caso-controle são essenciais para a identificação e levantamento de informações associadas a fatores que facilitem a infecção do protozoário aos rebanhos (DUBEY et al., 2007; MCALLISTER 2016). Essas informações podem minimizar as perdas reprodutivas pelo fornecimento de informações que podem contribuir para a prevenção e controle da doença (HEIN et al., 2012).

Um dos principais fatores associados observados é a presença de cães e animais silvestres nas propriedades. A presença destes animais tem relação direta com a infecção pelo protozoário, pois os cães

são considerados os principais hospedeiros definitivos no ciclo do agente etiológico (DIJKSTRA et al., 2002). Além de aumentar as chances de soropositividade há maior probabilidade da ocorrência de abortamento nos bovinos afetados por *N. caninum* (BARTELS et al., 1999). Lorenzetti e colaboradores (2016) observaram que a ausência ou o número reduzido de cães presentes na propriedade diminuiu em 0,52 vezes a chance da propriedade ser positiva. A circulação de animais selvagens, como canídeos, também é de extrema importância na epidemiologia do protozoário, visto que estes animais também podem desempenhar papel de hospedeiros definitivos no ciclo, podendo disseminar oocistos nas pastagens e em outros ambientes habitados por bovinos (DONAHOE et al., 2015; MCALLISTER, 2016).

A idade dos bovinos também é considerada um importante fator. Animais mais velhos são frequentemente descritos como os animais de maior soroprevalência nos rebanhos, esses dados são explicados pela maior exposição aos oocistos e outras formas infectantes do protozoário conforme o passar dos anos na propriedade (GUIMARÃES et al., 2004; LORENZETTI et al., 2016; MASATANI et al., 2018). Quanto ao clima, temperaturas mais altas favorecem uma esporulação mais rápida de oocistos em forragens ou pastagens onde os bovinos circulam (DUBEY et al., 2007). A alta umidade nas pastagens e períodos de chuva prolongados também favorecem a esporulação e sobrevivência de oocistos no ambiente, podendo aumentar o risco de infecção por causar estresses diretos e indiretos ao rebanho bovino devido a diferenças de temperaturas, qualidade alimentar prejudicada e higiene diminuída (BARTELS et al., 1999; LOPEZ-GATIUS et al., 2005).

A realização da sorologia para *N. caninum* é importante, visto que animais soropositivos apresentam um risco 7,21 vezes maior de abortamento em relação aos soronegativos (FAVERO et al. 2017). Além dessas características, é importante a análise de mais variáveis que possam ter associação com a infecção pelo hospedeiro intermediário. Alguns estudos referentes a epidemiologia da neosporose avaliam mais variáveis através de questionários juntamente com o veterinário ou proprietário do rebanho, abordando características gerais da propriedade, assim como aspectos do manejo reprodutivo, biossegurança, manejo geral e instalações, condições sanitárias e controle de resíduos utilizados na propriedade (DUBEY et al., 2007; HEIN et al., 2012).

Como características gerais da propriedade, é importante levantar qual o plantel total de bovinos, a quantidade de vacas secas e em lactação, quais são primíparas, múltiparas, bezerras e novilhas para reposição, e qual o tipo de ordenha. Quanto às características relacionadas ao manejo, deve-se investigar se há a presença de piquetes maternidade, se há a separação dos terneiros após o parto, qual a origem dos animais, se realiza período de quarentena na aquisição de animais e se há participação dos animais em feiras e exposições. Em relação ao manejo reprodutivo, investigar se há realização de inseminação artificial ou monta natural, e, nos casos de monta natural, se a origem do touro é conhecida e segura. Em relação ao manejo sanitário, se é realizada palpação retal, e, se sim, se há reutilização da luva de palpação

entre os animais, bem como reutilização de agulhas para procedimentos, se existe banco de colostro na propriedade e se há contato físico com bovinos de outras propriedades através de cercas entre piquetes. Para investigação de diagnósticos diferenciais, solicitar se são realizadas vacinas reprodutivas e quais os protocolos. Além disso, se há vacina para outras doenças não reprodutivas, como clostridioses e raiva (DUBEY et al., 2007; HEIN et al., 2012).

3.7 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO *Neospora caninum*

Neospora caninum é um protozoário cosmopolita, já foi relatado como a principal causa infecciosa de abortamento em todos os continentes do mundo, além de ser descrito como um agente de potencial impacto econômico no mundo inteiro (DUBEY et al., 2007; REICHEL et al., 2013). No Brasil, já foi notificada na grande maioria dos estados (ANDREOTTI, 2003). Embora o parasito apresente ampla distribuição em muitas regiões geográficas do Brasil, os levantamentos sorológicos para *N. caninum* apresentam acentuadas divergências, as análises realizadas em rebanhos leiteiros têm demonstrado uma soroprevalência muito variável, entre 0 e 91,2% (ANDREOTTI, 2003; DUBEY et al., 2007). Essa amplitude pode variar de acordo com as condições ambientais e os fatores de risco para a infecção pelo protozoário, como: umidade, presença de hospedeiro definitivo na propriedade e idade dos animais (GOODSWEN et al., 2013).

No Brasil e no mundo, a neosporose é distribuída em todos os rebanhos e afeta todos os tipos de indústria relacionadas a bovinocultura, principalmente a indústria de laticínios. A maioria das pesquisas com abortamentos causados por *N. caninum* é relacionada a bovinocultura leiteira (REICHEL et al., 2013) e pouco se sabe sobre causas de abortamento em bovinos de corte, esse fato é justificado pela dificuldade de monitoramento de perdas reprodutivas e a dificuldade de se encontrar fetos abortados a campo (DUBEY, SCHARES e ORTEGA-MORA, 2007). Além disso, fazendas de corte são administradas com menor intensidade, e geralmente o contato próximo entre as excreções de cães e a criação de bovinos é menor que na bovinocultura leiteira (BARLING et al., 2000).

A maioria dos estudos nas diferentes regiões do Brasil são baseados em análises sorológicas, os relatos desse protozoário como causa direta de abortamento são confirmados em menor quantidade de estados visto que há dificuldade no diagnóstico definitivo desse distúrbio. Portanto há poucos estudos caracterizando essa doença associando às lesões anatomopatológicas (SANTOS et al., 2005; CORBELLINI et al., 2006; PESCADOR et al., 2007).

Na região Sul do Brasil, há também alta variação nos índices de soroprevalência, no Paraná a soroprevalência variou de 12 a 34,8% (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2001; OGAWA et al., 2005), no Rio Grande do Sul de 11,4 a 31,1% (VOGEL et al., 2006; GINDRI et al., 2018) e em Santa Catarina de

7,7 a 43,8% (LORENZETT et al., 2016; KLAUCK et al., 2016). Outros estados do Brasil demonstram grande variabilidade nos índices de soroprevalência, no Mato Grosso do Sul há variação de 9,1 a 43% (ANDREOTTI et al., 2004; MELLO et al., 2008), porém, o estado que observou maior variação na titulação sorológica foi o estado de Minas Gerais, onde os dados são de 11,1 a 97,2% (RAGOZO et al. 2003; GUEDES et al., 2008).

Santa Catarina é pouco representado em pesquisas referentes à *N. caninum* em rebanhos bovinos no cenário nacional (CERQUEIRA-CEZAR et al., 2017). Em um estudo de soroprevalência para *N. caninum* em vacas leiteiras na região Oeste observou-se uma ocorrência de 7,7% (23/299) com 51,9% (14/27) das propriedades amostradas com pelo menos um animal positivo (LORENZETT et al., 2016). Em outro estudo em vacas leiteiras do município de Lages encontrou-se 23,1% (86/373) dos animais positivos, com as 19 propriedades amostradas com ao menos um animal positivo (MOURA et al., 2012). Já em bovinos de corte, foi conduzido uma pesquisa em 16 municípios da região serrana, com prevalência de 13,81% (70/507), com animais positivos em 13 dos municípios estudados (PADILHA et al., 2017).

Alguns estudos sorológicos no estado já foram apresentados, porém como enfermidade causadora de abortamento ou distúrbio reprodutivo, de acordo com a literatura consultada, existia apenas um relato da enfermidade, sendo diagnosticado na avaliação anatomopatológica, sem descrição de análise molecular ou outra avaliação complementar (CORBELLINI et al., 2001). Recentemente, a neosporose foi descrita em bovinos no município de Presidente Getúlio em Santa Catarina como causa de abortamento em bovinos de leite (MACEDO et al., 2017).

3.8 DIAGNÓSTICO DE NEOSPOROSE

O diagnóstico de neosporose é extremamente importante no controle do mesmo, haja visto que é a principal causa protozoária de abortamento em bovinos na maior parte do mundo e, por ser de difícil controle, se faz necessária a utilização de métodos de diagnósticos eficazes e práticos para que se possa efetivar o seu controle, visando diminuir perdas produtivas e reprodutivas (GUIDO et al., 2016). É essencial o papel do médico veterinário na observação de cada propriedade, realizando avaliação epidemiológica juntamente ao produtor/proprietário, possibilitando a evidenciação de fatores para a infecção por este protozoário (DUBEY et al., 2007; GUIDO et al., 2016). Para o diagnóstico desta enfermidade, a epidemiologia é essencial para auxiliar tanto no diagnóstico, quanto no controle, associado a avaliação histopatológica e exames complementares (DUBEY et al., 2007)

No Brasil, poucas informações são disponíveis sobre causas de abortamento em ruminantes. Em estudo realizado por Corbellini et al. (2006) no Rio Grande do Sul, o diagnóstico etiológico foi obtido em 51,5% dos fetos analisados e a principal causa de abortamento foi a neosporose. Outro estudo realizado

no mesmo estado obteve diagnóstico em 46,7% dos casos e *N. caninum* também foi a principal causa infecciosa (ANTONIASSI et al., 2013). Em um estudo realizado em Minas Gerais, foram diagnosticados 19 abortos causados por *N. caninum*, demonstrando diferentes formas de diagnóstico além da histopatológica, corroborando resultados de imuno-histoquímica (IHQ) e Reação em cadeia da polimerase (PCR), 9/15 apresentaram IHQ positiva e 9/10 PCR positiva, mas em quatro a PCR foi positiva e a IHQ negativa e em um ocorreu o inverso, demonstrando a importância da associação de diferentes métodos de diagnóstico (ORLANDO et al., 2013).

3.8.1 Necropsia e Histopatologia

Para o diagnóstico de abortamento por *N. caninum* várias técnicas podem ser utilizadas, porém, para definir a causa, o exame necroscópico dos fetos e placenta seguidos pelo exame histopatológico, associando a outras técnicas complementares é indispensável. Macroscopicamente não são observadas lesões significativas (CORBELLINI et al., 2006; ANTONIASSI et al., 2013).

Durante a necropsia de fetos bovinos, primeiramente a medida da articulação atlanto-occipital até a inserção da cauda é aferida, possibilitando avaliar em que idade gestacional ocorreu o abortamento. Após, é realizada a avaliação externa, analisando mucosas e coletando fragmento de pálpebra em formalina para histopatologia. As cavidades abdominal e torácica são abertas para avaliação macroscópicas de todos os órgãos para posterior coleta. Para investigação de neosporose, é imprescindível a coleta de órgãos específicos que são determinantes na patogenia do protozoário, como o sistema nervoso central e musculatura (ORLANDO et al., 2013). Fragmentos de encéfalo são congelados para PCR para *N. caninum*, mas a análise molecular também pode ser realizada tendo como órgãos o coração, músculo esquelético ou placenta (SNAK et al., 2018). Para histologia, todos esses órgãos citados anteriormente são necessários para investigação de lesões histopatológicas, além de rins e pulmões que são frequentemente descritos em casos de neosporose (DUBEY, 2003; ORLANDO et al., 2013; MCALLISTER, 2016).

Para investigação de agentes etiológicos diferenciais são coletados fragmentos de tecidos em embalagens plásticas estéreis para isolamento bacteriano, os órgãos mais utilizados para tal análise são fígado, pulmão, placenta e conteúdo de abomaso, tais tecidos, podem ser acondicionados em refrigeração ou congelamento. Baço e timo são congelados para PCR de Vírus da diarreia viral bovina (BVDV). Além de outros órgãos congelados para PCR de *Leptospira* sp. ou Herpesvírus, como fígado ou rins. Amostras de todos os órgãos serão coletadas e acondicionadas em formalina tamponada a 10%, incluídas em blocos de parafina e processados rotineiramente pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) para visualização dos tecidos em microscopia óptica (DUBEY, 2003; PESCADOR et al., 2007; ORLANDO et al., 2013; MCALLISTER, 2016).

As principais lesões histológicas observadas são encefalite necrotizante não supurativa, miosite, miocardite, placentite e pneumonia mononuclear. O sistema nervoso central é o tecido mais importante para avaliação histopatológica em fetos bovinos abortados por *N. caninum* (MALAGUTI et al., 2012), sendo que as lesões diferem na localização e intensidade (PESCADOR et al., 2007; CABRAL et al., 2009).

No entanto, essas lesões não são patognomônicas e muitas vezes as estruturas parasitárias (taquizoítos ou bradizoítos) não estão visíveis. Portanto, para confirmar o diagnóstico se faz necessária a utilização de técnicas, como a IHQ ou PCR (PARÉ et al., 1998; DUBEY, 2003; FARIAS, 2007; SANTOS et al., 2011). Lesões não supurativas em casos de abortamento por *N. caninum* são descritas com menor intensidade em fígado e rins (PESCADOR et al., 2007).

Para a aumentar o índice de diagnósticos definitivos de causas de abortamento é imprescindível a coleta e envio da placenta para avaliação anatomopatológica detalhada e exames complementares, como PCR e IHQ (BERGERON et al., 2001; DUBEY & SCHARES, 2011; MESQUITA et al., 2018). Alterações histopatológicas na placenta podem ser características da infecção pelo protozoário, como infiltrado mononuclear predominantemente linfocítico presente em interstício e base de carúnculas, associado a áreas multifocais de necrose de células mesenquimais e trofoblastos (GIBNEY et al., 2008; CASPE et al., 2012; MESQUITA et al., 2018). Além disso, os cotilédones correspondem ao segmento placentário em que a maioria dos agentes causadores de lesões podem ser encontrados (MCALLISTER, 2016). Alguns agentes etiológicos possuem, em sua patogenia, fatores potenciais para lesionar a placenta, podendo haver o estresse e liberação do conceito sem causar lesões no feto, por isso, diagnósticos etiológicos definitivos dependem muitas vezes da placenta para sua determinação (BUXTON et al., 2002; DUBEY & SCHARES, 2011).

3.8.2 Imuno-histoquímica para *Neospora caninum*

A IHC é importante na rotina diagnóstica de abortamentos por *N. caninum*, visto que este protozoário é morfológicamente semelhante ao *Toxoplasma gondii*, além disso, as manifestações clínicas induzidas por estes agentes são semelhantes, visto que ambos pertencem ao Filo Apicomplexa, justificando suas semelhanças estruturais, biológicas e filogenéticas. Por essas semelhanças, esta técnica tem grande desvantagem pois apresenta marcação cruzada entre os dois agentes (DUBEY, 2003; SANTOS et al., 2011; MCALLISTER, 2016). Os tecidos mais indicados para IHQ para identificação deste agente são o encéfalo e pulmão, podendo variar na sensibilidade diagnóstica dependendo da autólise do tecido (PESCADOR et al., 2007).

3.8.3 Análise molecular para *Neospora caninum*

A técnica de PCR é considerada eficaz por apresentar alta sensibilidade e especificidade, podendo variar de acordo com o *primer* utilizado, geralmente apresenta maior especificidade e maior sensibilidade, comparando-a com a histopatologia e a IHQ. Snak e colaboradores (2018) realizaram a técnica de PCR em 17 fetos avaliando *N. caninum* em cérebro e coração, tendo 52,9% e 29,4% de positividade, respectivamente. A extração de DNA pode ser realizada a partir de vários tecidos, como encéfalo, placenta e soro sanguíneo, sendo que o sistema nervoso central é o tecido mais afetado pelo parasito, por isso é o tecido de escolha (MÜLLER et al., 1996; SANTOS et al., 2011; ORLANDO et al., 2013). Apesar de ser considerado uma técnica de diagnóstico direto, o resultado dessa análise deve ser associado à avaliação epidemiológica da propriedade e a lesões histopatológicas compatíveis com a infecção pelo protozoário, e se possível correlacionar com avaliação sorológica dos animais do rebanho, visto que tal parasito é cosmopolita e já foi identificado em vários animais portadores sem causar sinais clínicos significativos (DUBEY & SCHARES, 2011; MCALLISTER, 2016; SNAK et al., 2018).

3.8.4 Sorologia para *Neospora caninum*

O diagnóstico sorológico de *N. caninum* é uma forma de auxiliar a avaliação epidemiológica, sendo considerado um método, principalmente, de triagem e rastreamento da doença na propriedade (DUBEY, 2003). A avaliação sorológica pode ser realizada por diferentes técnicas, diferindo em sua especificidade, sensibilidade e praticidade (GUIDO et al., 2016).

A técnica de imunofluorescência indireta (RIFI), detecta anticorpos fluorescentes indicativos da infecção pelo parasito, é considerado o método de referência para o diagnóstico sorológico de neosporose (PARÉ et al., 1998), juntamente com o ensaio imunoenzimático (ELISA) representa as duas técnicas mais utilizadas em pesquisas sorológicas no Brasil como triagem diagnóstica (FARIAS, 2007; GUIDO et al., 2016).

Outras técnicas sorológicas também são utilizadas, como por exemplo o Teste de Aglutinação de *Neospora* (NAT) que tem boa especificidade e execução simples, porém é complexa (ROMAND et al., 1998). Já o Teste de aglutinação em Latex (LAT) possui a mesma sensibilidade e especificidade do NAT, porém com mais facilidade na padronização (MORAVEJI et al. 2012).

A técnica de Imunotransferência de antígeno completo (Immunoblotting) é uma técnica demorada e não aplicada como técnica de triagem, é recomendada para auxílio na confirmação de resultados sorológicos incertos (BJERKAS et al., 1994). O Teste Imunocromatográfico Rápido (RIT) utiliza antígenos recombinantes, é de execução simples e rápida, indicada para aplicação em condições de campo (LIAO et al. 2005).

Essas técnicas variam muito de acordo com a sensibilidade e especificidade, por isso, não deve ser considerado um método de diagnóstico, e deve-se sempre associar a outras técnicas de diagnóstico definitivo (PARÉ et al., 1998; GUIDO et al., 2016).

3.10 AGENTES ASSOCIADOS À NEOSPOROSE

É importante salientar a importância de se investigar outros patógenos mesmo em casos que já se tenha o diagnóstico de neosporose, visto que vários autores reportam a coinfeção deste protozoário com outros agentes, sendo principalmente bacterianos e virais. Corbellini et al, (2006) detectaram a coinfeção de *Neospora caninum* com *Leptospira* spp. em seis fetos bovinos abortados oriundos de cinco propriedades leiteiras, diagnosticados com IHQ e avaliação sorológica dos animais por RIFI. Os principais sorotipos de *Leptospira* spp. envolvidos nestes casos foram *L. hardjo*, *L. bratislava* e *L. pomona*. *Coxiella burnetii* é também uma bactéria descrita associada em casos de neosporose. No estado de Minas Gerais foi relatado um caso de associação da *Coxiella* sp. com *N. caninum* e Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV), e esta bactéria associada ao protozoário também foi descrita em fetos bovinos abortados no estado de São Paulo, Goiás e Mato Grosso do Sul. A análise sorológica de ELISA, foi o teste diagnóstico utilizado nesses casos de identificação de agentes em casos de abortamento (ZANATTO et al., 2019).

O envolvimento de agentes virais também foi descrito por outros autores que relataram o protozoário associado ao BVDV e Herpesvírus Bovino Tipo 4 (BHV-4) (DUBEY et al., 1990; NIETFIELD et al., 1992). Uma cepa não-citopatogênica foi isolada em cultivo celular de tecido hepático em um feto bovino abortado com diagnóstico de neosporose, na qual a lesão descrita consistia em necrose do parênquima hepático. A infecção pelo vírus, neste caso, pode ter aumentado a susceptibilidade a infecção por *Neospora caninum*, porém, não foi determinada como a causa etiológica definitiva, visto que a cepa não era patogênica e o animal teve lesões compatíveis com neosporose em outros órgãos (DUBEY et al., 1990). A associação com o Herpesvírus foi descrita em um feto bovino abortado aos 6,5 meses com diagnóstico definitivo de neosporose, o BHV-4 foi isolado da placenta, tecido esse que havia lesão microscópica, porém, não descrita especificamente (NIETFIELD et al., 1992)

Uma prevalência de 10% (30/301) para *Neospora caninum* associado ao *Cryptosporidium parvum* em bovinos foi detectada no sul do Egito, sendo considerado um fator limitante para o desenvolvimento da indústria pecuária na região (FEREIG et al., 2016). Tais agentes possuem alguns fatores de risco semelhantes para infecção, como por exemplo a umidade do solo, facilitando o desenvolvimento do parasito (MASATANI et al., 2018). Esses dois protozoários pertencem ao Filo Apicomplexa, causam imunossupressão e são importantes agentes a serem controlados em rebanhos bovinos, principalmente em animais jovens (ANDERSON, 1998; DUBEY et al., 2007), programas de controle e prevenção contra

esses dois parasitos estão sendo desenvolvidos, por já serem detectados com prevalência significativa, principalmente no Japão e Egito (UGA et al., 2000; FERREIG et al., 2016; MASATANI et al., 2018).

Portanto, ressalta-se a importância de maior investigação dos diagnósticos diferenciais ou da consorciação de agentes que possam estar associados, além da realização de mais de um tipo de técnica diagnóstica. A infecção pelo protozoário afeta diretamente o complexo imune do hospedeiro (ALMERÍA et al., 2017), podendo aumentar a susceptibilidade para a infecção por outros agentes infecciosos, tais agentes podem ser zoonóticos ou serem importantes para os demais animais do rebanho, acarretando em maior perda do controle sanitário (INNES et al., 2005; DUBEY et al., 2007).

3.11 TRATAMENTO DE NEOSPOROSE

Atualmente, várias pesquisas experimentais *in vivo* e *in vitro* são realizadas para reduzir as taxas de infecção ou combater as formas infectantes nos hospedeiros na tentativa de controlar a neosporose nos rebanhos, porém até hoje nenhum medicamento disponível é considerado seguro e eficaz para o tratamento de neosporose em ruminantes (SÁNCHEZ et al., 2018). As triazinonas administradas em bezerros recém-nascidos infectados modulam a resposta imune humoral e reduzem os sinais clínicos (HAERDI et al., 2006; SYED-HUSSAIN et al., 2015). Além disso, em bovinos adultos podem reduzir o abortamento causado pelo protozoário (CUTERI et al., 2005). A monensina parece reduzir a resposta imune humoral em bovinos não prenhes, além de reduzir as chances de infecção por este parasito quando adicionada como aditivo na alimentação, porém, é importante avaliar as doses para que não se torne tóxica aos bovinos (VANLEEUEWEN et al., 2010; SÁNCHEZ et al., 2018).

3.11 CONTROLE DA NEOSPOROSE

As estratégias de controle a serem elaboradas podem gerar custo e esforço das pessoas envolvidas, além de ser algo que deve ser planejado a longo prazo, visto que o ciclo de vida do agente é complexo e afeta várias questões econômicas da propriedade (GUIDO et al., 2016). Para planejar as primeiras ações de controle, um inquérito epidemiológico completo deve ser efetuado juntamente ao produtor levantando dados sobre manejo reprodutivo, biosseguridade, manejo/ instalações, condições sanitárias e controle de resíduos utilizados na propriedade. Tais detalhes são necessários para moldar estratégias e agir de acordo com a situação específica encontrada que pode variar substancialmente entre as propriedades (DUBEY et al., 2006; GUIDO et al., 2016).

As técnicas sorológicas são consideradas ferramentas úteis na abordagem do controle deste protozoário em bovinos, porém é ideal somente para a avaliação do perfil sorológico individual de cada animal ou da soroprevalência na propriedade, pois só esta técnica é insuficiente para determinar a causa

do abortamento (GUIDO et al., 2016). A eliminação das vacas soropositivas pode ser a medida mais adequada se a soroprevalência for baixa, porém se for elevada, as ações a serem tomadas não devem ser tão drásticas. Nos animais soropositivos podem ser encontrados diferentes tipos de manifestações, que influirão na decisão a ser tomada (MCALLISTER, 2016).

Vacas que abortaram uma ou mais vezes devem ser priorizadas para descarte. Vacas soropositivas sem antecedentes de aborto, porém podem atuar como portadoras da infecção, devendo-se, portanto, evitar a utilização de sua descendência para reposição (MCALLISTER, 2016). Garantir um bom estado nutricional das vacas prenhes vai ajudar a reduzir os riscos de aborto entre os animais contaminados por esse parasito (ANDREOTTI, 2001).

A sorologia deve estar empregada na propriedade até mesmo depois das estratégias de controle já serem definidas ou até mesmo depois do perfil sorológico ter sido avaliado. O monitoramento sorológico deve continuar a ser realizado periodicamente em um número representativo de animais de forma individual ou pelo leite a granel. Outra utilidade desta técnica é na reposição de animais de outras propriedades pois, estes animais representam um importante fator de risco de reintrodução da doença, ou da manutenção do protozoário pela transmissão vertical, portanto, é indicado a avaliação sorológica dos animais comprados na propriedade de origem e introduzir os animais em período de quarentena antes de ingressarem na propriedade (GUIDO et al., 2016).

Algumas práticas de manejo relacionadas à interrupção do ciclo de transmissão do *N. caninum* são recomendadas, como evitar a interação de cães com o rebanho, a fim de prevenir a contaminação fecal de água, pastagem e instalações, além do isolamento dos galpões de armazenagem de sal mineral, ração e/ou silagem. Estabelecer na propriedade um piquete maternidade, onde as vacas fiquem do período pré ao pós-parto, evitando assim a contaminação da pastagem de toda a propriedade com conteúdo placentário que possa ter formas infectantes do protozoário (OLIMPIO et al., 2011; MCALLISTER, 2016).

Além disso, é importante também a remoção de restos de placentas, fetos abortados e terneiros mortos para evitar a ingestão dos mesmos pelos cães e canídeos silvestres. Deve-se evitar transitar com instrumentos e vestimentas que tenham contato com secreções de caninos para áreas que os bovinos tenham acesso (DUBEY, 2007; MCALLISTER, 2016).

Na Suíça, a neosporose é uma doença de notificação obrigatória, quando o diagnóstico da infecção é determinado nos fetos, todo o rebanho é avaliado sorologicamente (HASLER et al., 2006). Na Holanda, vários produtores de leite participam de um programa nacional de controle que consiste em triagem sorológica de leite, investigação sorológica dos animais que abortam e abate progressivo de vacas soropositivas (GUIDO et al., 2016). Na Espanha programas de controle são desenvolvidos a nível regional voluntário para a neosporose bovina, realizando análise sorológica para monitorar a situação epidemiológica nas diferentes áreas geográficas, e fornecendo treinamento para veterinários e

agricultores. Associações e agrupamentos de defesa sanitária do país disponibilizam subsídios para reduzir os custos de testes de laboratório e apoiam o recrutamento de veterinários para o gerenciamento de programas de controle da neosporose (GUIDO et al., 2016).

4 Diagnóstico anatomopatológico, molecular e caracterização sorológica de abortamentos causados por *Neospora caninum* em bovinos do Estado de Santa Catarina, Brasil

Anatomopathological and molecular diagnosis and serological characterization in bovine abortion due *Neospora caninum* in Santa Catarina state, Brazil

RESUMO

A neosporose é uma enfermidade infecciosa cosmopolita, causada pelo protozoário *Neospora caninum*, que representa a principal causa infecciosa parasitária de abortamento em bovinos no mundo inteiro. Tendo em vista a importância econômica desse protozoário para a pecuária, este trabalho tem por objetivo avaliar a ocorrência de abortamentos causados por *N. caninum* em bovinos no estado de Santa Catarina. Fetos abortados de bovinos foram necropsiados, amostras de todos os órgãos foram coletadas e acondicionadas em formalina tamponada a 10% e processados para avaliação histopatológica. Fragmentos de encéfalo foram analisados por reação em cadeia da polimerase (PCR) para *N. caninum* utilizando como alvo as sequências Nc5-Np21plus/Np6plus. Realizou-se inquérito epidemiológico, avaliação das estratégias de controle e sorologia por Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para pesquisa de IgG contra *N. caninum*. Para avaliar o nível de concordância entre histopatologia e PCR foi utilizado o método de Kappa Cohen. Entre julho de 2015 e julho de 2020, foram remetidos 85 fetos bovinos, obtendo um índice de diagnóstico conclusivo em 61,17% (52/85). O diagnóstico de abortamento por *N. caninum* foi estabelecido em 53,84% (28/52) dos casos. Na avaliação histopatológica, havia lesão em 21 (75%) que era caracterizada por encefalite necrotizante mononuclear (71,42% - 15/21), miocardite mononuclear (66,66% - 14/21), miosite mononuclear (61,90% - 13/21), placentite mista (14,28% - 3/21) e pneumonia mononuclear (4,76% - 1/21). Na PCR *N. caninum* foi detectado em 20 casos (71,42%). O índice de Kappa Cohen demonstrou concordância moderada (0,42). Das 18 propriedades com diagnóstico de neosporose, foi possível realizar avaliação epidemiológica em 61,11% (11/18), sorologia em 33,33% (6/18) e em 38,88% (7/18) avaliação das estratégias de controle. A soroprevalência foi de 26,71% (74/277), sendo que 39,18% (29/74) apresentavam distúrbios reprodutivos. A grande maioria das propriedades tinham cães com acessos às pastagens e instalações, assim como a maioria descartava restos fetais e placentários de maneira incorreta. Como estratégias de controle, foi observado que algumas propriedades obtiveram a eliminação completa dos cães da propriedade e houve descarte de animais soropositivos, como resultados dessas estratégias, houve redução de casos de abortamentos e redução das taxas de retorno ao cio. *Neospora caninum* foi o principal agente etiológico associado a causas de abortamento em bovinos no presente estudo. Os tecidos mais frequentemente observados com lesões compatíveis foram encéfalo e coração. A soroprevalência de propriedades com diagnóstico etiológico definitivo de neosporose no estado de Santa Catarina foi elevada. Medidas de controle foram parcialmente efetivadas nas propriedades avaliadas, havendo diminuição dos abortamentos e retorno ao cio dos rebanhos, o que destaca a importância do diagnóstico de neosporose em fetos bovinos abortados para a efetivação de medidas de controle nas propriedades, diminuindo as perdas reprodutivas e econômicas.

Palavras-chave: protozoário, perdas reprodutivas, doença infecciosa, patologia.

ABSTRACT

Neosporosis is a cosmopolitan infectious disease, caused by the protozoan *Neospora caninum*, which represents the main infectious cause of cattle abortion worldwide. This study aims to evaluate the occurrence of abortions caused by *N. caninum* in cattle in the state of Santa Catarina, Brazil. Bovine aborted fetuses were necropsied, samples of all organs were fixed in 10% buffered formalin and processed for histopathological evaluation. Brain samples were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) for *N. caninum* using the Nc5-Np21plus/Np6plus primers sequences. Epidemiological and control strategies survey, and serology by Indirect Immunofluorescence Reaction (RIFI) for IgG anti- *N. caninum* were performed. To evaluate the level of agreement between histopathology and PCR, the Kappa Cohen method was used. From July 2015 to July 2020, 85 bovine fetuses were necropsied, 61.17% (52/85) of the diagnosis were conclusive, and 53.84% (28/52) were aborted due to *N. caninum* infection. In the histopathological evaluation, there were lesions in 21 (75%), characterized by mononuclear necrotizing encephalitis (71.42% - 15/21), mononuclear myocarditis (66.66% - 14/21), mononuclear myositis (61.90% - 13/21), mixed placentitis (14.28% - 3/21) and mononuclear pneumonia (4.76% - 1/21). *Neospora caninum* was detected in 20 cases (71.42%) by PCR. The Kappa Cohen test showed moderate agreement (0.42). Of the 18 properties diagnosed with neosporosis, it was possible to perform an epidemiological evaluation in 61.11%, serology in 33.33%, and evaluation of control strategies in 38.88%. The seroprevalence was 26.71% (74/277), with 39.18% (29/74) demonstrating reproductive disorders. The majority of farms had dogs with access to pastures and cattle installations, and the majority discarded fetal and placental tissues incorrectly. As a result of the control strategies, there was a reduction in cases of abortion and reduction in repeat breeding. Some farms obtained complete elimination of dogs and discarded some seropositive cattle. *Neospora caninum* was the main etiological agent associated with causes of abortion in this study. The tissues most frequently analyzed with compatible lesions were brain and heart. The seroprevalence of farms with definitive etiological diagnosis of neosporosis in the state of Santa Catarina is high. Control measures were partly effective on the evaluated farms, with decrease in the rates of abortions and repeat breeding of the herds, which emphasizing the importance of the diagnosis of neosporosis in aborted fetuses for effective control measures in the affected farms, decreasing reproductive and economic losses.

Keywords: protozoan, reproductive loss, infectious disease, pathology.

4.1 INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório, cosmopolita, pertencente ao filo Apicomplexa (DUBEY et al., 1988). É frequentemente relatado como a principal causa de abortamento em bovinos no mundo inteiro (DUBEY & SCHARES, 2011). A espécie bovina é diretamente afetada por desempenhar papel de hospedeiro intermediário no ciclo do *N. caninum*, infectando-se e possibilitando o desenvolvimento de formas evolutivas do agente em seus tecidos, desencadeando lesões ou encistamento (DUBEY & LINDSAY, 1996; INNES et al., 2002). Tal protozoário é considerado heteroxeno, ou seja, necessita de mais de um hospedeiro para completar seu ciclo de vida, sendo que o hospedeiro definitivo é representado, principalmente, por canídeos, sejam eles domésticos ou selvagens (DUBEY & LINDSAY, 1996; GOODSWEN et al., 2013).

Há diversas vias de transmissão que definem as diferentes formas de infecção do protozoário (MCALLISTER et al., 1998). A principal é a via vertical ou transplacentária, onde formas infectantes do agente acometem os tecidos do feto por via sanguínea ou linfática, podendo causar lesões em tecidos placentários ou atingir o feto. A via horizontal ocorre quando o hospedeiro definitivo ingere o parasito encistado em tecidos ou ingerindo oocistos de outros hospedeiros, podendo eliminar oocistos esporulados no ambiente, sendo posteriormente ingerido pelo hospedeiro intermediário (ANDERSON et al., 2000). Pela fácil transmissibilidade e pela variabilidade de fatores epidemiológicos que proporcionem sua manutenção no ambiente, *N. caninum* é considerado um agente de difícil controle (GOODSWEN et al., 2013; MCALLISTER, 2016).

O Estado de Santa Catarina apresenta poucos estudos referentes à neosporose em rebanhos bovinos no cenário nacional (CERQUEIRA-CEZAR et al., 2017). Os estudos aqui no estado são, principalmente, regionais que descrevem a soroprevalência para *N. caninum* na região Oeste (LORENZETT et al., 2016; KLAUCK et al., 2016) e Serra Catarinense (MOURA et al., 2012; PADILHA et al., 2017). Macedo e colaboradores (2017) avaliaram um rebanho na região do Vale do Itajaí, diagnosticando e descrevendo abortamentos causados pelo protozoário, a partir de análises anatomopatológicas, moleculares e sorológicas; sendo o único estudo anatomopatológico completo descrito até agora no estado.

Essa doença parasitária apresenta alto impacto na produção mundial, sendo responsável por grandes perdas econômicas, tanto na bovinocultura de leite ou corte (REICHEL et al., 2013). O déficit econômico pode ser atribuído ao valor de fetos abortados, custos indiretos com auxílio profissional, custo de técnicas diagnósticas, aumento do tempo de lactação associado a diminuição da produção de leite, aumento do descarte e reposição dos animais, além da redução do período de vida produtiva (ANDREOTTI, 2003; FARIAS, 2007).

O diagnóstico de neosporose depende da utilização de métodos diagnósticos eficazes associados a avaliações epidemiológicas para evidenciação de fatores relacionados a infecção (DUBEY et al., 2007;

GUIDO et al., 2016). Os métodos diagnósticos mais utilizados são a necropsia, o exame histopatológico, associado a reação em cadeia da polimerase (PCR) ou imuno-histoquímica (IHQ). Além disso, para complementar o diagnóstico, é essencial o monitoramento sorológico do rebanho pelo teste de Imunofluorescência Indireta (RIFI) ou ensaio imunoenzimático (ELISA) (GUIDO et al., 2016; MCALLISTER, 2016).

Há poucos estudos no Brasil, que evidenciem a associação do diagnóstico etiológico definitivo por lesões histopatológicas e análise molecular em fetos bovinos abortados, avaliando a soroprevalência dos rebanhos e os fatores associados a infecção. O objetivo deste trabalho é descrever a caracterização anatomopatológica e molecular de fetos bovinos abortados por *Neospora caninum*, associando com a soroprevalência, possíveis fatores associados e as estratégias de controle nas propriedades acometidas.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Avaliação anatomopatológica e exames complementares

Fetos abortados de bovinos recebidos no Laboratório de Patologia Animal (LAPA-CAV/UDESC) entre junho de 2015 a junho de 2020 foram necropsiados. O histórico do animal e da propriedade foi obtido com o Médico Veterinário responsável pelo caso e/ou com o produtor. Na necropsia, primeiramente a medida da articulação atlanto-occipital até a inserção da cauda (WHITE et al., 1985) foi aferida, possibilitando avaliar em que idade gestacional ocorreu o abortamento. Em seguida foi realizada a avaliação externa, observando mucosas e buscando por possíveis alterações. Após abertura e observação do subcutâneo, as cavidades abdominal e torácica foram abertas para avaliação macroscópica de todos os órgãos para posterior coleta. Foram coletados fragmentos de fígado, pulmão, placenta e conteúdo de abomaso, tais tecidos, acondicionados em refrigeração ou congelamento, foram encaminhados para isolamento bacteriano ao Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA - CAV/UDESC). Fragmentos de encéfalo foram congelados para PCR de *N. caninum*, baço e timo congelados para PCR do vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV). Amostras de encéfalo, rins, pulmões, coração, timo, baço, placenta, diafragma, fígado, músculo esquelético, abomaso e pálpebra foram coletadas e acondicionadas em formalina tamponada a 10%, incluídas em blocos de parafina e processados rotineiramente e corados com hematoxilina e eosina (HE) para visualização em microscopia óptica.

Na análise histopatológica, todos os órgãos foram avaliados, e no sistema nervoso central, músculo esquelético e coração as lesões consideradas como compatíveis com neosporose foram compostas por encefalite necrotizante, miosite e miocardite linfoplasmocitárias focais ou multifocais.

Em outros órgãos, como fígado e pulmão, foram considerados como suspeitos quando apresentaram hepatite e pneumonia linfoplasmocitárias.

Quando observadas lesões histológicas sugestivas de processo infeccioso bacteriano, fragmentos congelados de fígado, placenta, pulmão e conteúdo de abomaso eram submetidos a cultivo bacteriano, com processamento composto por pré-enriquecimento do material com 4g do órgão e 196mL de água peptonada estéril em uma *bag*, seguida de homogeneização em Stomacher® 400 Circulator (Laboratory Blender) e incubação por 24h a 37°C. Após a incubação, as amostras foram inoculadas em placas com Ágar Sangue e McConkey em cultivo aeróbio a 37°C por 48 horas.

Após o crescimento bacteriano, dependendo da morfologia apresentada pelo micro-organismo, as culturas eram selecionadas e submetidas a provas bioquímicas para identificação do agente. O isolamento de *Brucella* sp. foi obtido por cultivo em ágar Triptose ou ágar Albimi com a adição de soro e antibióticos. As placas eram incubadas a 37°C em uma atmosfera de 10% de CO₂, durante sete dias.

Fragmentos congelados de encéfalo de todos os fetos foram submetidos a PCR para a pesquisa de *N. caninum*. O DNA foi extraído a partir de aproximadamente 5 gramas de encéfalo, macerados individualmente e em seguida foi realizada a extração de DNA de forma manual utilizando fenol e clorofórmio, seguindo a técnica descrita por Isola et al. (1994). A PCR foi realizada utilizando como alvo as sequências dos primers Nc5-Np21plus/Np6plus (5'-CCCAGTGCGTCCAATCCTGTA-3')/(5'-CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT-3'), conforme protocolo descrito por Müller et al. (1996). A reação foi realizada com um volume final de 50µL, contendo tampão 10X (5 µL), 10µM dNTP (1 µL), 50mM MgCl₂ (1,5 µL), 1,5 µl do Primer Np21plus, 1 µl do primer Np6plus, 20µM de cada primer, 5U Taq (0,25 µL), com desnaturação inicial a 94°C por 3min., 40 ciclos a 94°C por 45 seg.; 60,3°C por 30 seg.; 72°C por 40 seg. e extensão final a 72°C por 10min. As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,5%) para visualização. Os controles positivos utilizados foram taquizoítos da cepa Nc1, e como controle negativo foi utilizada água ultrapura autoclavada.

Amostras de baço e timo congeladas foram coletadas para RT-PCR do vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) pela detecção de um fragmento de 119pb da região 5'UTR de Pestivírus de acordo com o protocolo adaptado de Weber et al. (2014).

4.2.2 Perfil sorológico anti-*N. caninum* em propriedades com neosporose

Nas propriedades com diagnóstico de neosporose, amostras de sangue foram coletadas de fêmeas bovinas, independentemente da idade, e de eventuais caninos da propriedade, de forma individual por meio da venopunção da veia jugular em bovinos (10mL), e da veia cefálica em caninos

(5mL), sendo armazenados em tubos sem anticoagulante previamente identificados. Estes tubos foram mantidos em temperatura ambiente para posterior centrifugação e obtenção do soro sanguíneo, armazenados em criotubos, congelados a -20°C e encaminhados ao Laboratório de Parasitologia do CAV/UEDESC, para realização do teste de imunofluorescência indireta (RIFI) para pesquisa de imunoglobulinas G (IgG) anti-*N. caninum*.

Para isso, as lâminas de RIFI foram adsorvidas com taquizoítos de *N. caninum* cepa Nc-1, fixadas com metanol e armazenadas a -20°C . Em cada amostra de soro era adicionada a solução de diluição (0,0084M Na_2HPO_4 , 0,0018M NaH_2PO_4 , 0,146M NaCl e 1% BSA). Em seguida, 20 μL das amostras eram adicionadas em cada poço da lâmina de imunofluorescência e incubadas por 30min a 37°C , após eram realizadas três lavagens com uma solução composta por 0,0268M Na_2CO_3 , 0,0975M NaHCO_3 e 0,036M NaCl. A lâmina foi seca em estufa a 37°C e então foram adicionados 20 μL do conjugado anti-IgG bovino e canino *Sigma* (diluição 1:1000 para bovinos e 1:300 para cães). A solução de diluição utilizada foi o Azul de Evans (0,02mg/mL) e incubado durante 30min a 37°C , em seguida foram realizadas três lavagens com a solução de lavagem novamente e a lâmina foi seca em estufa a 37°C . Após, foi colocada uma lamínula com duas gotas de glicerina tamponada (90%) e realizada a leitura em microscópio de epifluorescência em um aumento de 400X (PARÉ et al., 1995). Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram reação a partir da diluição 1:100 (bovinos) e 1:50 (caninos), as quais eram diluídas sequencialmente, em múltiplos de dois, até diluição máxima reativa final para a titulação. Amostras de soro sanguíneo ou de leite de bovinos, sabidamente positivas ou negativas, foram utilizadas como controle positivo ou negativo para a RIFI afim de comparação. Um termo de consentimento livre e esclarecido foi apresentado ao produtor (Anexo 1).

4.2.3 Avaliação epidemiológica das propriedades com neosporose

Em visita técnica as propriedades foram aplicadas um questionário adaptado de Hein et al. (2012), junto ao proprietário. Tal questionário engloba questões que abordam características gerais de propriedade, bem como aspectos do manejo reprodutivo, biosseguridade, manejo/ instalações, condições sanitárias e controle de resíduos utilizados na propriedade, questões essas que foram utilizadas para a avaliação epidemiológica e estudo dos fatores de risco e causa/efeito de neosporose nas propriedades acometidas (Anexo 2).

Meses após a primeira visita a propriedade, foi efetuada uma nova visita para realização de novo inquérito epidemiológico para avaliar se as medidas de controle e prevenção estavam se efetivando e se avaliar a frequência de casos de abortamentos.

4.2.4 Análise estatística

Planilhas no Software *Excel*® (2019) foram confeccionadas para análise descritiva e inferencial dos dados. Para a correlação entre as características epidemiológicas em propriedades afetadas com o diagnóstico foram realizadas análises descritivas.

A eficiência dos métodos de diagnósticos utilizados (Histopatologia e PCR) foi avaliada estatisticamente pelo método de Kappa Cohen, que determina o índice de concordância entre as técnicas de diagnóstico. A concordância é classificada em: <0 = nenhuma concordância; valores entre 0 – 0,19 = baixa concordância; valores entre 0,20 – 0,39 = regular concordância; valores entre 0,40 – 0,59 = moderada concordância; valores entre 0,60 – 0,79 = substancial concordância; valores entre 0,80 – 1,00 = alta concordância.

4.2.4 Comitê de ética

Os procedimentos utilizados na pesquisa foram aprovados pelo comitê de ética de uso animal (CEUA), protocolado sob o número 5990060819 (ID 001000).

4.3 RESULTADOS

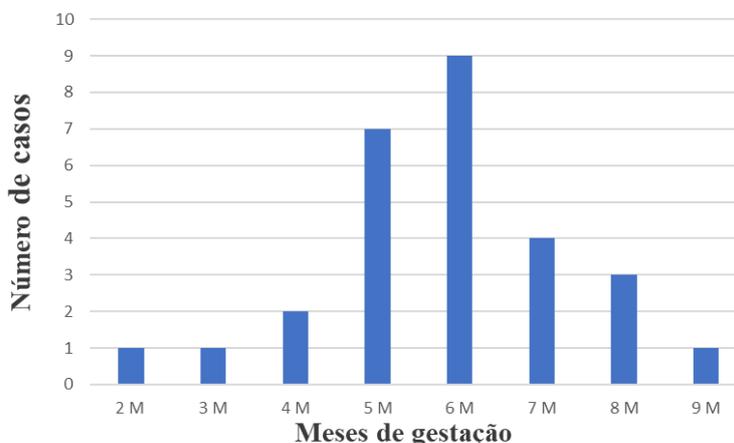
4.3.1 Avaliação anatomopatológica e molecular

No período do estudo foram remetidos ao LAPA-CAV/UEDESC 85 fetos bovinos, obtendo-se diagnóstico conclusivo em 61,17% (52/85) dos casos. Dentre estes, o diagnóstico de abortamento causado por *N. caninum* foi estabelecido em 53,84% (28/52). Esses foram divididos em dez surtos e oito casos isolados (Tabela 1). Os fetos eram provenientes de 18 propriedades localizadas em 14 diferentes municípios do estado de Santa Catarina. As regiões do estado em que mais houveram casos diagnosticados foram a região Sul (35,71% - 10/28), seguida do Vale do Itajaí (32,14% - 9/28), Serra Catarinense (25% - 7/28) e Oeste (7,15% - 2/28). Os municípios correspondentes com neosporose estão demonstrados na Tabela 1.

A frequência dos diagnósticos de neosporose variou anualmente, havendo um diagnóstico em 2015 (3,57% - 1/28), cinco em 2016 (17,86% - 5/28), oito em 2017 (28,57% - 8/28), oito em 2018 (28,57% - 8/28), cinco em 2019 (17,86% - 5/28) e um em 2020 (3,57% - 1/28). Os casos de abortamento manifestaram-se em diferentes fases gestacionais, sendo que o trimestre de gestação mais frequentemente relatado foi o segundo (64,28% - 18/28), seguido pelo terceiro trimestre (28,57% - 8/28), e primeiro (7,14% - 2/28). O mês em que mais houve casos de abortamento foi o

sexto mês de gestação (32,14% - 9/28) (Figura 2). Quanto ao sexo, 42,85% (12/28) fetos eram fêmeas e 39,28% (11/28) eram machos. Em cinco casos o sexo não foi determinado.

Figura 2 - Período gestacional dos abortamentos por *Neospora caninum* em bovinos.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Na avaliação macroscópica dos fetos abortados não foram observadas lesões, com exceção de um caso de mumificação fetal. De todos os fetos submetidos para análise neste período, houve o envio da placenta em apenas 25,88% dos casos (22/85), já dos casos de neosporose, foi possível realizar a avaliação da placenta em sete casos (25% - 7/28).

Na avaliação histopatológica, foram encontradas alterações compatíveis com neosporose em 21 casos (75%). Os tecidos que mais apresentaram alterações foram o encéfalo (71,42% - 15/21), coração (66,66% - 14/21), músculo estriado esquelético (61,90% - 13/21), pulmão (4,76% - 1/21) sendo que em 76,19% (16/21) havia a associação de lesões em mais de um órgão.

No encéfalo observaram-se necrose do neurópilo, circundada por infiltrado de linfócitos, plasmócitos e macrófagos, além de manguitos perivasculares e gliose com distribuição focal a multifocal, intensidade variando de discreta (80% - 12/15) (Figura 3A), moderada (6,67% - 1/15) (Figura 3B) a acentuada (13,33% - 2/15) (Figura 3C). Em coração, havia infiltrado de linfócitos e plasmócitos no miocárdio multifocal discreto (71,42% - 10/14) a moderado (28,57% - 4/14) (Figura 3D). Em músculo esquelético observou-se infiltrado de linfócitos, plasmócitos e macrófagos entre as miofibras multifocal discreto (84,62% - 11/13) (Figura 3E) a moderado (15,38% - 2/13). Em um caso (5%) evidenciou-se nos pulmões infiltrado linfoplasmocitário multifocal discreto. Os dados e intensidades das alterações histopatológicas encontradas na pesquisa estão representadas na Tabela 1.

Na avaliação da placenta em 42,86% (3/7) havia alteração histopatológica composta por infiltrado de linfócitos, plasmócitos, macrófagos e neutrófilos, por vezes associado a necrose de cotilédones e trofoblastos multifocal discreta (33,33% - 1/3) a moderada (66,67% - 2/3) (Figura 3F).

A PCR foi positiva para *N. caninum* em 20 casos (71,42% - 20/28), sendo que 14 (70% - 14/20) apresentaram alterações histopatológicas compatíveis com neosporose (Tabela 2). O teste de Kappa Cohen demonstrou concordância moderada (0,42) entre histopatologia e PCR.

Tabela 1- Neosporose como causa de abortamento em bovinos: dados anatomopatológicos, moleculares e perfil sorológico anti-*Neospora caninum*.

Surto/ Caso	Município	Idade fetal (meses)	Alterações histopatológicas				PCR	Sorologia Rebanho
			Encéfalo	Coração	Músculo	Placenta		
S1	São Ludgero	6	+	-	-	NA	Positivo	Positiva
C1	Rio Rufino	5	-	-	-	NA	Positivo	NR
S2	São Martinho	6	+	++	-	NA	NR	Positiva
S1	São Ludgero	7	+	-	+	NA	Negativo	Positiva
S1	São Ludgero	5	+	+	+	NA	Positivo	Positiva
S3	Lacerdópolis	7	-	+	+	NA	Positivo	Positiva
C2	Lages	4	-	-	-	NA	Positivo	NR
C3	Braço do Trombudo	2	-	-	-	NA	Positivo	NR
S9	Rio d'Oeste	4	-	++	-	NA	Positivo	NR
S1	São Ludgero	6	+	-	-	NA	Positivo	Positiva
S1	São Ludgero	7	+	+	-	NA	Negativo	Positiva
S4	São Martinho	8	-	-	-	NA	Positivo	Positiva
S5	Armazém	6	-	-	-	-	Positivo	Positiva
S7	Lages	9	-	-	-	NA	Positivo	NR
C4	Vitor Meireles	3	-	-	-	NA	Positivo	NR
S8	Otacílio Costa	7	-	-	+	++	Negativo	NR
S8	Otacílio Costa	6	-	+	+	+	Negativo	NR
S8	Otacílio Costa	8	+	+	+	-	Positivo	NR
S6	Pouso Redondo	5	++	-	-	-	Positivo	Positiva
S9	Rio do Sul	6	+	+	++	NA	Negativo	NR
S10	Rio d'Oeste	5	+	+	+	NA	Positivo	NR
C5	Pouso Redondo	5	+	++	++	++	Positivo	NR
C6	Capão Alto	5	+++	+	-	-	Positivo	NR
S9	Rio do Sul	6	+	-	-	NA	Negativo	NR
C7	Pouso Redondo	8	+	+	+	NA	Negativo	Negativo
S1	São Ludgero	6	-	-	+	NA	Positivo	Positiva
S1	São Ludgero	5	-	+	+	NA	Positivo	Positiva
C8	Alto Bela Vista	6	+++	++	+	NA	Positivo	NR
Total	14	-	15	14	13	3	20	6

NR: Não realizado, NA: não avaliada; S: surto, C: caso isolado. Intensidade de lesão: += discreto, ++ moderado, +++= acentuado. Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

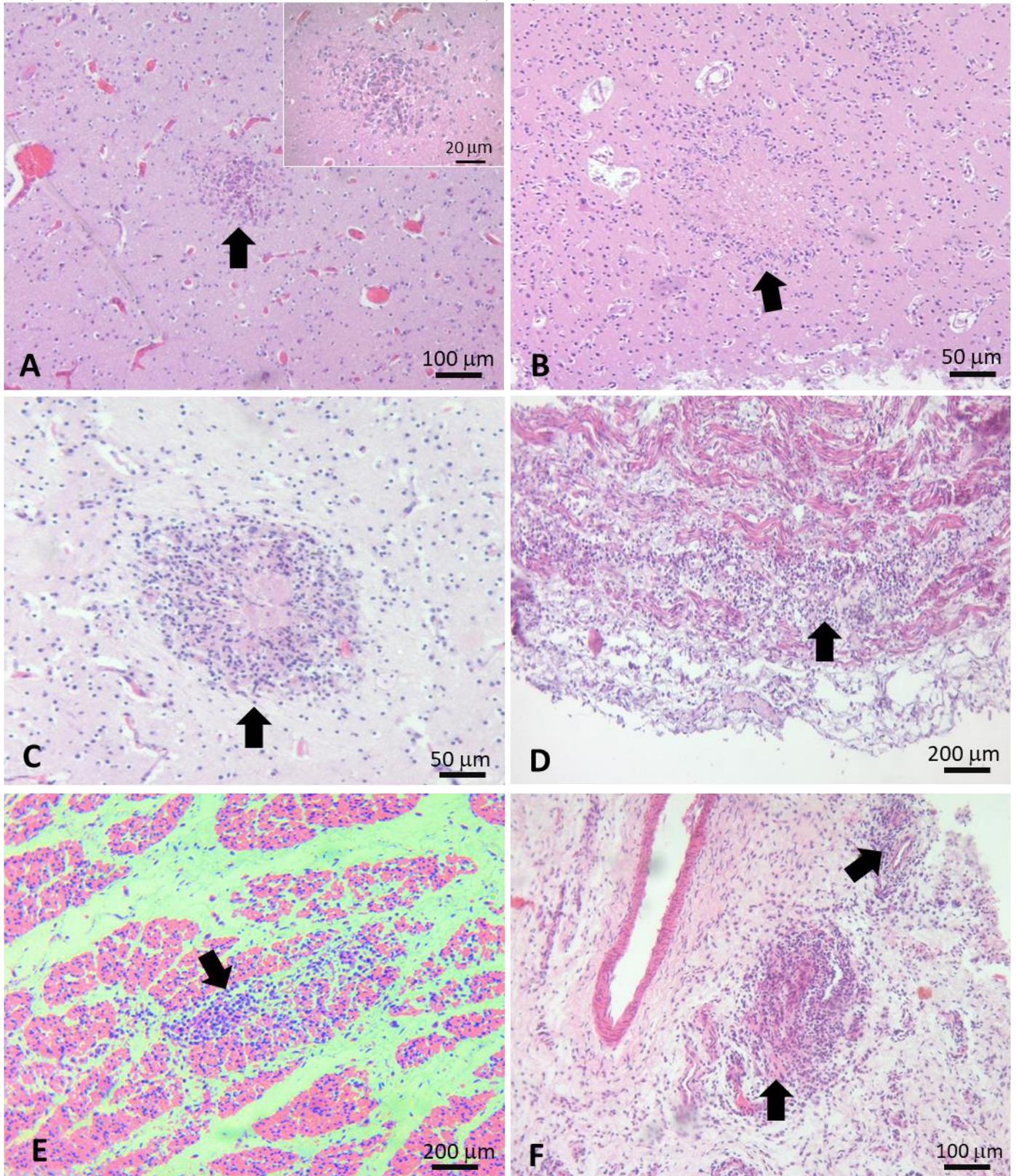
Tabela 2 - Correlação entre os resultados da histopatologia e PCR de abortamentos por *Neospora caninum* em bovinos.

Lesão histopatológica	PCR <i>N. caninum</i>		TOTAL
	+	-	
Sim	14	14	28
Não	6	51	57
TOTAL	20	65	85

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

A PCR de Pestívirus (BVDV) foi realizada em 21 dos fetos com neosporose, sendo todos negativos. Foi realizado isolamento bacteriano de órgãos de 11 casos, em todos não houve crescimento de bactérias patogênicas ou associadas as lesões histopatológicas.

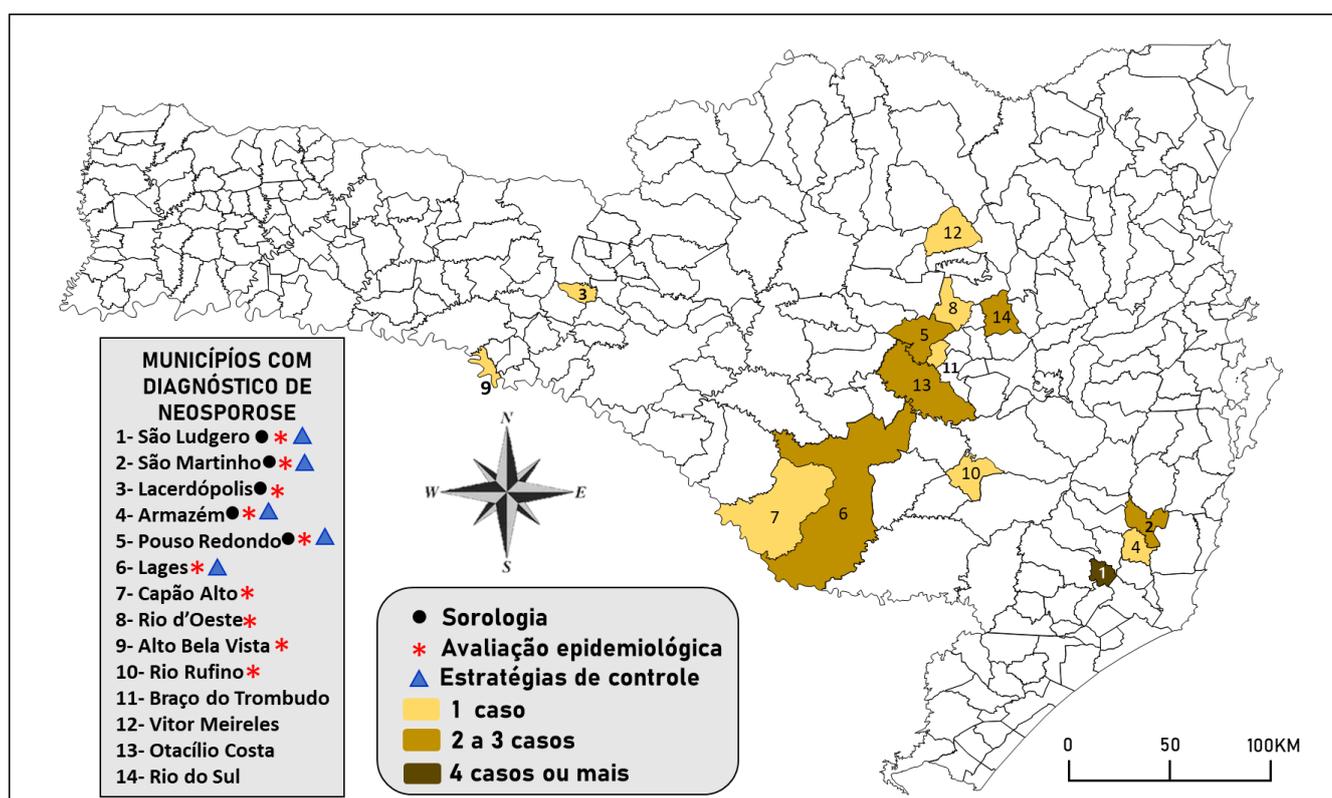
Figura 3 - Alterações histopatológicas em fetos bovinos com neosporose. (A) Encefalite mononuclear focal discreta (seta) insert: Maior aumento. (B) multifocal moderada (seta). (C) focal acentuada (seta). (D) Miocardite mononuclear multifocal moderada (seta). (E) Miosite mononuclear focal discreta (seta). (F) Placentite mista multifocal moderada (setas). Hematoxilina e Eosina.



4.3.2 Distribuição geográfica das propriedades com neosporose

Das 18 propriedades com diagnóstico de neosporose, 15 criavam bovinos com aptidão para leite e três para corte. Foi possível realizar inquérito epidemiológico em 61,11% (11/18) e sorologia anti-*N. caninum* em 33,33% (6/18). Todos os municípios onde houveram propriedades com diagnóstico de neosporose estão representados na Figura 4. Em São Martinho, houve coleta para análise sorológica e avaliação epidemiológica de duas propriedades. Já em Pouso Redondo, foi realizada avaliação epidemiológica de duas das três propriedades com neosporose. Nas propriedades localizadas nos municípios de Braço Trombudo, Vitor Meireles, Rio do Sul, Otacílio Costa e em uma propriedade do município de Lages não foi possível avaliação epidemiológica e sorológica.

Figura 4 - Mapa representativo dos municípios de origem dos casos de neosporose em bovinos no estado de Santa Catarina: relação com inquérito epidemiológico, sorologia anti-*Neospora caninum* e estratégias de controle.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

4.3.3 Avaliação epidemiológica das propriedades com neosporose

Dentre as propriedades diagnosticadas com neosporose, foi possível realizar a avaliação epidemiológica em 11. A maioria das propriedades era caracterizada pela produção de leite (90,9% - 10/11) e 9,09% (1/11) destinava a produção para corte. Quanto a estrutura, 63,33% (7/11) eram constituídas por sistema de produção semi-confinado e 36,67% (4/11) com animais a pasto, todas

as propriedades mantinham pastagens cultivadas, principalmente aveia e azevém no inverno, assim como milho e tifton como gramíneas de verão. Em todas as propriedades com semi-confinamento a alimentação consistia em silagem de milho, com suplementação de concentrado e pastagens com gramíneas perenes e cultivadas. A maioria das propriedades eram caracterizadas por pequenos estabelecimentos rurais (8/11), com pouca tecnificação, utilização de mão de obra familiar e desenvolviam alguma outra atividade agropecuária concomitante a bovinocultura, como exemplo a agricultura, suinocultura e avicultura.

A área total das propriedades variou de 14 a 150 hectares (média de 45,63), já a área destinada exclusivamente à criação de bovinos variou de 6 a 150 hectares (média: 31,66). O plantel total de bovinos demonstrou uma média de 63 animais (amplitude de 11 a 162 animais), em média 31,3 fêmeas em lactação (11-65). Dessas, houve média de 8,87 fêmeas primíparas (1-15) e 17,62 multíparas (8-30).

O sistema de ordenha caracterizou-se por ordenhadeira mecânica canalizada em 80% das propriedades (8/10) e 20% (2/10) era do balde ao pé. Em 54,54% (6/11) das propriedades havia piquetes maternidade. Após a parição, em 57,1% (4/7) dos casos, os terneiros eram separados das mães após a ingestão do colostro em até 24 horas e em 42,9% (3/7) das propriedades os terneiros eram separados imediatamente.

Os problemas reprodutivos foram os principais desafios sanitários relatados pelos produtores, sendo descrito em 100% das propriedades, além deste, haviam outros problemas sanitários, como a Tristeza Parasitária Bovina em 45,45% (5/11), mastite em 27,27% (3/11), diarreia em terneiros em 1,81% (2/11) e abscessos cutâneos em 9,09% (1/11), sendo que 72,72% (8/11) apresentava mais de um desafio sanitário relatado. O manejo reprodutivo era composto por Inseminação Artificial em 90,90% (10/11), sendo que 40% (4/10) associavam ao repasse com touro, provenientes de outras propriedades. Para diagnóstico de gestação, em 81,81% (9/11) utilizam a prática de palpação retal, e em todas era comum o uso da mesma luva em mais de um animal. Quanto aos índices de fertilidade, nos anos anteriores ao diagnóstico de neosporose foi observado aumento na taxa de repetição de cio em 72,72% (8/11) das propriedades.

Todas as propriedades relatavam históricos de abortos em novilhas de primeira cria, sendo que em 18,81% (2/11) havia associação de aborto entre a primípara e sua mãe. Não foi observada diferença na ocorrência de abortamento em relação à época do ano em 72,72% (8/11) das propriedades. Em 27,27% (3/11) observou abortamento em todas as fases de gestação, já 27,27% (3/11) observou uma maior frequência de abortamentos no segundo trimestre de gestação e 45,45% (5/11) observava mais abortamentos no terceiro trimestre de gestação.

Quanto à presença de cães, foi observado uma média de 2,9 cães por propriedade, variando de zero a 12 animais. Em 90,90% (10/11) havia contato direto dos cães com os bovinos, em pastagem e instalações. Em 90,90% (10/11) foram observados animais selvagens e em 81,81% (9/11) havia contato dos bovinos com animais de propriedades vizinhas. Os principais fatores associados a neosporose relacionados a cada propriedade encontram-se dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 - Fatores epidemiológicos associados à ocorrência de *Neospora caninum* em propriedades com diagnóstico de neosporose no estado de Santa Catarina.

Surto	No. cães	Acesso cães pastagens	Acesso de cães a restos fetais	Destino de carcaças e restos fetais	Piquete maternidade	Circulação animais selvagens
S1	2	Sim	Sim	Decompõem (ambiente)	Sim	Moderada
S2	2	Sim	Sim	Enterrados	Sim	Frequente
S3	2	Sim	Sim	Fornecido aos cães	Não	Moderada
S4	2	Sim	Sim	Enterrados	Não	Rara
S5	12	Sim	Sim	Enterrados	Sim	Frequente
S6	1	Sim	Sim	Enterrados	Sim	Moderada
S7	1	Sim	Sim	Decompõem (ambiente)	Sim	Frequente
C6	2	Sim	Sim	Decompõem (ambiente)	Sim	Frequente
S9	2	Sim	Sim	Enterrados	Não	Moderada
C8	4	Sim	Sim	Decompõem (ambiente)	Sim	Frequente
C1	0	-	-	Enterrados	Não	Moderada

S: surto; C: caso isolado.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

4.3.4 Perfil sorológico anti-*N. caninum* das propriedades com neosporose

No período supracitado, amostras de sangue de 277 bovinos foram colhidas, provenientes de seis propriedades localizadas em quatro diferentes regiões do estado, todas produtoras de leite. De todos os animais coletados, foi possível identificar as raças em 231 animais, sendo 72,29% (167/231) da raça Jersey, 1,73% (4/231) da raça Holandesa e 25,97% (60/231) de raças mestiças. As idades dos animais coletados variou de um mês a 13 anos, sendo que as faixas etárias observadas com maior frequência foram um (14,44% - 40/277) e dois anos (16,60% - 46/277).

Na análise de anticorpos IgG anti-*N. caninum* foi detectada uma ocorrência de 26,71% (74/277) animais soropositivos, sendo que todas as propriedades apresentaram soropositividade, com amplitude variando de 4,65% a 72,72%. A quantidade de animais avaliados em cada propriedade com a porcentagem dos animais positivos e a soroprevalência geral da propriedade está representada na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados sorológicos de propriedades diagnosticadas com neosporose, através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) anti-*N.caninum*.

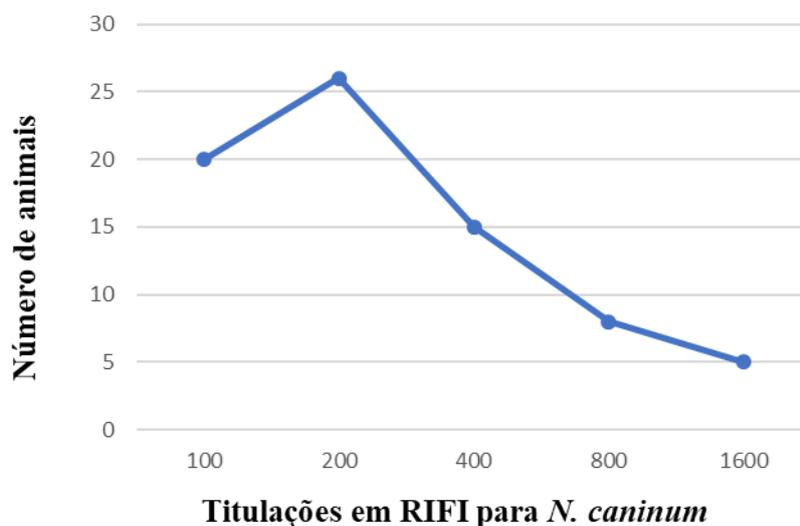
SURTO	MUNICIPIO	AVALIADOS	POSITIVOS	PERCENTUAL
S1	São Ludgero	26	13	50%
S2	São Martinho	83	27	32,50%
S3	Lacerdópolis	36	13	36,11%
S4	São Martinho*	43	2	4,65%
S5	Armazém	78	11	14,10%
S6	Pouso Redondo	11	8	72,72%
TOTAL	-	277	74	26,71%

S: surto; *Animais com histórico de abortamento descartados antes do exame sorológico.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Os títulos de anticorpos para *Neospora caninum* variaram de 1:100 a 1:1600, sendo que a titulação observada com maior frequência foi de 1:200 (35,1%-26/74) conforme pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 - Resultados das titulações da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Neospora caninum* em rebanhos bovinos com neosporose no estado de Santa Catarina.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Foi observada uma correlação entre a apresentação de distúrbios reprodutivos e a soropositividade para *N. caninum*. Dos animais positivos, 39,18% (29/74) apresentavam histórico reprodutivo de abortamento ou retorno ao cio. A frequência de distúrbios reprodutivos associada a diferentes níveis de titulações está representada na Tabela 5.

Tabela 5 - Correlação da titulação dos animais positivos para *Neospora caninum* por Imunofluorescência Indireta (RIFI) com os distúrbios reprodutivos apresentados.

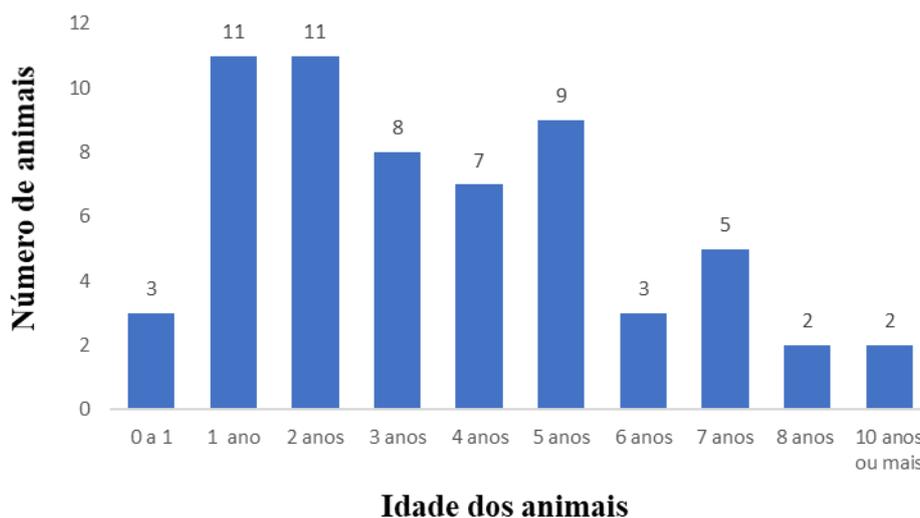
Titulação	n° animais	%	Distúrbio reprodutivo*	%
1:100	20	27,02	5	25
1:200	26	35,13	7	26,92
1:400	15	20,27	8	53,33
1:800	8	10,80	7	87,5
1:1600	5	6,80	2	40
TOTAL	74	100	29	39,18

*Abortamento ou retorno ao cio.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

A positividade, em relação à faixa etária, foi analisada em 61 animais positivos, sendo que os demais a idade não foi informada. A faixa etária entre um aos três anos foi a mais frequentemente associada a soropositividade, representando 36% (22/61) conforme pode ser observada na Figura 6. Em relação ao padrão racial, os animais positivos pertenciam em sua maioria às raças Jersey (60,8% - 45/74) e Holandês (5,4% - 4/74), já as raças mestiças (Jersey x Holandês) representaram 33,8% (25/74).

Figura 6 - Relação de bovinos positivos para *Neospora caninum* por Imunofluorescência Indireta (RIFI) de acordo com a idade (em anos).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

A análise de possíveis transmissões verticais foi realizada por um estudo longitudinal a partir dos resultados obtidos pela sorologia em cinco das seis propriedades avaliadas (Tabela 6).

Tabela 6 - Relação de soropositividade e distúrbios reprodutivos entre mãe e filha em rebanhos bovinos com neosporose no estado de Santa Catarina.

Surto	Município	Positivos/avaliados (%)	Histórico DR dos positivos (%)	Relação DR (mãe-filha)		Relação positividade (mãe-filha)	
				Sim/Não	n°	Sim/Não	n°
S1	São Ludgero	13/26 (50%)	A/RC (18,33%)	Sim*	-	-	-
S2	São Martinho	27/83 (32,50%)	A/RC (33,33%)	Sim	13	Sim	3
S3	Lacerdópolis	13/36 (36,11%)	A (30,76%)	Sim	7	Sim	2
S4	São Martinho	2/43 (4,65%)	A/RC (100%)	Sim	2	Não	-
S5	Armazém	11/78 (14,10%)	A (9,09%)	Não	-	Sim	1
S6	Pouso Redondo	8/11 (72,72%)	A/RC (87,5%)	Sim	1	Sim	2
TOTAL	-	74/277 (26,71%)	32 (43,24%)	-	23	-	8

S; surto; DR: Distúrbio reprodutivo. A: Aborto. RC: Repetição de cio; *comunicação pessoal do produtor, sem especificar quais animais.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Quanto à sorologia para *N. caninum* dos cães das propriedades, de seis avaliados provenientes de três propriedades (Propriedades S1, S2 e S6), dois foram positivos com titulação 1:100 (Propriedades S2 e S6).

4.3.5 Estratégias de controle da neosporose

Em sete propriedades realizou-se novos inquéritos epidemiológicos para avaliar as medidas de controle e prevenção conforme estão descritas na Tabela 7. Essas foram parcialmente efetuadas com redução de casos de abortamentos em 57,1% (4/7) e redução das taxas de retorno ao cio em 71,4% (5/7). Em duas (28,6%) obtiveram a eliminação completa dos cães da propriedade e em relação aos piquetes maternidade, não houve a criação do mesmo pela propriedade que não o possuía. Em quatro (57,1%) houve descarte de animais soropositivos para *N. caninum*. Em três propriedades, passou-se a descartar corretamente os resíduos fetais e placentários, incinerando ou enterrando.

Tabela 7 - Medidas instituídas para o controle da neosporose nas propriedades de criação de bovinos no estado de Santa Catarina.

Medidas/casos	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
Monitoramento sorológico	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Descarte de animais soropositivos (n)	Sim (25)	Sim (7)	-	Sim (20)	Sim (4)	Não	Não
Instalação de piquetes maternidade	*	*	-	Não	*	*	*
Destinação correta dos restos fetais	Sim	*	-	Sim	Sim	*	*
Restrição de cães	Sim	Sim	-	Não	Não	Não	Não
Redução dos casos de abortamento	Sim	Não	-	Não	Sim	Sim	Sim
Redução de retorno ao cio	Sim	Sim	-	Sim	Não	Sim	Sim

S: surto; n: número de animais, *: já possuía ou já realizava

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

4.4 DISCUSSÃO

Neospora caninum foi o agente mais frequentemente diagnosticado nas causas de abortamento em bovinos neste estudo. Este dado é compatível com várias outras pesquisas que também obtiveram este protozoário como a principal causa infecciosa de abortamento em bovinos, tanto no Brasil como no mundo (ANTONIASSI et al., 2013; WILSON et al., 2016). A frequência de diagnósticos de neosporose nesta pesquisa foi superior a outros estudos anatomopatológicos em outras regiões do Brasil e outros países, como 23% no Rio Grande do Sul (CORBELLINI et al., 2006), 52,94% no Paraná (SNAK et al., 2018) e 24,8% em São Paulo (CABRAL et al., 2009), já no Canadá houve frequência de 18,2% dos casos (WILSON et al., 2016). Entretanto, outros estudos no Brasil demonstram índices ainda maiores, como 63% em Minas Gerais (ORLANDO et al., 2013) e 70,5% no Rio Grande do Sul (ANTONIASSI et al., 2013), evidenciando a importância de tal agente infeccioso nos distúrbios reprodutivos de bovinos.

O diagnóstico de neosporose nos fetos bovinos abortados foi determinado a partir de lesões histológicas, associado a detecção do protozoário por análise molecular, além da evidência de fatores associados a infecção por análise epidemiológica detalhada da propriedade, por vezes descrita em histórico ou em pesquisa a campo. Todas essas análises foram, por vezes, concomitantes a avaliação sorológica dos animais dos rebanhos afetados. A associação destas técnicas se mostra eficaz para obtenção de um maior índice de diagnósticos etiológicos definitivos na pesquisa relacionada a casuística de abortamentos em ruminantes (SANTOS et al., 2011; ORLANDO et al., 2013; SNAK et al., 2018).

Macroscopicamente, a ausência de alterações é compatível com esse distúrbio, visto que nenhuma alteração macroscópica significativa associada a infecção pelo protozoário é descrita (DUBEY & SCHARES, 2011), porém *N. caninum* já foi associado a casos de mumificação fetal em bovinos (GHANEM et al., 2009).

As lesões histopatológicas encontradas no atual trabalho corroboram com estudos anteriores que classificam as lesões anatomopatológicas de abortamentos por *N. caninum* (PESCADOR et al., 2007; MALAGUTI et al., 2012). O encéfalo foi o tecido mais afetado, como em pesquisas anteriores, que descrevem a principal alteração como encefalite necrotizante mononuclear (DUBEY et al., 2003; CABRAL et al., 2009), diferindo de outras pesquisas que observaram lesões com maior frequência em músculo esquelético (PESCADOR et al., 2007) e coração (ORLANDO et al., 2013), porém, as lesões descritas nestes órgãos são semelhantes as encontradas na atual pesquisa.

Não foram observadas estruturas parasitárias em todas as seções de tecidos avaliadas histologicamente, dado semelhante ao de outras pesquisas que também não observaram estruturas morfológicamente compatíveis com o protozoário nas seções histológicas (MEERSCHMAN et al.,

2002; CABRAL et al., 2009; MACEDO et al., 2017). Tal dado reafirma a necessidade de complementar a avaliação histopatológica com outras análises para detecção do protozoário, como PCR ou IHQ (ANDERSON et al., 2000; DUBEY e SCHARES., 2011; MCALLISTER, 2016).

O atual estudo apresentou concordância moderada entre os métodos diagnósticos. A PCR é a técnica que apresenta maior especificidade e maior sensibilidade, comparando-se a histopatologia e a IHQ (DUBEY, 2003; ORLANDO et al., 2013; MACEDO et al., 2017; SNAK et al., 2018). Não foram encontradas alterações histopatológicas em 30% dos fetos com detecção do agente por PCR. Há dificuldade em encontrar lesões histopatológicas nos fetos infectados, devido a patogênese do protozoário, por muitas vezes infectar apenas os anexos placentários, o que influencia diretamente na diminuição da sensibilidade da técnica histopatológica (DUBEY et al., 2006). Em 28,57% dos casos foram observadas alterações histopatológicas compatíveis com neosporose, porém não houve a detecção do agente por PCR. Esses abortamentos eram provenientes de propriedades com diagnóstico de neosporose a partir de outros fetos associado a sorologia positiva para *N. caninum* e características epidemiológicas compatíveis com a enfermidade. A não detecção do agente pela análise molecular pode ser atribuída pela autólise do tecido analisado podendo degradar o DNA, gerando a possibilidade de um resultado falso negativo (ORLANDO et al., 2013; SNAK et al., 2018). Além disso, o DNA da amostra é extraído a partir de aproximadamente 5 gramas de tecido, podendo não ser representativo para a detecção do agente, visto que este protozoário se distribui, principalmente, de forma multifocal (BUXTON et al., 2002; MCALLISTER, 2016; SNAK et al 2018).

Neste estudo, o encéfalo foi o tecido analisado por esta técnica, por ser o órgão de escolha para detecção do parasito por técnicas moleculares, visto que é o órgão mais afetado pelo protozoário (ORLANDO et al., 2013; MCALLISTER, 2016). Snak et al. (2018) realizaram a técnica de PCR em 17 fetos avaliando *N. caninum* em encéfalo e coração, tendo 52,9% e 29,4% de positividade, respectivamente.

Neste trabalho, as alterações histopatológicas encontradas em placenta foram, infiltrado inflamatório misto associado a necrose, lesões compatíveis com outros estudos de neosporose, onde havia infiltrado intersticial e em base de carúnculas, mononuclear além de necrose de células mesenquimais e trofoblastos (GIBNEY et al., 2008; CASPE et al., 2012; MESQUITA et al., 2018).

A quantidade de placentas avaliadas neste trabalho foi baixa, pois a maioria não foi enviada juntamente ao feto para análise histopatológica, levando a escassez de estudos descrevendo a patogenia e as lesões placentárias (DUBEY e SCHARES, 2011). A placenta tem potencial impacto na transmissão de *N. caninum*, podendo propagar formas evolutivas do protozoário aos hospedeiros definitivos, aumentando as chances de manutenção e reprodução deste agente infeccioso nos

rebanhos (DUBEY et al., 2006); visto isso, é extremamente importante a avaliação anatomopatológica detalhada da placenta, associando a observação de lesões com a análise por exames complementares, como PCR e IHQ (BERGERON et al., 2001; MESQUITA et al., 2018). As pesquisas que descrevem detalhadamente as lesões placentárias causadas por *N. caninum* são, em sua maioria, estudos experimentais, onde havia maior controle e cuidado na recuperação e coleta dos anexos placentários, evitando a autólise das amostras e possibilitando a análise integral de todas as estruturas (MACALDOWIE et al., 2004; CASPE et al., 2012).

Quanto a idade gestacional, neste estudo, a maioria dos abortamentos causados por *N. caninum* ocorreram no terço médio de gestação, sendo o sexto mês mais frequentemente observado, dados compatíveis com outras pesquisas que descreveram maior ocorrência de abortamentos por neosporose no segundo trimestre de gestação (ANTONIASSI et al., 2013), sendo que há maior frequência entre o quinto e o sexto mês (ORLANDO et al., 2013; SNAK et al., 2018) ou entre o quinto e o sétimo mês (SAGER et al., 2001). Esse período mais frequentemente observado pode ter relação com a patogenia do protozoário, pois é o período mais provável de reativação de formas infectantes no hospedeiro. Nesta fase o feto é capaz de desencadear resposta imune, porém rudimentar e insuficiente para protegê-lo da infecção (BUXTON et al., 2002; MCALLISTER, 2016). Entretanto, o abortamento por *N. caninum* pode ocorrer a partir do terceiro mês até o término da gestação (DUBEY, 1999; FARIAS, 2007).

A soroprevalência determinada neste estudo foi superior a outras análises na região Sul do Brasil, como no Paraná (23,67%) (SNAK et al., 2018) e no Rio Grande do Sul (17%) (CORBELLINI et al., 2006). Já em Santa Catarina, tal dado foi superior a outros índices encontrados, como na região Oeste (7,7%) (LORENZETT et al., 2016) e na região Serrana (13,81%) (PADILHA et al., 2017). Outros estados do Brasil demonstram grande variabilidade nos índices de soroprevalência, no Mato Grosso do Sul há variação de 9,1% a 43% (ANDREOTTI et al., 2004; MELLO et al., 2008) e em Minas Gerais há dados que variam de 11,1% a 97,2% (RAGOZO et al. 2003; GUEDES et al., 2008). A superioridade no índice sorológico deste estudo, pode ser justificada pelo diagnóstico prévio de neosporose das propriedades avaliadas, sendo assim, todas as propriedades avaliadas sorologicamente eram afetadas pela enfermidade. Outros estudos relatam uma menor soroprevalência sendo justificada pela escolha das propriedades ao acaso (LORENZETT et al., 2016).

Dos animais soropositivos, aproximadamente 40% apresentavam algum distúrbio reprodutivo, como abortamento ou retorno ao cio. Animais soropositivos apresentam um risco 3 a 4 vezes (SAGER et al., 2001) ou 7,21 vezes (FAVERO et al., 2017) maior de abortamento em

relação aos soronegativos, evidenciando que manter animais soropositivos na propriedade é um fator de risco para a manutenção do protozoário nos rebanhos.

Entre as vacas soropositivas neste estudo, a faixa etária mais frequentemente demonstrada foi entre um a três anos de idade (36%), diferindo da literatura, na qual descreve a faixa etária (em relação a soropositividade) como um fator de risco, onde animais mais velhos apresentam soroprevalência maior, o que pode indicar importante papel da transmissão horizontal nos rebanhos, também, conforme aumenta a idade, aumenta a exposição a oocistos esporulados presentes no ambiente (GUIMARÃES et al., 2004; LORENZETT et al., 2016; MASATANI et al., 2018).

Houve relação de distúrbio reprodutivo apresentado entre mãe e filha, com ambas soropositivas. No primeiro estudo transversal do país, foram observadas altas proporções de transmissão vertical (50%, 83,33% e 83,33%) nas fazendas avaliadas, indicando que nesta pesquisa, a principal via de transmissão foi a transplacentária (CARDOSO et al., 2012). No atual estudo, 23 animais soropositivos (31,08%-23/74) eram filhas de vacas soropositivas. Hein et al. (2012) também sugerem que a transmissão vertical pode ser uma das principais formas de manutenção do protozoário entre gerações nos rebanhos avaliados, chegando a uma alta frequência (69,2%; 9/13) de mães e filhas soropositivas. Na espécie bovina, *N. caninum* é um dos agentes infecciosos que apresentam maior incidência de transmissão transplacentária (DUBEY e SCHARES, 2011).

A presença de cães foi observada em todas as propriedades avaliadas neste estudo, além disso, todos os cães tinham acesso a instalações e pastagens de bovinos e todos também tinham possibilidade de contato com carcaças e restos fetais. A presença destes animais compreende uma importante relação com a infecção pelo protozoário, visto que por vezes, a espécie canina desempenha a função de hospedeiro definitivo no ciclo de vida deste agente etiológico (DIJKSTRA et al., 2002). A ocorrência de abortamento em bovinos por *N. caninum* pode estar diretamente relacionada a presença de cães nas propriedades (BARTELS et al., 1999). Estudos descrevem que há correlação positiva entre a soropositividade de cães de fazendas e aumento da soroprevalência em bovinos (WOUDA et al., 1999). De acordo com Favero et al. (2017) os cães nas propriedades rurais foi um dos principais fatores associados a neosporose, com uma análise multivariada resultando em 1,22 mais chances de soropositividade de bovinos na presença de cães nas fazendas. Lorenzett et al. (2016) visualizaram que a ausência ou o número reduzido de cães presentes na propriedade diminuiu em 0,52 vezes a chance da propriedade ser positiva.

A circulação de animais selvagens nas propriedades avaliadas variou de rara a frequente. Lorenzett et al. (2016) observaram que em 81,4% das propriedades havia circulação de espécies de animais selvagens, porém, não encontrou correlação desta característica com a soroprevalência dos animais. A observação destes animais é um fator relevante na prevalência deste protozoário, visto

que animais silvestres, como canídeos, desempenham papel de hospedeiro definitivos no ciclo e podem disseminar oocistos nas pastagens ou outros ambientes habitados por bovinos (DONAHOE et al., 2015; MCALLISTER, 2016).

A maioria das propriedades avaliadas utilizavam inseminação artificial (I.A.) no manejo reprodutivo, sendo que metade associavam ao repasse com touro, dessas propriedades duas foram avaliadas sorologicamente e apresentaram rebanhos com os maiores índices sorológicos (72,72% e 50%). Snak et al. (2018), analisando propriedades que utilizavam I.A. associada a repasse com touro, encontraram 2,02 vezes mais chances de ter o protozoário do que as propriedades que usam exclusivamente I.A.

Todas as propriedades avaliadas possuíam a pastagem como fonte de alimentação aos bovinos. A pastagem nos sistemas de criação é considerada um fator associado a infecção, visto que nesses ambientes há maior ingestão de oocistos esporulados pelos hospedeiros intermediários, sendo a via mais provável de infecção horizontal nos rebanhos (RINALDI et al., 2005).

A maioria dos abortamentos causados por *N. caninum* eram provenientes de propriedades de bovinocultura de leite e a maioria das propriedades avaliadas sorologicamente neste estudo eram propriedades de animais com aptidão leiteira. A maioria das pesquisas com *N. caninum* é relacionada a bovinocultura leiteira (REICHEL et al., 2013) e pouco se sabe sobre causas de abortamento em bovinos de corte, esse fato é justificado pela dificuldade de monitoramento de perdas reprodutivas e a dificuldade de se encontrar fetos abortados a campo, assim não há avaliações precisas das perdas induzidas por neosporose em bovinos de corte (DUBEY, SCHARES e ORTEGA-MORA, 2007). Além disso, fazendas de corte são administradas com menor intensidade, e geralmente o contato próximo entre as excreções de cães e a criação de bovinos é menor que na bovinocultura leiteira (BARLING et al., 2001).

O controle da doença é algo complexo que necessita de uma observação durante anos, além de afetar questões econômicas e pessoais da propriedade (GUIDO et al., 2016). No período pesquisado, as principais estratégias de controle estabelecidas nas propriedades foram a eliminação de cães, o descarte de alguns bovinos soropositivos e o descarte correto de resíduos fetais. Tais medidas reduzem as chances de eliminação de oocistos no ambiente, reduzindo as taxas de manutenção do protozoário nos rebanhos (HEIN et al., 2012; MCALLISTER, 2016).

4.5 CONCLUSÕES

Neospora caninum é o principal agente etiológico associado a causas de abortamento em bovinos no presente estudo. Os tecidos mais frequentemente observados com lesões foram encéfalo (encefalite necrotizante mononuclear), coração (miocardite mononuclear) e músculo esquelético (miosite mononuclear). A associação entre histopatologia e PCR demonstrou concordância moderada como método de diagnóstico de neosporose em fetos bovinos abortados.

O perfil sorológico das propriedades com diagnóstico etiológico definitivo de neosporose foi elevada, demonstrando associação com os distúrbios reprodutivos.

Medidas de controle foram parcialmente efetivadas nas propriedades avaliadas, havendo diminuição nas taxas de abortamento e retorno ao cio, o que destaca a importância do diagnóstico de neosporose em fetos bovinos abortados para a efetivação de medidas de controle nas propriedades, diminuindo as perdas reprodutivas e econômicas.

5 Abortamento por *Neospora caninum* em bovinos de leite no Sul do estado de Santa Catarina: acompanhamento dos casos por quatro anos.

Abortion due to Neospora caninum in dairy cattle in Southern Santa Catarina state: case monitoring over four years.

RESUMO

A neosporose é a principal causa infecciosa de abortamento em bovinos, registrada em vários estados do Brasil. Este trabalho descreve o diagnóstico de abortamentos causados por *Neospora caninum*, além do acompanhamento epidemiológico e sorológico desta doença em bovinos durante quatro anos. Entre 2015 e 2019 realizou-se necropsia de dez fetos bovinos abortados, entre o quinto e oitavo mês de gestação, no ano de 2015 foi enviado um feto abortado, 2016 foram três, em 2017, dois fetos e em 2019 quatro fetos, todos originados de uma propriedade leiteira na região sul de Santa Catarina. Na necropsia dos fetos não foram observadas lesões macroscópicas. A histopatologia revelou encefalite necrotizante mononuclear multifocal discreta a moderada em cinco fetos, miosite e miocardite mononuclear multifocal discreta em quatro e cinco fetos, respectivamente. A PCR foi positiva para *N. caninum* em cinco fetos. Realizou-se três visitas a propriedade para avaliação epidemiológica e coleta de sangue para pesquisa de anticorpos IgG contra *N. caninum*. O plantel total era de 170 bovinos das raças Jersey, Holandês e mestiços, criados em sistema semi-confinado com ordenha mecânica canalizada. Desde o ano de 2014 houve um aumento significativo no número de abortamentos, sendo que em 2014 aproximadamente 20 vacas abortaram, no ano de 2015 aproximadamente 10 e no ano de 2016 menos de cinco, no ano de 2017 quatro vacas abortaram, já no ano de 2018 11 e em 2019 ocorreram quatro abortamentos. Relatou-se também aumento da taxa de retorno ao cio e tanto vacas primíparas quanto multíparas apresentavam distúrbios reprodutivos. Os abortos eram registrados durante todo o ano e ocorriam predominantemente entre o quarto e o sexto mês de gestação. Em 2016 realizou-se imunofluorescência indireta (RIFI) em 26 vacas, 13 com histórico de distúrbios reprodutivos e em outras 13 sem desordens, 50,0% (13/26) foram soropositivas, com títulos variando de 1:100 a 1:1600. Em 2017 realizou-se ensaio imunoenzimático (ELISA) de todo o rebanho, sendo que 26,54% (43/162) apresentou positividade, sendo que 30,4% (17/56) possuem distúrbios reprodutivos. Foi observado que apenas animais nascidos na propriedade eram utilizados para reposição, houve menor possibilidade de contato direto entre cães da propriedade com instalações de ordenha, restos placentários e fetais, destinando esses de forma adequada, incinerando ou enterrando. Houve o descarte de 30 animais da propriedade, sendo que 25 apresentavam distúrbios reprodutivos. Todas as fêmeas jovens filhas de vacas soropositivas continuaram na propriedade para reposição. Durante o período avaliado, todos os cães foram eliminados. A partir deste relato concluiu-se que *N. caninum* é importante agente de desordens reprodutivas em bovinos na região Sul de Santa Catarina, as diferentes análises sorológicas apresentaram um bom índice de triagem para a inclusão de estratégias de controle na propriedade. Além disso, o acompanhamento dos índices reprodutivos das propriedades afetas se faz necessário com o passar dos anos, possibilitando melhor observação das estratégias de controle deste distúrbio.

Palavras-chave: distúrbio reprodutivo, morte fetal, neosporose, parasitologia.

ABSTRACT

Neosporosis is the main infectious cause of abortion in cattle, reported in several states in Brazil. This study aims to describe the diagnosis of bovine abortions due to *Neospora caninum*, and the seroepidemiological analyzes over four years. From 2015 to 2019, necropsy was performed on ten aborted bovine fetuses, between fifth and eighth month of pregnancy from a dairy property in the southern region of Santa Catarina. In 2015 one aborted bovine fetus was analyzed, while in 2016 were three, in 2017 were two fetuses and in 2019 four fetuses. Fetuses were necropsied, samples of all organs were fixed in 10% buffered formalin and processed for histopathological evaluation. Brain samples were analyzed using polymerase chain reaction (PCR) for *N. caninum*. No macroscopic lesions were observed. Histopathology revealed mild to moderate multifocal mononuclear necrotizing encephalitis in five fetuses, myositis and discrete multifocal mononuclear myocarditis in four and five fetuses, respectively. PCR was positive for *N. caninum* in five fetuses. Three visits were performed in the farm for epidemiological evaluation and serum samples collection for IgG antibodies anti-*N. caninum*. The total herd was 170 Jersey, Holstein and crossbred cattle, the system of production was semi-confined, and the milking system was mechanical type. Since 2014, there has been a significant increase in abortions cases and repeat breeding, with approximately 20 cows aborting in 2014, approximately 10 in 2015 and less than five in 2016, in 2017 four, in 2018 11, and in 2019 there were four abortions. Both primiparous and multiparous cows had reproductive disorders. Abortions were recorded throughout the year and occurred predominantly between the fourth and sixth months of pregnancy. In 2016, indirect immunofluorescence (RIFI) was performed on 26 cows, 50% (13/26) were seropositive, with titles ranging from 1:100 to 1:1600, 61.5% had reproductive disorders. In 2017, an immunoenzymatic assay (ELISA) of the herd was performed, with 26.54% (43/162) seropositivity, and 30.4% (17/56) showing reproductive disorders. In control measures analyzes, only animals born on the farm were used for replacement, there was less possibility of direct contact between dogs on the farm with milking installations, placental or fetal tissues destined appropriately, incinerating or burying. In addition, 30 cows were discarded from the farm, 25 had reproductive disorders. All female calves daughter of seropositive cows remained on the farm for replacement. During the evaluated period, all dogs were eliminated. From this report, it can be concluded that *N. caninum* is an important agent of reproductive disorders in cattle in the southern region of Santa Catarina, the different serological analyzes showed a good screening index for the inclusion of control strategies on the farm. In addition, monitoring the reproductive indices of the affected farms over the years is necessary, allowing better observation of the control strategies for this disorder.

Keywords: reproductive disorder, fetal death, neosporosis, parasitology.

5.1 INTRODUÇÃO

A neosporose é uma enfermidade infecciosa cosmopolita, causada pelo protozoário *Neospora caninum* (DUBEY et al., 2007; MCALLISTER, 2016). A forma de transmissão desse protozoário aos bovinos é horizontal através do contato com cães ou canídeos selvagens, ou vertical quando há infecção transplacentária, sendo essa a mais importante, contribuindo para a permanência da infecção nos rebanhos (DUBEY et al., 2007; BENAVIDES et al., 2012; MCALLISTER, 2016). Fetos podem morrer no útero, serem reabsorvidos, mumificar, nascerem mortos, nascerem vivos mas doentes, ou clinicamente normais, porém, infectados (ANDERSON et al., 2000). A idade da fêmea, ordem de parto e histórico de abortamento geralmente não afetam a taxa de infecção congênita, porém, é relatado que a transmissão vertical é mais frequente em vacas jovens (DUBEY, 2003).

No estado de Santa Catarina, os estudos com este protozoário são, em sua maioria, análises sorológicas de rebanhos e fatores de risco relacionadas a infecção (MOURA et al., 2012; LORENZETT et al., 2016; FAVERO et al., 2017; PADILHA et al., 2017). Há apenas um estudo descrevendo a análise molecular e imuno-histoquímica de fetos abortados por *N. caninum* (MACEDO et al., 2017).

Tendo em vista a importância produtiva e econômica desse protozoário para a bovinocultura, e pouca pesquisa atual dedicada a esse distúrbio na região em estudo, este trabalho tem por objetivo relatar a primeira descrição de neosporose como causa de abortamento em bovinos leiteiros no sul do estado de Santa Catarina, descrevendo o acompanhamento da propriedade ao longo de quatro anos.

5.2 RELATO DE CASO

Entre setembro de 2015 a setembro de 2019, foram encaminhados para avaliação anatomopatológica dez fetos bovinos: em setembro de 2015, uma fêmea, abortada no sexto mês de gestação (Feto 1); em junho de 2016, uma fêmea, oito meses (Feto 2), em agosto de 2016, dois fetos, um macho (Feto 3) e uma fêmea (Feto 4) de sete e cinco meses, respectivamente, e em outubro de 2017, dois fetos machos, de seis (Feto 5) e sete (feto 6) meses de gestação, já em 2019 no mês de abril foi enviado um feto macho de quatro meses (Feto 7) e em setembro foram enviados três fetos sendo uma fêmea de seis meses (Feto 8), e dois fetos machos, de cinco (Feto 9) e três meses (Feto 10). Todos os fetos eram provenientes de uma mesma propriedade no município de São Ludgero, região Sul de Santa Catarina, onde ocorreu inúmeros casos de abortamentos.

Amostras de placenta, encéfalo, pulmões, coração, timo, pálpebra, diafragma, músculo esquelético, fígado, abomaso, baço e rins foram coletadas e acondicionadas em formalina

tamponada a 10%, incluídas em blocos de parafina e processados rotineiramente pela técnica de hematoxilina e eosina (HE). Fragmentos congelados de encéfalo foram analisados pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a detecção de *N. caninum* e *Toxoplasma gondii*, utilizando como alvo as sequências Nc5-Np21plus/Np6plus e REP-529, respectivamente (MÜLLER et al., 1996).

Realizaram-se três visitas a propriedade para avaliação das características epidemiológicas e coleta de sangue para análise sorológica. A primeira visita ocorreu em fevereiro de 2016 na qual realizou-se coleta de sangue de 26 vacas, todas em lactação, sendo 13 com histórico de distúrbios reprodutivos (aborto e/ou retorno ao cio) e outras 13 sem desordens, além de sangue dos dois caninos da propriedade. As amostras de soro de todos os animais foram analisadas por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para pesquisa, conforme Conrad et al. (1993) de IgG contra *N. caninum* utilizando cromoantígeno taquizoítos da cepa NC1. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram reação na diluição 1:100 (bovinos) e 1:50 (caninos), as quais foram diluídas sequencialmente, em múltiplos de dois, até diluição máxima reativa final para a titulação. Soros controles positivo e negativo foram utilizados a fim de comparação.

A segunda visita foi realizada em novembro de 2017, na qual foram coletadas amostras de sangue de todo o plantel de fêmeas composto por 162 bovinos (37 bezerras e 125 vacas), além de um canino. Essas amostras foram submetidas a ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos específicos contra *N. caninum* (KIT CIVTEST BOVIS, HIPRA®). Amostras com padrão S/P < 6% foram consideradas negativas; padrão S/P > 6% e < 10% suspeitas; padrão S/P > 10 % positivas.

A terceira visita ocorreu em julho de 2019 para realização de uma nova análise epidemiológica, evidenciando a situação dos distúrbios reprodutivos apresentados e avaliando medidas de controle e prevenção da doença.

A propriedade tem por atividade a bovinocultura de leite com sistema de ordenha mecânica canalizada, com plantel de aproximadamente 170 bovinos da raça Jersey, Holandês e Jersolando em sistema semi-confinado, com alimentação a base de silagem de milho, concentrado e pastagens cultivadas.

De acordo com o produtor, desde o ano de 2014 houve um aumento significativo no número de abortos, sendo que em 2014 de 70 vacas prenhes, aproximadamente 20 (28,6%) abortaram, no ano de 2015 aproximadamente 10 (14,29%) e no ano de 2016 menos de cinco (7,14%), no ano de 2017 quatro vaca abortaram, já no ano de 2018 foi observado que 11 vacas abortaram, e em 2019 ocorreram quatro abortamentos.

Os abortos eram registrados durante todo o ano, com maior intensidade no verão, e predominantemente entre o quarto e o sexto mês de gestação. Não era dado um destino adequado

aos restos fetais e placentários, sendo que esses se decompunham no meio ambiente. A propriedade possui piquete maternidade.

Relatou-se também aumento da taxa de retorno ao cio, que ocorriam o ano todo, sendo que aproximadamente 50% das vacas foram inseminadas por até cinco vezes para obter uma cria. Tanto vacas primíparas quanto multíparas apresentavam distúrbios reprodutivos. No manejo reprodutivo era utilizado inseminação artificial e repasse com touro, e todas as fêmeas de reposição eram nascidas na propriedade. As vacas eram vacinadas a cada três meses para *Leptospira* sp. e, anualmente para os vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e rinotraqueíte viral bovina (IBR). Realizavam-se também exames periódicos para brucelose e tuberculose, com resultados negativos.

Na avaliação macroscópica dos fetos foram observadas apenas lesões inespecíficas, como edema no subcutâneo por toda extensão toracoabdominal, além disso, dois fetos (abortados no terceiro e quarto mês de gestação) apresentavam ressecamento e desidratação difusa de todos os tecidos, compatível com mumificação fetal. A avaliação histopatológica do encéfalo demonstrou áreas de gliose e necrose do neurópilo, circundada por infiltrado de linfócitos e plasmócitos focal a multifocal discreta a moderada, caracterizando uma encefalite necrotizante mononuclear em cinco fetos (Figura 7A). Na musculatura esquelética e cardíaca havia infiltrado de linfócitos e plasmócitos em miofibras ou em miocárdio, multifocal discreto em quatro e três fetos, respectivamente (Figura 7B), caracterizando miosite e miocardite mononuclear. A PCR para *N. caninum* foi positiva em cinco (Tabela 8) e todos negativos para *T. gondii*.

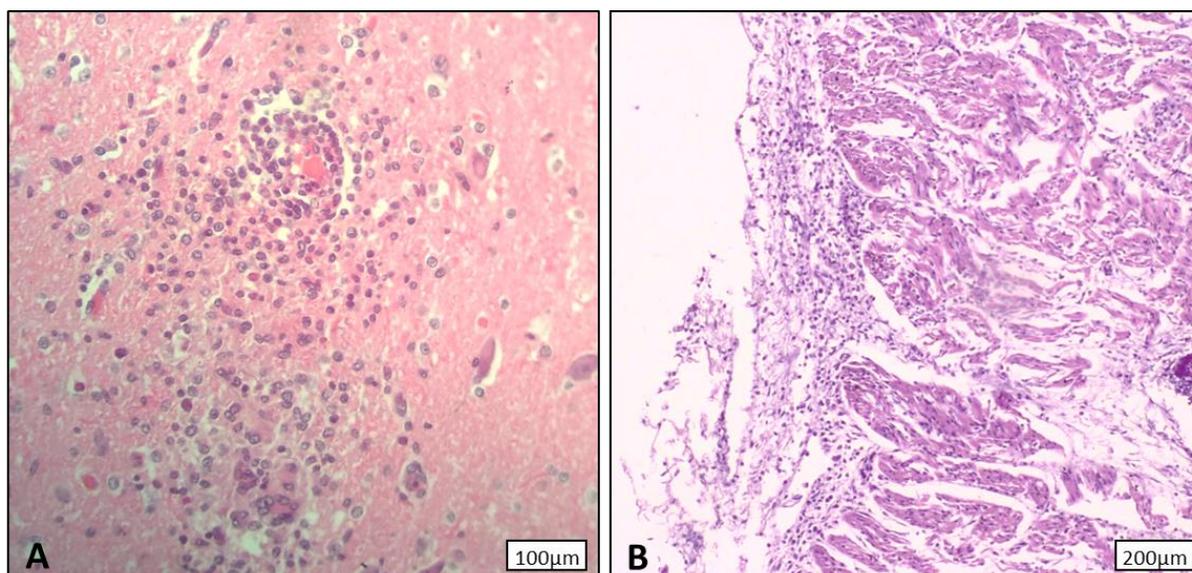
Tabela 8- Relação de fetos bovinos avaliados em uma propriedade afetada por *Neospora caninum* durante um período de quatro anos.

FETO	DATA	IDADE	LESÕES HISTOPATOLÓGICAS			PCR <i>N. caninum</i>
			Encéfalo	Músculo	Coração	
1	09/2015	6 M	+	-	-	Positivo
2	06/2016	8 M	-	-	-	Negativo
3	10/2016	7 M	+	+	-	Negativo
4	10/2016	5 M	+	+	+	Positivo
5	10/2017	6 M	+	-	-	Positivo
6	10/2017	7 M	+	-	+	Negativo
7	04/2019	4 M	-	-	-	Negativo
8	09/2019	6 M	-	+	-	Positivo
9	09/2019	5 M	-	+	+	Positivo
10	09/2019	3 M	-	-	-	Negativo
TOTAL	-	-	5	4	3	5

M: mês. Intensidade de lesão: += discreto, -= negativo.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Figura 7 - Abortamento em bovinos por *Neospora caninum*. A) Encefalite necrotizante mononuclear focal discreta. B) Miocardite linfoplasmocitária multifocal discreta.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Os resultados da RIFI revelaram que 50% (13/26) das vacas avaliadas foram soropositivas para *N. caninum*, com títulos variando de 1:100 a 1:1600, sendo que oito dessas (61,5%) apresentavam histórico de transtornos reprodutivos e seis não (Tabela 9).

Tabela 9- Recíproca de títulos de anticorpos contra *Neospora caninum* por RIFI em vacas leiteiras com (n=8) e sem (n=6) distúrbios reprodutivos de um plantel na região Sul de Santa Catarina.

Distúrbio reprodutivo	Titulação sorológica para <i>N. caninum</i>						TOTAL
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	Negativo	
Aborto e/ou retorno ao cio	1	4	2	1	-	5	13
Sem histórico	2	1	-	1	1	8	13
TOTAL	3	5	2	2	1	13	26

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

As vacas soropositivas que apresentavam histórico de problemas reprodutivos tiveram variações quanto a idade e a ordem de parto. Três tinham 2,5 anos, eram primíparas, abortaram a primeira cria e estavam prenhes; três apresentavam aproximadamente 5 anos, com uma abortando nas primeira e terceira gestações; outra nas segunda e quarta e a outra abortou na terceira gestação. Os outros dois animais positivos tinham sete e nove anos de idade com dois partos seguidos de dois

abortos e três partos seguidos de dois abortos, respectivamente. As seis vacas soropositivas e sem históricos de desordens reprodutivas tinham entre 2 e 11 anos com diferentes ordens de parto.

Os resultados de ELISA identificaram 26,54% (43/162) do rebanho como reagente para *N. caninum* e 8,02% (13/162) suspeito (Tabela 10). Dos animais que apresentaram reação na análise, 30,4% (17/56) apresentaram distúrbio reprodutivo, sendo que 70,6% (12/17) abortaram e tiveram vários episódios de retorno ao cio, 17,6% (3/17) de 5 a 15 retornos ao cio sem prenhes e 11,8% (2/17) abortaram sem histórico de retorno ao cio. Destas, 76,47% (13/17) eram multíparas com idade variando de 3 a 7 anos com sete vacas abortando uma vez e quatro abortando duas vezes. As primíparas perfizeram os outros 23,53% (4/17) com idade entre 2 e 3 anos, três com um aborto e uma com múltiplos retornos ao cio sem prenhes.

Os animais que eram reagentes e não apresentaram histórico de abortamento 15,38% (6/39) eram bezerras de até 12 meses, 25,647% (10/39) eram novilhas de 14 a 24 meses, 23,07% (9/39) eram primíparas com 2 anos a 2 anos e 8 meses e 35,89% (14/39) eram multíparas com idade de 3 a 12 anos.

Tabela 10 - Correlação entre bovinos avaliados por ELISA para *Neospora caninum* e apresentação de distúrbios reprodutivos em um rebanho afetado por neosporose na região Sul de Santa Catarina.

Distúrbio reprodutivo	ELISA para <i>N. caninum</i>			TOTAL
	Não reagente S/P (0%)	Reagente suspeito S/P (6 a10%)	Reagente S/P (>10%)	
Aborto e/ou retorno ao cio	17	4	13	34
Sem histórico	89	9	30	128
TOTAL	106	13	43	162

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Os dois cães da propriedade que foram avaliados na primeira análise apresentaram sorologia negativa para *N. caninum*. Na segunda coleta esses dois cães não residiam mais na propriedade, o cão avaliado na segunda análise também não apresentou reação no teste. Os cães desta propriedade circulavam livremente entre os bovinos, ambientes de ordenha e manejo de animais, com livre acesso as pastagens e as fontes de água (Figura 8A e 8B). Outras propriedades vizinhas também possuíam cães que eventualmente adentravam na propriedade, bem como essa localizava-se em uma região de mata Atlântica e carnívoros selvagens também frequentemente eram avistados nas imediações

Figura 8 - Abortamento em bovinos de leite por *Neospora caninum* no Sul do estado de estado Santa Catarina. A) Canino da propriedade com livre acesso as instalações de ordenha. B) Caninos com acesso as pastagens.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

As estratégias de controle que estão sendo adotadas são a reposição apenas com animais nascidos na propriedade e o impedimento do contato direto entre cães da propriedade com instalações de ordenha e restos placentários e fetais, destinando estes de forma adequada, incinerando ou enterrando, tais tecidos não são mais deixados no ambiente em decomposição. Houve o descarte de 30 bovinos da propriedade, sendo que 25 apresentavam distúrbios reprodutivos. Todas as fêmeas jovens filhas de vacas soropositivas continuaram na propriedade para reposição do lote de vacas em lactação. Durante o período avaliado, todos os cães foram retirados da propriedade.

5.3 DISCUSSÃO

Esse relato descreve neosporose em vacas de leite no sul do estado de Santa Catarina. No Brasil, *N. caninum* é considerado importante agente abortivo em bovinos (CORBELLINI et al., 2006; ANTONIASSI et al., 2013; ORLANDO et al., 2013). No entanto, de acordo com a literatura consultada, esse é o segundo relato de abortamento por *N. caninum* em bovino no estado catarinense (MACEDO et al., 2017).

Em um estudo de soroprevalência para *N. caninum* em vacas leiteiras na região Oeste de SC observou-se uma ocorrência de 7,7% (23/299) (LORENZETT et al., 2016). Em outro estudo em vacas leiteiras do município de Lages, SC encontrou-se 23,1% (86/373) dos animais positivos

(MOURA et al., 2012). Já na região Serrana de SC, uma pesquisa determinou uma prevalência de 13,81% (70/507) (PADILHA et al., 2017).

Nesse surto o diagnóstico foi realizado através da epidemiologia, lesões histológicas caracterizadas por encefalite, miocardite e miosite mononuclear e detecção do agente por PCR. As lesões histológicas observadas em sete dos dez fetos analisados são indicativas da infecção por *N. caninum* e são compatíveis com lesões observadas em outros estudos (CORBELLINI et al., 2006; ANTONIASSI et al., 2013; ORLANDO et al., 2013).

A triagem sorológica é importante para complementar o diagnóstico de abortamento por *N. caninum* e também para auxiliar no controle do mesmo nos rebanhos (GUIDO et al., 2016; MCALLISTER 2016). Para isso, as técnicas sorológicas mais utilizadas são RIFI e ELISA (CAMILLO et al., 2010; MCALLISTER 2016; CERQUEIRA-CÉZAR et al., 2017). Neste trabalho utilizou-se as duas técnicas associadas em diferentes períodos, para o rastreamento sorológico. Para avaliar o nível de anticorpos específicos contra este patógeno no rebanho, indica-se no mínimo a avaliação de 10 animais entre os que apresentam distúrbios reprodutivos e os saudáveis (MCALLISTER 2016). Neste trabalho, a quantidade de amostras foi considerada correta na primeira análise por RIFI, e por ELISA todos os animais foram avaliados, podendo ter completa avaliação do rebanho, auxiliando no controle direto deste distúrbio na propriedade.

No presente surto a maioria dos abortos ocorreu entre o quarto e sexto mês de gestação. Estes achados são compatíveis com os descritos por Sager et al. (2001) que descreve maior frequência entre o quinto ao sétimo mês de gestação, assim como Orlando et al. (2013) entre o quinto e sexto. Entretanto, o aborto pode ocorrer em qualquer período da gestação (MCALLISTER 2016; CERQUEIRA-CÉZAR et al., 2017).

Houve associação entre idade, sorologia positiva e abortamento, sendo que vacas multíparas com mais de 3 anos foram as mais acometidas. Estudos de soroprevalência para *N. caninum* demonstram que fêmeas bovinas acima de 24 meses apresentam maior soropositividade, sugerindo que a idade é um importante fator associado (LORENZETT et al., 2016; MACEDO et al., 2017; PADILHA et al., 2017).

O contato direto entre cães e bovinos, em instalações ou pastagens desempenha importante papel na transmissão e manutenção do protozoário nos rebanhos. Lorenzetti et al. (2016) observaram que propriedades que possuem um cão ao invés de dois, possuíam menor probabilidade de transmitir *N. caninum* aos bovinos. No presente relato os cães da propriedade tinham contato com os bovinos, mas foram negativos na sorologia. Locatelli-Dittrich et al. (2008) não observaram associação entre o estado sorológico dos bovinos e a presença de cães soropositivos. Moura et al. (2012) avaliou a

soroprevalência em vacas de leite e cães e constatou que a presença de cães positivos não afetou a prevalência do agente nos bovinos.

Nas estratégias de controle foi observado que as principais mudanças instituídas foram o descarte de algumas das vacas com distúrbios reprodutivos e a eliminação de todos os cães da propriedade. São métodos eficazes no controle porque estão relacionados à interrupção do ciclo de transmissão do *N. caninum* (DUBEY, 2007). Todas as fêmeas filhas de vacas soropositivas continuaram para a reposição na propriedade, o que é contraindicado por favorecer a manutenção da infecção pelo protozoário no rebanho, visto que vacas soropositivas, mesmo que sem apresentar sinais clínicos, podem continuar sendo portadoras do agente (MCALLISTER, 2016). Além disso, houve mudanças na abordagem de coleta dos restos fetais e placentários, que é uma prática recomendada no controle de tal distúrbio reprodutivo (DUBEY, 2007; GUIDO et al., 2016).

Através deste estudo pode-se concluir que *N. caninum* é um importante agente causador de abortamento, levando a importantes perdas econômicas na produção leiteira e prejudicando a manutenção do plantel, indicando que surtos de abortos e fatores predisponentes devem ser melhor investigados. O acompanhamento anual evidenciou a perpetuação e manutenção do protozoário nos rebanhos, destacando a importância de medidas de controle eficazes. Além disso, foi essencial para avaliar os índices reprodutivos, possibilitando melhor observação das estratégias de controle instituídas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neospora caninum é o principal agente etiológico associado a causas de abortamento em bovinos no estado de Santa Catarina no presente estudo. Os tecidos mais frequentemente observados com lesões de neosporose foram encéfalo (encefalite necrotizante mononuclear), coração (miocardite mononuclear) e músculo esquelético (miosite mononuclear).

A associação entre histopatologia e PCR demonstrou concordância moderada como método de diagnóstico de neosporose em fetos bovinos abortados.

A soroprevalência de propriedades com diagnóstico etiológico definitivo de neosporose no estado de Santa Catarina é elevada.

Medidas de controle foram parcialmente efetivadas nas propriedades avaliadas, havendo mudanças na ocorrência de abortamentos e retorno ao cio dos rebanhos, o que destaca a importância do diagnóstico de neosporose em fetos bovinos abortados para a efetivação de medidas de controle nas propriedades.

Através deste estudo pode-se concluir que *N. caninum* é um importante agente causador de abortamento, levando a importantes perdas econômicas e produtivas. O acompanhamento da propriedade durante os anos é essencial para avaliar os índices reprodutivos, possibilitando melhor observação das estratégias de controle deste distúrbio.

O acompanhamento anual evidenciou a perpetuação e manutenção do protozoário nos rebanhos, destacando a importância de medidas de controle eficazes.

REFERÊNCIAS

- ALMERÍA, S., & LÓPEZ-GATIUS, F. Bovine neosporosis: Clinical and practical aspects. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n.2, p. 303–309, 2013.
- ALMERÍA, S., SERRANO-PÉREZ, B., & LÓPEZ-GATIUS, F. Immune response in bovine neosporosis: Protection or contribution to the pathogenesis of abortion. **Microbial Pathogenesis**, v. 109, p. 177–182, 2017.
- ANDERSON, M. L. et al. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 60 (Suppl 1), p. 417–431, 2000.
- ANDERSON, M. L. Infectious causes of bovine abortion during mid to late gestation. **Theriogenology**, v.68, p.474–486, 2007.
- ANDREOTTI, R. Neosporose: Um Possível Problema Reprodutivo Para o Rebanho Bovino. **Embrapa Gado de Corte**, Campo Grande – MS, 2001.
- ANDREOTTI, R. Diagnóstico e controle da neosporose em bovinos. **Documentos Embrapa gado de corte**. Campo Grande. v.136, p.51, 2003
- ANTONIASSI, N. A. B. et al. Causas de aborto bovino diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS de 2003 a 2011 1. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v. 33, n. 2, p. 155–160, 2013.
- BARROS, J. C. et al. Diagnóstico da perda econômica causada pela neosporose na reprodução de novilhas de corte. **48º Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural**. Campo Grande, 2010.
- BARTELS, C. J. M.; WOUDA W.; SCHUKKEN Y. H. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997). **Theriogenology**. v. 52, p. 247–257, 1999.
- BARLING, K. S. et al. Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 217 p.1356-1360. 2000.

- BERGERON, N. et al. Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from seropositive dams giving birth to full-term calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, p.173–175, 2001.
- BJERKAS, I. et al. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 1, p. 214–221, 1994.
- BJÖRKMAN C. et al. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 208, p.1441-1444, 1996.
- BUXTON, D.; MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 12, p. 546-552, 2002.
- CABRAL, A. D. et al. Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histology, immunohistochemistry, and nested-PCR. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 18, n. 4, p. 14-19, 2009.
- CANTÓN, G. J. et al. Inflammatory infiltration into placentas of *Neospora caninum* challenged cattle correlates with clinical outcome of pregnancy. **Veterinary research**, v. 45, p. 11, 2014.
- CAMILLO, G. et al. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos de leite do sudoeste do estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 6, p. 1511-1513, 2010.
- CARDOSO, J. M. S. et al. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on three dairy farms in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 3, p. 553–557, 2012.
- CASPE S. G. et al. The *Neospora caninum*-Spain 7 isolate induces placental damage, fetal death and abortion in cattle when inoculated in early gestation. **Veterinary Parasitology**, v. 189, n. 2, p.171-181, 2012.
- CERQUEIRA-CÉZAR, K. C. et al. All about neosporosis in Brazil. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, v. 26, n. 2, p. 253-279, 2017.
- CHI, J. et al. Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leucosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum*. **Preventive Veterinary Medical**, v. 55, p. 137-153, 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, p.572-578, 1993.

CORBELLINI, L. G. et al. Avaliação de um surto de aborto causado por *Neospora caninum* em uma propriedade leiteira no estado de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n.2, p.258-259, 2001.

CORBELLINI, L. G. et al. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, Southern Brazil, **Veterinary Parasitology**, v. 103, p. 195–202, 2002.

CORBELLINI, L. G. et al. Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection: Importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil. **Veterinary Journal**, v. 172, n. 1, p. 114–120, 2006.

CURI, N. H. A. et al. Risk factors for gastrointestinal parasite infections of dogs living around protected areas of the Atlantic Forest: implications for human and wildlife health. **Brazilian Journal of Biology**, v. 15, 2016.

CUTERI V., et al. Application of a new therapeutic protocol against *Neospora caninum*-induced abortion in cattle: A field study. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 4, p. 510–514, 2005.

DIJKSTRA, T.H. et al. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. **Veterinary Parasitology**, v.105, p.99-104, 2002.

DONAHOE, S. L. et al. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International journal for parasitology**, v. 4, p. 216-238, 2015.

DUBEY, J.P. et al. *Neospora caninum* associated myocarditis and encephalitis in an aborted calf. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 66–69, 1990.

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

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

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

DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean journal of parasitology**, v. 41, n. 1, p. 1–16, 2003.

DUBEY, J.P., BUXTON D, WOUDA W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134, n. 4, p. 267-289, 2006.

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, 2007.

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

ENTRICAN, G. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. **Journal of Comparative Pathology**, v.126, p.79-94, 2002.

FARIAS, N.A. Neosporose. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C.; LEMOS R.A.A. (Eds.) **Doenças de ruminantes e equídeos**. Pallotti, Santa Maria. 2v. p.678-690. 2007.

FÁVERO, J.F., et al. Risk factors for *Neospora caninum* infection in dairy cattle and their possible cause-effect relation for disease. **Microbial Pathogenesis**, v.110, p.202-207, 2017.

FEREIG, R. M. et al., Serological detection and epidemiology of *Neospora caninum* and *Cryptosporidium parvum* antibodies in cattle in southern Egypt. **Acta Tropica**, v. 162, p. 206–211, 2006.

FUCHS, N. et al. Differential expression of cell surface-and dense granule-associated *Neospora caninum* proteins in tachyzoites and bradyzoites. **Journal of Parasitology**, v.84, p.753-758, 1998.

GHANEM, M. E. et al. *Neospora caninum* and complex vertebral malformation as possible causes of bovine fetal mummification. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 50, n. 4, p. 389–392, 2009.

GIBNEY, E.H. et al. The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death. **International Journal Parasitology**, v. 38, n.5, p. 579-588, 2008.

GINDRI, P.C. et al. Seroprevalence estimate and associated risk factors for neosporosis in dairy cattle in the northwest region of Rio Grande do Sul State, Brazil. **Ciência Rural**, v.48, n. 07, 2018.

GONDIM, L.F.P. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.86, p.71-75, 2001.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 13, p. 133–150, 2013.

GUEDES, M. H. P. et al. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas e fetos provenientes de municípios do sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v.17, n. 4, p. 189-194, 2008.

GUIDO, S. et al. Serology-Based Diagnostics for the Control of Bovine Neosporosis. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 2, p. 131-143, 2016.

GUIMARÃES, J. S. J. et al. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.124, p.1-8, 2004.

HAERDI, C. et al. Humoral immune reaction of newborn calves congenitally infected with *Neospora caninum* and experimentally treated with toltrazuril. **Parasitology Research**, v. 99, p. 534–540, 2006.

HASLER, B. et al. Financial analysis of various strategies for the control of *Neospora caninum* in dairy cattle in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 77, p. 230–253, 2006.

HEIN, H. E. et al. Neosporose bovina: avaliação da transmissão vertical e fração atribuível de aborto em uma população de bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, p.396- 400, 2012.

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

IBGE. Pesquisa Pecuária Efetivos/Rebanhos - Santa Catarina 2017, Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/default.shtm>>.

- INNES, E. A. et al. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, v.18, p.8, 2002.
- ISOLA, J. et al. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. **American Journal of Pathology**, v. 145, n. 6, p. 1301-1308, 1994.
- KLAUCK, V. et al. Relation between *Neospora caninum* and abortion in dairy cows: Risk factors and pathogenesis of disease. **Microbial Pathogenesis**, v. 92, p. 46-49, 2016.
- KOYAMA, T. et al. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a pregnant sheep. **Journal of Parasitology**, v. 87, p.1486-1488, 2001.
- LIAO, M. et al. Development of rapid immunochromatographic test with recombinant NcSAG1 for detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 12, p. 885-887, 2005.
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; BARR, B. C. Neosporosis: its prevalence and economic impact. **Veterinary Exchange, Supplement to Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 20, p. 1-6, 1998.
- LINDSAY, D. S.; UPTON, S. J.; DUBEY, J. P. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1521-1523, 1999.
- LOCATELLI-DITTRICH, R. et al. Determinação e correlação de anticorpos anti- neospora caninum em bovinos e cães do paraná , brasil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 17 (suppl 1), p. 191–195, 2008.
- LOPEZ-GATIUS, F. et al. Relationship between rainfall and *Neospora caninum*-associated abortion in two dairy herds in a dry environment. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 52, p. 147–152, 2005.
- LORENZETT, M. P. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros no estado de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 38, n. 3, p. 243–249, 2016.

MACALDOWIE, C. Placental Pathology Associated with Fetal Death in Cattle Inoculated with *Neospora caninum* by Two Different Routes in Early Pregnancy. **Journal of Comparative Pathology**, v.131, n. 2-3, p. 142–156, 2004.

MACEDO, C. A. B. et al. Occurrence of abortions induced by *Neospora caninum* in dairy cattle from Santa Catarina, southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 3, p.292-298, 2017.

MALAGUTI, J. M. A. et al., *Neospora caninum* como agente causal de encefalite bovina no Brasil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 48-54, 2012.

MANN T. R. et al. Canine cutaneous neosporosis. **Brazilian Veterinary Dermatology**, v. 27, n. 3, p. 195-197, 2016.

MASATANI, T. et al. Seroprevalence of *Cryptosporidium parvum* and *Neospora caninum* in cattle in the southern Kyushu region of Japan, **Parasitology International**, v. 63, p. 763–767, 2018.

MEERSCHMAN, F. et al. Fetal infection with *Neospora caninum* in dairy and beef cattle in Belgium. **Theriogenology**. v. 58, n. 5, p. 933-945, 2002.

MELLO, R.C. et al., Levantamento epidemiológico de *Neospora caninum* em bovinos de assentamentos rurais em Corumbá, MS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17(Supl 1), p. 311-316, 2008.

MESQUITA, L. P. et al. 2018. Placental lesions associated with abortion and stillbirth in goats naturally infected by *Neospora caninum*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 444-449, 2018.

MCALLISTER, M.M. et al. Rapid communication dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.1473-1478, 1998.

MCALLISTER, M. M. Diagnosis and Control of Bovine Neosporosis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 32, n. 2, p. 443-463, 2016.

MINERVINO, A. H. H. et al. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle from Santarém, Pará, Brazil. **Research Veterinary Science**, v.84, p.254-256, 2008.

MORAVEJI, M. et al. Development of latex agglutination test with recombinant NcSAG1 for the rapid detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 189, p. 211–217, 2012.

MOURA, A. B. et al. *Neospora caninum* antibodies in dairy cattle of Lages Municipality, Santa Catarina State, Brazil. **Arquivos de Medicina Veterinária**, v. 44, p.117-122, 2012.

MULLER, N. et al. Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* Infection by PCR and DNA Hybridization Immunoassay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 11, p. 2850–2852, 1996.

MUNHOZ, A.D. 2004. Distribuição da infecção por *Neospora caninum* em rebanhos bovinos dos municípios de Rio Claro e Resende, estado do Rio de Janeiro. **Tese de doutorado**, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 98p.

NIETFELD, J. C. et al. *Neospora*-like protozoan infection as a cause of abortion in dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** v. 4, p. 223–226, 1992.

OGAWA, L., et al. Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, p. 312-316, 2005.

OLIMPIO, F. F. Estudo Bibliográfico Sobre a Neosporose Bovina. **Trabalho monográfico de conclusão do curso**, Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, 2011.

ORLANDO, D. R. et al. Abortos por *Neospora caninum* em bovinos do sul de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 11, p. 1332–1338, 2013.

PADILHA, M. A. C. et al. *Neospora caninum*: Seroprevalence in beef cattle in the mountainous region of Santa Catarina, Brazil. **Semina Ciências Agrárias**, v. 38, p. 273, 2017.

PARÉ, J.; HIETALA, S. K.; THURMOND, M. C. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, p. 273-275, 1995.

PARÉ, J. et al. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, n. 11, p. 1595-1598, 1998.

- PESCADOR, C. A. et al. Histopathological and immunohistochemical aspects of *Neospora caninum* diagnosis in bovine aborted fetuses. **Veterinary parasitology**, v. 150, p. 159–163, 2007.
- RAGOZO, A. M. A. R. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis estados brasileiros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.1, p.33-37, 2003.
- REICHEL, M. P. et al. *Neospora caninum* infection in Australia and New Zealand. **Australian Veterinary Journal**, v. 78, p. 258-261, 2000.
- REICHEL, M. P. et al. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – The billion dollar question. **International Journal for Parasitology**, v. 43, p. 133–142, 2013.
- RINALDI, L. et al. *Neospora caninum* in pastured cattle: determination of climatic, environmental, farm management and individual animal risk factors using remote sensing and geographical information systems. **Veterinary Parasitology**, v. 128, n. 3, p. 219-230, 2005.
- ROBERTSON, I. D. et al. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.1369-1377, 2000.
- ROMAND, S. et al. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. **Parasitology Research**, v. 84, p. 50–53, 1998.
- SAGER, H. et al. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. **Veterinary Parasitology** v. 102, p. 1-15. 2001.
- SÁNCHEZ, R. et al. Treatment of Toxoplasmosis and Neosporosis in Farm Ruminants: State of Knowledge and Future Trends. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 15, p. 1304-1323, 2018.
- SANTOS, A.P. et al. *Neospora caninum* in dairy cattle in Paraná State, Brazil: histological and immunohistochemical analysis in fetuses. **Semina Ciências Agrárias**, v. 26, n.4, p. 559-562, 2005.
- SANTOS, O.V.; MARCONDES, T.; CORDEIRO, J.L.F. **Estudo da cadeia do leite em Santa Catarina, prospecção e demandas (versão preliminar)**. Florianópolis, Epagri/Cepa, 2006.

SANTOS, D. S. et al. *Neospora caninum* in bovine fetuses of Minas Gerais, Brazil: genetic characteristics of rDNA. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 4, p. 281-288, 2011.

SNAK, A. et al. *Neospora caninum* in properties in the west region of Paraná, Brazil: prevalence and risk factors. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 1, p. 51-59, 2018.

SYED-HUSSAIN, 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, p. 141–144, 2015.

TEIXEIRA, W. C. et al. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* (Apicomplexa: Sarcocystidae) em bovinos leiteiros de propriedades rurais em três microrregiões no estado do Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, p.729-734, 2010.

UGA, S. et al. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection and pattern of oocyst shedding in calves in Japan, **Veterinary Parasitology**, v. 94, p. 27–32, 2000.

VANLEEUEWEN, J. A. et al. Risk factors associated with *Neospora caninum* seropositivity in randomly sampled Canadian dairy cows and herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v.93, p.129–138, 2010.

VOGEL, F. S. F.; ARENHART, S.; BAUERMAN, F. V. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e bubalinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p.1948-1951, 2006.

WEBER, M. N. et al. High frequency of bovine viral diarrhea virus type 2 in Southern Brazil. **Virus Research**, v.191, p.117-24, 2014.

WHITE, I. R. et al. Real-time ultrasonicscanning in the diagnosis of pregnancy and the estimation of gestational-age in cattle. **Veterinary Record**, v.117, n. 1, p. 5-8, 1985.

WILSON, D. J. et al. *Neospora caninum* is the leading cause of bovine fetal loss in British Columbia, Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 218, p.46–51, 2016.

WOUDA, W. et al. Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical

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

WOUDA, W. et al. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. **International Journal of Parasitology**, v. 29, p.1677-1682, 1999.

ZANATTO, D. C. Z. et al. *Coxiella burnetii* associada ao BVDV (Vírus da Diarreia Viral Bovina), BoHV (Vírus do Herpes Bovino), *Leptospira* spp., *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma vivax* em distúrbios reprodutivos em bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 28, n. 2, p. 245-257, 2019.

ANEXO 1
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Eu, _____ declaro que concordo em participar como colaborador no fornecimento de animais para as atividades previstas no projeto “**Perfil sorológico anti-*Neospora caninum* em ruminantes e acompanhamento das estratégias de controle em propriedades com diagnóstico de Neosporose**”. Afirmo que fui informado (a) de maneira clara e detalhada sobre os objetivos e metodologia do projeto proposto e esclareci minhas dúvidas, estando ciente que a qualquer momento, poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão sobre esta colaboração, se assim o desejar. Neste termo, fica acordado que: todos os dados deste projeto serão tornados de meu conhecimento: minha participação não acarretará em custos além do fornecimento de animais na condição supracitada, e que não receberei nenhuma compensação financeira em caso de haver óbito, invalidez temporária ou permanente do(s) animal(ais) em estudo, seja por parte da professora responsável, do grupo de pesquisa a que pertence ou da própria Universidade de Estado de Santa Catarina. Também estou ciente que será necessário a coleta de sangue por venopunção dos animais cedidos. Assim sendo, declaro que concordo em participar desse projeto permitindo que meus animais sejam utilizados, conforme quantidade e características descritas a seguir:

Espécie: *Bos taurus taurus/Bos taurus indicus*
Finalidade: Bovinocultura/ovinocultura de leite e corte
Idade: entre 1 mês e 20 anos.
Quantidade: Variável de acordo com a disponibilidade.

Local:

Data:

Nome: _____

Assinatura do Participante: _____

Nome: Renata Assis Casagrande

Assinatura do Pesquisador: _____



Neosporose como causa de abortamento em ruminantes no estado de Santa Catarina

Responsável: Leonardo Silva da Costa.

Orientador: Prof^a Renata Assis Casagrande.

Programa de pós-graduação em Ciência Animal (PPGCA- CAV/UDESC).

CÓDIGO DE IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE: _____

Localização: _____

O respondente é o proprietário?

não; **caso não, qual a sua relação com o proprietário?**

Família Funcionário

sim

QUAL o maior problema sanitário na sua propriedade?

Problema de casco Tristeza Parasitária/ Carrapato

Mastite Problema respiratório

Problema reprodutivo Problema digestivo

Outro: _____ Não aplicável

Características gerais da propriedade

1.0 Qual a área total da propriedade? (hectares) _____

1.1 Qual a área **aproximada utilizada na criação** de bovinos? _____

1.2 Qual é o tamanho total do plantel de bovinos _____

1.3 Quantas vacas estão secas (fora de produção) no momento? _____

1.4 Quantas vacas estão em lactação no momento? _____

1.5 Quantas vacas em lactação são:

_____ Primíparas (vacas de primeira cria);

_____ Multíparas.

1.6 Possui quantas bezerras/novilhas para reposição _____

2.0 Quantas pessoas trabalham diretamente com os bovinos? _____

3

4.0 Há quanto tempo está na pecuária de leite nesta propriedade?

_____ anos e $\frac{1}{2}$ < marcar X se metade de ano completo

5.1 O/A Sr. (a) possui assistência profissional de Médico Veterinário?

não

sim; **caso sim, Com que frequência?**

Anual Semestral Mensal Só quando solicitado

5.2 O/A Sr. (a) possui assistência profissional de Técnico agrícola?

não

sim; sim; **caso sim, Com que frequência?**

Anual Semestral Mensal Só quando solicitado

5.3 Além da bovinocultura de leite, há alguma outra atividade

sim não

Suinocultura Avicultura Agricultura Outra _____

Biosseguridade

6.0 O/a Sr.(a) já levou bovinos para eventos de aglomeração nos últimos 5 anos (exposição, feira, leilão)?

não

sim; **caso sim, Quantos eventos por ano?** _____

7.0 Qual a **origem** dos animais do seu rebanho?

Somente reposição própria

Somente compra e/ou troca

Mista (reposição própria e compra/troca)

7.1 Em caso de reposição própria, o senhor tem observado casos de aborto em novilhas primíparas?

Sim Não Não soube informar

7.2 Essas primíparas que abortaram são filhas de mães com histórico de aborto?

Sim Não Não soube informar

8.0 Quanto aos bovinos que entram na propriedade (compra/troca), eles são **isolados** antes de serem introduzidos no rebanho?

não; **caso não, pule para Q. 9.0**

sim

8.1 Quanto tempo de isolamento?

menos de 30 dias

31–60 dias

mais de 61 dias

Manejo reprodutivo

9.0 O/A Sr. (a) realiza a prática de Inseminação Artificial nos bovinos?

não; **apenas touro; caso não pule para a Q. 10**

sim

9.1 Quem executa a Inseminação Artificial?

Proprietário/ Funcionário da propriedade

Funcionário da Prefeitura/Estado

Funcionário da Cooperativa

Funcionário de Empresa Terceirizada

9.2 Quantas doses de sêmen utiliza por prenhez _____

10.0 O/a Sr.(a) utiliza repasse com touro (monta Natural)?

não; **apenas com inseminação; caso não pule para a Q.11**

sim

10.1 **Caso sim**, o/a Sr.(a) utilizou o **touro de onde?**

Nascido na propriedade

Comprado

Emprestado

11.0 O/A Sr. (a) realiza a prática de palpação retal como rotina para diagnóstico de gestação/prenhez nos bovinos?

não

sim

11.1 Quando é feito diagnóstico de prenhez e/ou inseminação artificial nos bovinos, costuma-se utilizar **a mesma luva em mais de um animal?**

não

sim

não aplicável

12.0 A propriedade possui piquetes maternidade?

Não

Sim

12.1 Após o parto, **quando** os terneiros são separados da mãe?

ANEXO 2 (Continuação)

- () Imediatamente (sem mamar)
 () Após a primeira mamada mas não mais que 24 horas após o parto
 () Mais que 24 horas. Quantos dias _____

13.0 Possui banco de colostro/mistura de leite de **mais de uma vaca**, para ser fornecido aos terneiros?
 () não () sim

14.0 Nos últimos anos o/a Sr.(a) observou **nascimentos de terneiros fracos**?
 () não
 () **sim; caso sim, Quantos aproximadamente?**(_____)
Quantos morreram?(_____)

15.0 Nos últimos anos houve aumento da ocorrência* de retorno ao cio nos bovinos (que tenha fugido da normalidade)?
 () não () sim

15.1 Nos últimos anos houve aumento da ocorrência* de aborto** nos bovinos (que tenha fugido da normalidade)?
 () **não; caso não, pule para a Q. 17**
 () sim

* **Aumento do número de casos em relação ao período anterior (chamou atenção)**

** **Fetos bovinos abortados observados a campo ou no estábulo**

15.2 Em que **época** do ano ocorre a maior incidência de abortos?
 () Verão () Inverno
 () Outono () Primavera
 () Não há diferença entre as estações

15.3 Em que fase da gestação ocorre a maior incidência de abortos?
 () 1º Trimestre () 3º Trimestre
 () 2º Trimestre () Todas as fases

15.4 Em casos de aborto na propriedade, qual o destino dos restos fetais?
 () Enterrados; () Fornecidas aos cães como alimentação;
 () Incinerados; () Compostagem.
 () Decompõem no ambiente;

15.5 Cães da sua propriedade ou propriedades vizinhas podem ter acesso aos produtos de aborto (feto, bezerro ou placenta)?
 () Não () Sim

Condições sanitárias

16.0 Nos últimos anos o/a Sr.(a) adotou alguma das seguintes **vacinas** nos bovinos?
 () sim () não realiza vacinação
 CattleMaster () não () sim
 FertiGuard Selenium Max () não () sim
 PoliGuard () não () sim
 Hertape Calier () não () sim
 Supravac 10 () não () sim
 Outro _____

17.0 Número de cães?(_____) **17.1** Número de gatos?(_____)

17.1 O/A Sr. (a) solta os cães em algum momento do dia ou noite?
 () não () sim

17.2 Cães têm acesso ao mesmo ambiente dos bovinos?
 () não
 () **sim; caso sim, Quais?** () Cochos e bebedouros
 () pastagens () Instalações de ordenha

17.3 Cães de propriedades vizinhas tem acesso ao mesmo ambiente dos bovinos?
 () não () sim

18.0 Nos últimos anos o/a Sr.(a) observou a presença de animais Silvestres na propriedade?
 () **não; caso não, pule para a Q. 19** () sim

18.1 Quais animais listados a seguir foram observados na propriedade e/ou redondezas?

Roedores (capivara, rato do banhado, ouriço)

() Nunca () Às vezes () Sempre

Cachorro do mato/Graxaim/Raposinha/Sorro

() Nunca () Às vezes () Sempre
Javali/Java-porco

() Nunca () Às vezes () Sempre
Veados

() Nunca () Às vezes () Sempre
Gambá

() Nunca () Às vezes () Sempre
 Outros? _____

Manejo/ instalações

19.0 Como é o sistema de produção leiteira em sua propriedade?
 () Confinado; () À pasto.
 () Semi-confinado;

20.0 Seus bovinos têm possibilidade de contato **físico*** com os animais dos vizinhos?

* **Contato físico quer dizer: contato focinho-focinho ou espirro/contato/lambidas um com o outro, incluindo através da cerca.**

() não
 () **sim; caso sim, com Quantos vizinhos?** _____

21.0 O/A Sr.(a) divide os bovinos por idade (**categoria** animal) em piquetes diferentes?
 () não
 () sim

21.1 No que consiste a alimentação fornecida aos animais?

() Pastagem de inverno Qual _____
 () Pastagem de verão Qual _____
 () Gramíneas perenes Qual _____
 () Suplementação com concentrado (ração) e silagem
 () Suplementação com sal mineral

21.2 O Sr. tem observado plantas tóxicas nos piquetes frequentados pelos bovinos?

() Sim Quais são as plantas _____
 () Não soube informar
 () Não

22.0 Como é feita a ordenha?

() Manual
 () Ordenhadeira tipo balde ao pé
 () Ordenhadeira mecânica canalizada

23.0 O/A Sr.(a) mantem **registros** de nascimentos/ mortalidade e de práticas de manejo em geral*?

() não
 () sim
 Sanitário, nutricional, reprodutivo, economico

* **Inseminações, vacinações, tratamentos, descornas, cirurgias, etc.**

Aplicação de medicamentos e controle de resíduos

24.0 Quando o/a Sr.(a) aplica um medicamento injetável ou vacina nos bovinos, costuma utilizar **a mesma agulha em mais de um animal**?

() não
 () sim
 () não aplicável

25.0 Quem **aplica** medicamentos nos animais?

() Funcionários de lojas agropecuárias
 () Médico veterinário () Técnico agrícola
 () Leigos (vizinhos, amigos) () O próprio produtor

26.0 O/A Sr.(a) é remunerado de acordo com a qualidade* do leite?
 () não
 () sim () qual

* **Parâmetros nutritivos (ex.: gordura) e sanitários (ex.: CCS e contagem bacteriana)**

Observações:

Identificação Funcional

Data da aplicação: ____/____/____

