

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

JÉSSICA ALINE WITHOEFT

**ABORTAMENTOS OVINOS POR *Toxoplasma gondii* E *Neospora caninum* NO
ESTADO DE SANTA CATARINA: caracterização anatomopatológica, molecular e
epidemiológica**

LAGES

2021

JÉSSICA ALINE WITHOEFT

ABORTAMENTOS OVINOS POR *Toxoplasma gondii* E *Neospora caninum* NO ESTADO DE SANTA CATARINA: caracterização anatomopatológica, molecular e epidemiológica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, com área de concentração em Saúde Animal.

Orientadora: Prof^a Dra. Renata Assis Casagrande

LAGES

2021

Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAVI/UEDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Withoef, Jéssica Aline

Abortamentos ovinos por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* no estado de Santa Catarina : Caracterização anatomopatológica, molecular e epidemiológica / Jéssica Aline Withoef. -- 2021.

96 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, 2021.

1. Patologia. 2. Ovinocultura. 3. Perda reprodutiva. 4. Malformação. I. Casagrande, Renata Assis. II. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

JÉSSICA ALINE WITHOEFT

**ABORTAMENTOS OVINOS POR *Toxoplasma gondii* E *Neospora caninum*
NO ESTADO DE SANTA CATARINA: caracterização anatomopatológica,
molecular e epidemiológica**

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 obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Banca examinadora:

Renata Assis Casagrande

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

Membros:

David Driemeier

Prof. Dr. David Driemeier
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Caroline Argenta Pescador

Profa. Dra. Caroline Argenta Pescador
Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT)

Lages, 26 de fevereiro de 2021

Dedico este trabalho a minha mãe, Jandira Withoeft, que sempre tomou para si parte da minha luta, e é a razão pela qual busco ser uma pessoa melhor a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder a bênção de poder acordar todos os dias com saúde, especialmente em um ano tão desafiador como 2020, para poder iniciar e concluir esta etapa da minha vida. Agradeço à minha mãe, Jandira Withoeft, que sempre se doou ao máximo para que eu pudesse ir em busca da realização dos meus sonhos, e meus agradecimentos também à toda minha família, pelo apoio em todas as decisões tomadas. Agradeço por toda a orientação da Prof. Dra. Renata Assis Casagrande, que me trouxe aprendizados imensuráveis ao longo destes anos. Agradeço, também, a todos os produtores e médicos veterinários que possibilitaram a realização deste estudo, permitindo que buscássemos a resolução de seus problemas.

Ao meu amigo-irmão, Leonardo Silva da Costa, não tenho palavras para agradecer por todo amparo e parceria nestes anos, seja em casa, no nosso dia-a-dia, ou no laboratório, para condução de nossos projetos. Obrigada por ser o meu alicerce agora mesmo à distância, com certeza você é um dos principais incentivos para que eu pudesse chegar até aqui. Aos meus amigos Lucas Marian e Sara Elis Schmitt, agradeço imensamente pela amizade indescritível e parceria essencial para nos mantermos fortes com o apoio um do outro.

Agradeço à equipe do Grupo de Patologia Veterinária (GPV-CAV/UDESC), por todo apoio na realização do projeto, a todos pós-graduandos, bolsistas e estagiários, especialmente ao João Vitor Bilicki e Isadora Cristina Melo que auxiliaram na coleta de materiais deste projeto. Meus agradecimentos às equipes parceiras, do Laboratório de Doenças Parasitárias e Parasitologia Veterinária (CAV/UDESC), do Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores (CAV/UDESC), do Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA-CAV/UDESC), do Laboratório de Virologia Favet/UFRGS e do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (Universidade de São Paulo-USP).

Agradeço, também, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por todo amparo financeiro através da concessão da bolsa e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pelo investimento financeiro que permitiu a realização das análises (Edital FAPESC 05/2018 - Nº: 2019TR702).

RESUMO

A toxoplasmose é a doença infecciosa mais relatada como causa de abortamentos em ovinos, enquanto a neosporose ganha importância crescente como causadora de transtornos reprodutivos nesta espécie. O objetivo deste trabalho é avaliar suas ocorrências em ovinos de Santa Catarina através de análise anatomopatológica, molecular e epidemiológica das propriedades positivas. O trabalho traz, também, o primeiro relato de um caso de hidrocefalia e microcefalia em um feto ovino infectado por *Neospora caninum*. Foram necropsiados 49 fetos ovinos entre outubro de 2015 e outubro de 2020, com colheita de órgãos para histopatologia, cultivo microbiológico, e reação em cadeia da polimerase (PCR) para *N. caninum* e *Toxoplasma gondii*, utilizando como alvos, respectivamente, as sequências Nc5 e SAG2 em tecido encefálico. Houve aplicação de inquérito nas propriedades positivas para sua caracterização e avaliação das estratégias de controle. Foram diagnosticados dez casos de neosporose (35,71%) e oito de toxoplasmose (28,57%). Macroscopicamente, para os casos de neosporose, houve mumificação e maceração fetal, e, para toxoplasmose, maceração fetal, prognatismo e atresia vaginal. As lesões histopatológicas em casos de neosporose foram encefalite necrotizante linfoplasmocitária multifocal (10% - 1/10), gliose multifocal (20% - 2/10), miosite linfoplasmocitária multifocal (60% - 6/10), miocardite linfoplasmocitária multifocal (50% - 5/10) e placentite linfoplasmocitária multifocal (10% - 1/10). Para toxoplasmose, foram encefalite necrotizante linfoplasmocitária multifocal (50% - 4/8), gliose multifocal (12,5% - 1/8), miocardite linfoplasmocitária multifocal (37,5% - 3/8) e miosite linfoplasmocitária multifocal (25% - 2/8). Na PCR de encéfalo, houve detecção de *N. caninum* em cinco casos (50%) e de *T. gondii* em quatro (50%). As propriedades com diagnóstico de neosporose possuíam acesso livre de cães às instalações e pastagens dos animais, bem como os casos de toxoplasmose, que possuíam livre acesso de felinos. Havia descarte incorreto de restos fetais e placentários, permitindo a ingestão por cães ou felinos. Quanto às estratégias de controle, houve o descarte de ovinos que haviam abortado no ano anterior, e em algumas propriedades passou-se a descartar corretamente lóquios fetais. O segundo trabalho traz o relato de um caso de um feto ovino com hidrocefalia não-comunicante e microcefalia infectado por *N. caninum*. Macroscopicamente havia achatamento e estreitamento moderado do crânio. A porção dos hemisférios cerebrais media apenas 3,5x3,5x0,5cm, com achatamento difuso acentuado dos giros cerebrais. Ao corte, havia dilatação difusa dos ventrículos laterais. Histologicamente, observou-se encefalite necrotizante linfoplasmocitária focal no assoalho do ventrículo lateral, além de gliose multifocal discreta e miosite linfoplasmocitária multifocal discreta, com detecção de *N. caninum* através de PCR do líquido cefalorraquidiano. Como conclusões, demonstra-se a ocorrência de neosporose e toxoplasmose como causa de abortamento em ovinos no estado de Santa Catarina. A associação entre a análise histopatológica e molecular foi essencial para seus diagnósticos, permitindo diferenciá-las entre si, e os tecidos fetais com mais lesões histopatológicas foram músculo esquelético, coração e encéfalo. O trabalho sugere que *N. caninum* possui possível potencial teratogênico também na espécie ovina, assim como *T. gondii*.

Palavras-chave: Patologia. Ovinocultura. Perda reprodutiva. Malformação.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is the most reported infectious disease causing abortions in sheep, while neosporosis gains increasing importance as a cause of reproductive disorders in this species. The objective of this study is to evaluate its occurrences in ovine flocks in the state of Santa Catarina through anatomopathological, molecular, and epidemiological analysis of positive farms. The study also brings the first report of a case of hydrocephalus and microcephaly in a sheep fetus infected with *Neospora caninum*. Between October 2015 and October 2020, 49 ovine fetuses were necropsied, with organ samples collected for histopathology, microbiological culture, polymerase chain reaction (PCR) for *N. caninum* and *Toxoplasma gondii*, using the Nc5 and SAG2 sequences, respectively, as targets in brain tissue. A survey was applied to the positive farms for their characterization and evaluation of control strategies. Ten cases of neosporosis (35.71%) and eight of toxoplasmosis (28.57%) were diagnosed. Macroscopically, for neosporosis cases there was fetal mummification and maceration, and for toxoplasmosis, fetal maceration, prognathism, and vaginal atresia. Histopathological lesions in cases of neosporosis were multifocal lymphoplasmacytic necrotizing encephalitis (10% - 1/10), multifocal gliosis (20% - 2/10), multifocal lymphoplasmacytic myositis (60% - 6/10), multifocal lymphoplasmacytic myocarditis (50% - 5/10) and multifocal lymphoplasmacytic placentitis (10% - 1/10). For toxoplasmosis, there was multifocal lymphoplasmacytic necrotizing encephalitis (50% - 4/8), multifocal gliosis (12.5% - 1/8), multifocal lymphoplasmacytic myocarditis (37.5% - 3/8), and multifocal lymphoplasmacytic myositis (25% - 2/8). In brain PCR, *N. caninum* was detected in five cases (50%) and *T. gondii* in four (50%). The farms diagnosed with neosporosis had free access for dogs to the ovine installations and pastures, as well as the cases of toxoplasmosis, which had free access for cats. There was incorrect disposal of fetal and placental remains, allowing ingestion by dogs or cats. As for the control strategies, there was the disposal of sheep that had aborted in the previous year, and in some properties, the fetal loci were correctly discarded. The second study reports a case of a sheep fetus with non-communicating hydrocephalus and microcephaly infected with *N. caninum*. Macroscopically, there was flattening and moderate narrowing of the skull. The portion of the cerebral hemispheres measured only 3.5x3.5x0.5cm, with marked diffuse flattening of the brain giry. There was diffuse dilatation of the lateral ventricles. Histologically, focal lymphoplasmacytic necrotizing encephalitis was observed on the floor of the lateral ventricle, in addition to discrete multifocal gliosis and discrete multifocal lymphoplasmacytic myositis, with detection of *N. caninum* by cerebrospinal fluid PCR. In conclusion, it is demonstrated the occurrence of neosporosis and toxoplasmosis as a cause of abortion in sheep in the state of Santa Catarina. The association between histopathological and molecular analysis was essential for their diagnoses, allowing them to be differentiated, and the fetal tissues with more histopathological lesions were skeletal muscle, heart, and brain. The work suggests that *N. caninum* has a possible teratogenic potential also in sheep, as well as *T. gondii*.

Keywords: Pathology. Sheep farming. Reproductive loss. Malformation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Representação do ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*. 19
- Figura 2.** Representação do ciclo biológico de *Neospora caninum*. 28
- Figura 3.** Distribuição de municípios que enviaram fetos ovinos para o LAPA CAV/UDESC entre outubro de 2015 e outubro de 2020, com respectiva quantidade de casos por local. 42
- Figura 4.** Fetos da espécie ovina, gestação gemelar. Maceração, à esquerda, e mumificação fetal, à direita, em abortamento ocasionado por *Neospora caninum*. 43
- Figura 5.** Neosporose como causa de abortamentos em ovinos do estado de Santa Catarina. **A) Encéfalo:** encefalite necrotizante linfoplasmocitária focal discreta (seta). Obj. 10x. **B) Encéfalo:** mineralização multifocal moderada, predominantemente de vasos sanguíneos (seta). Obj. 10x. **No detalhe:** mineralização em maior aumento. Obj. 40x. **C) Músculo esquelético:** miosite linfoplasmocitária multifocal discreta (setas). Obj. 10x. **D) Coração:** miocardite linfoplasmocitária multifocal discreta (seta) acompanhada por hemorragia focal discreta (estrela). Obj. 10x. Hematoxilina e Eosina. 44
- Figura 6.** Caracterização de propriedade de ovinos com transtornos reprodutivos associados a infecção por *Neospora caninum* (Caso 2 – município de Pouso Redondo/SC). Livre acesso de cães às pastagens dos ovinos. 47
- Figura 7.** Feto ovino, fêmea, pertencente a uma propriedade com abortamentos por *Toxoplasma gondii* (Caso 2). Prognatismo (seta). No detalhe: rebatimento de pele evidenciando o prognatismo. 49
- Figura 8.** Toxoplasmose como causa de abortamentos em ovinos do estado de Santa Catarina. **A) Encéfalo:** encefalite necrotizante (estrela) focal acentuada, circundada por infiltrado linfoplasmocitário (seta). Obj. 10x. **B) Encéfalo:** encefalite necrotizante acompanhada por mineralização (cabeça de seta) focal acentuada, circundada por infiltrado linfoplasmocitário (seta). Obj. 10x. **C) Coração:** miocardite linfoplasmocitária focal discreta (seta) acompanhada por necrose de cardiomiócitos focal discreta (estrela). Obj. de 10x. **D) Músculo esquelético:** miosite linfoplasmocitária multifocal moderada (seta). Obj. 10x. Hematoxilina e Eosina. 50
- Figura 9.** Feto ovino, macho, raça Crioula, com microcefalia e hidrocefalia secundários a infecção por *Neospora caninum*. **A)** achatamento e estreitamento moderado da calota craniana (seta). **B)** abertura da calota craniana, com acentuada diminuição de telencéfalo (seta). **C)** vista lateral do encéfalo, demonstrando acentuado achatamento dos giros cerebrais e da massa telencefálica. **D)** córtex frontal do encéfalo, com acentuada dilatação dos ventrículos laterais (seta). 66

Figura 10. Feto ovino, macho, raça Crioula, com microcefalia e hidrocefalia secundários a infecção por *Neospora caninum*. **Encéfalo:** encefalite necrotizante linfoplasmocitária focal discreta, localizada no córtex cerebral, a nível do assoalho dos ventrículos laterais (seta). Obj. 10x. **No detalhe:** lesão em maior aumento. Obj. 40x. Hematoxilina e Eosina.68

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Idades gestacionais de fetos ovinos necropsiados pelo LAPA-CAV/UDESC ou enviados para análise entre outubro de 2015 e outubro de 2020, determinadas através da mensuração do comprimento crânio-coccígeo...41
- Tabela 2.** Distribuição individual dos abortamentos ovinos ocasionados por *Neospora caninum* diagnosticados pelo LAPA-CAV/UDESC entre outubro de 2015 e outubro de 2020, com respectivas alterações histopatológicas e resultados de análise molecular.....45
- Tabela 3.** Caracterização de propriedades voltadas para ovinocultura com transtornos reprodutivos associados a infecção por *Neospora caninum* diagnosticados pelo LAPA-CAV/UDESC entre outubro de 2015 e outubro de 2020 através de análise histopatológica e molecular de fetos ovinos abortados.46
- Tabela 4.** Distribuição individual dos abortamentos ovinos ocasionados por *Toxoplasma gondii* diagnosticados pelo LAPA-CAV/UDESC entre outubro de 2015 e outubro de 2020, com respectivas alterações histopatológicas e resultados de análise molecular.51
- Tabela 5.** Caracterização de propriedades voltadas para ovinocultura com transtornos reprodutivos associados a infecção por *Toxoplasma gondii* diagnosticados pelo LAPA-CAV/UDESC entre outubro de 2015 e outubro de 2020 através de análise histopatológica e molecular de fetos ovinos abortados.52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 <i>Toxoplasma gondii</i> em ovinos	16
3.1.1 HISTÓRICO	16
3.1.2 CICLO BIOLÓGICO	17
3.1.3 PATOGENIA	19
3.1.4 EPIDEMIOLOGIA.....	21
3.1.5 DIAGNÓSTICO	23
3.1.6 CONTROLE E PREVENÇÃO	24
3.2 <i>Neospora caninum</i> em ovinos	26
3.2.1 HISTÓRICO	26
3.2.2 CICLO BIOLÓGICO	27
3.2.3 PATOGENIA	29
3.2.4 EPIDEMIOLOGIA.....	30
3.2.5 DIAGNÓSTICO	31
3.2.6 CONTROLE E PREVENÇÃO	33
4 Neosporose e Toxoplasmose como causas de abortamento em ovinos do estado de Santa Catarina, Brasil: aspectos anatomopatológicos, moleculares e epidemiológicos	34
4.1 INTRODUÇÃO	36
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.2.1 Necropsia e coleta de materiais	37
4.2.2 Análise histopatológica	38
4.2.3 Análise microbiológica	38
4.2.4 Análise molecular para <i>T. gondii</i>	39
4.2.5 Análise molecular para <i>N. caninum</i>	39
4.2.6 Visita técnica às propriedades positivas	40
4.3 RESULTADOS	40
4.3.1 Caracterização e origem dos fetos ovinos	40
4.3.2 Diagnósticos das causas de abortamento em fetos ovinos	42

4.3.2.1 Neosporose	42
4.3.2.2 Toxoplasmose.....	48
4.4 DISCUSSÃO	53
4.5 CONCLUSÕES	61
5 Microcefalia e hidrocefalia em um feto ovino com infecção por <i>Neospora caninum</i>.....	62
5.1 INTRODUÇÃO	64
5.2 RELATO DE CASO.....	65
5.3 DISCUSSÃO	68
5.4 CONCLUSÃO	73
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
7. REFERÊNCIAS.....	75
8. APÊNDICE I.....	905

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura no Brasil é constituída por um rebanho de aproximadamente 18,9 milhões de cabeças, e a região Sul possui participação de 21,2%, superada apenas pelo Nordeste, que representa 66,7% da produção total. O estado de Santa Catarina, em 2018, demonstrou crescimento de 2,8% do efetivo em relação ao ano anterior, totalizando cerca de 266 mil animais (FILHO et al., 2019). A versatilidade e a boa adaptabilidade da espécie ovina permite a sua criação nos mais variados climas, relevos e vegetações, destinando-os à exploração econômica, seja de carne, lã ou leite, ou à subsistência familiar em zonas rurais (VIANA, 2008).

No entanto, ainda existem dificuldades em relação ao manejo sanitário, reprodutivo e nutricional desta espécie, decorrentes da carência de assistência técnica e mão de obra qualificada para tal (SIMPLÍCIO, 2011). Os abortamentos são responsáveis pela maior parcela de perdas econômicas na pecuária, em virtude da importância da sanidade reprodutiva de um rebanho, e o que os torna ainda mais prejudiciais para a criação de animais é a dificuldade no seu diagnóstico, havendo uma ampla gama de distúrbios que podem desencadeá-los, porém, causas infecciosas predominam na criação de pequenos ruminantes (MORENO et al., 2012).

Determinar as causas de abortamento em um rebanho se faz necessário para evitar perdas econômicas diretas pelo valor do feto perdido, além de perdas indiretas com a demanda de auxílio profissional, custo de técnicas diagnósticas, redução na vida produtiva dos animais e aumento no descarte (ANDREOTTI, 2003), além da detecção de agentes infecciosos que possam ter potencial zoonótico (GARCÍA-PÉREZ et al., 2003). Porém, ainda existem dificuldades em chegar às causas de abortamento e estima-se que o percentual de sucesso neste tipo de diagnóstico varia de 40 a 62% (OPORTO et al., 2006; EDMONDSON et al., 2012). Em virtude da grande quantidade de casos que ainda permanece sem diagnóstico, a pesquisa de patógenos novos, ou pouco comuns para uma determinada espécie se faz essencial para aumentar o percentual de êxito nestes casos (MORENO et al., 2012).

Existem diversos agentes infecciosos que levam ao abortamento em ovinos, alguns mais frequentes, como *Toxoplasma gondii*, *Chlamydophila abortus*, *Salmonella* sp., *Brucella* sp. e Doença das Fronteiras; e outros esporádicos, como *Leptospira* sp., *Coxiella burnetti*, *Campylobacter* sp. e *Listeria monocytogenes* (GARCÍA-PÉREZ et al., 1998; GARCÍA-PÉREZ et al., 2003). A infecção por *Neospora caninum*,

considerada a mais importante causa de aborto em bovinos no mundo (DUBEY & SCHARES, 2011), vem apresentando importância crescente também na criação de pequenos ruminantes, com relatos deste protozoário ocasionando abortamentos tanto em ovinos como em caprinos (DUBEY & LINDSAY, 1990; KOBAYASHI et al., 2001; WEST et al. 2006; MORENO et al. 2012; GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2014).

A toxoplasmose, enfermidade parasitária ocasionada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, é considerada a maior causa infecciosa de abortamento em ovinos no mundo (INNES et al., 2009), e, além do aborto, esta doença leva a uma série de desordens reprodutivas, como reabsorção fetal, natimortos, mortalidade neonatal e nascimento de cordeiros fracos (FREYRE et al., 1997), refletindo em amplas perdas econômicas. No Reino Unido, estima-se que cerca de 1-2% das perdas neonatais anuais decorrem da toxoplasmose, o que representa até 5 milhões de cordeiros perdidos ao ano, causando um importante impacto econômico aos ovinocultores (BLEWETT & TREES, 1987). Já no Uruguai, de 1,4 a 3,9% das gestações são perdidas anualmente apenas por esta enfermidade, chegando a prejuízos que variam de US\$1,4 a 4,68 milhões por ano, considerando o valor de US\$10 a 12 por cordeiro perdido (FREYRE et al., 1997).

No Brasil, a soroprevalência da toxoplasmose ovina varia amplamente entre as regiões, desde 7% no estado do Paraná (MOURA et al., 2007) até 85% no estado de Pernambuco (MAGALHÃES et al., 2016). Resultados de levantamentos sorológicos em ovinos no Brasil e no mundo são amplamente variáveis, em decorrência de fatores como a técnica e ponto de corte empregados, das características da amostragem como o número de animais, a idade e o tipo de manejo, além das características geográficas do local de origem (MOURA et al., 2015). Em um estudo de metanálise que avaliou a soroprevalência média da toxoplasmose em ovinos no Brasil, chegou-se ao resultado de 33,8% de animais soropositivos, onde ovinos adultos possuem 2,34 vezes maiores chances de serem soropositivos em relação aos jovens (LUGOCH et al., 2019). No planalto de Santa Catarina, a prevalência é de 55,9% (MOURA et al., 2015), com 56,94% de soropositividade no município de Lages (SAKATA et al., 2012).

A neosporose, ocasionada pelo protozoário *Neospora caninum*, possui diversos aspectos semelhantes à toxoplasmose em relação ao ciclo biológico, patogenia e mecanismos que levam a perdas reprodutivas (DUBEY et al., 2007). Em ovinos, apesar de menos comum, sua detecção molecular em fetos ovinos abortados já se demonstrou mais frequente que a de *T. gondii*, com percentuais de 6,8 e 5,4%,

respectivamente (MORENO et al., 2012). A soroprevalência para *N. caninum* no Brasil varia de 1,8% no Rio Grande do Norte (SOARES et al., 2009) até 47,1% em Minas Gerais (ROSSI et al., 2008), e no município de Lages, em Santa Catarina, 46,15% das propriedades com criação de ovinos possuem ao menos um animal soropositivo, indicando a forte exposição destes animais ao protozoário (ROSA, 2010).

Em vista da similaridade entre as lesões ocasionadas por *T. gondii* e *N. caninum*, a associação de mais de uma técnica diagnóstica se faz necessária, como a análise histopatológica associada ao PCR (MORENO et al., 2012). A detecção de anticorpos anti-*T. gondii* ou anti-*N. caninum* é um indicativo de exposição ao protozoário, e não permite concluir a causa do abortamento; para isso, a avaliação dos tecidos fetais é essencial (DUBEY & LINDSAY, 2006).

Apesar dos trabalhos que apontem a exposição dos ovinos em Santa Catarina a estes protozoários, ainda não foram encontrados trabalhos no estado que demonstrem a real importância da toxoplasmose e da neosporose como causadoras de abortamento através da análise histopatológica e detecção molecular em tecidos fetais. Portanto, determinar as causas de abortamento e as informações a respeito da ocorrência destas enfermidades servirá de alerta para produtores e médicos veterinários atuantes na ovinocultura, buscando formas de evitar a disseminação dos agentes e controlando a doença em propriedades positivas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a ocorrência de abortamentos por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em ovinos do estado de Santa Catarina, por meio da associação do diagnóstico anatomopatológico e molecular dos tecidos fetais, bem como promover a caracterização epidemiológica das propriedades positivas para estas enfermidades.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Realizar necropsia de todos os fetos ovinos remetidos ao Laboratório de Patologia Animal (LAPA) do CAV/UEDESC no período entre outubro de 2015 e outubro de 2020;

b) Descrever as alterações anatomopatológicas resultantes de abortamentos por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*;

c) Utilizar a análise molecular por PCR para diagnosticar *T. gondii* e *N. caninum* nos fetos ovinos abortados;

d) Realizar visitas técnicas às propriedades com neosporose e toxoplasmose para aplicação de inquérito epidemiológico, avaliando e correlacionando os fatores sanitários e reprodutivos com resultados positivos para estas enfermidades;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Toxoplasma gondii* em ovinos

3.1.1 HISTÓRICO

Toxoplasma gondii é um protozoário cosmopolita pertencente ao Filo Apicomplexa, ordem Eucoccidiida, família Sarcocystidae e subfamília Toxoplasminae, que também possui os gêneros *Hammondia*, *Neospora* e *Besnoitia* (LEVINE et al., 1980; MUGRIDGE et al., 1999). Possui a capacidade de parasitar mamíferos, incluindo seres humanos, além de aves, répteis e anfíbios (SPÓSITO FILHA & OLIVEIRA, 2009), e devido a isso, é um dos parasitos mais amplamente estudados por conta da sua relevante importância para a medicina humana e veterinária, além da abrangente utilização de *T. gondii* como modelo de organismo unicelular em estudos laboratoriais de biologia molecular (DUBEY, 2008).

Seu primeiro relato foi realizado por Nicolle & Manceaux (1908) na Tunísia, através da detecção do protozoário nos tecidos de um roedor da espécie *Ctenodactylus gundi*, utilizado para pesquisas em laboratório com protozoários do gênero *Leishmania* sp. Paralelamente, Splendore (1908) descreveu o mesmo parasito, em tecidos de coelho, no Brasil. Seu nome foi determinado apenas no ano seguinte, baseado na sua morfologia e na espécie animal onde foi primeiramente detectado (NICOLLE & MANCEAUX, 1909).

A forma de transmissão permaneceu incerta até a visualização de suas estruturas parasitárias nas fezes de felinos domésticos (HUTCHISON, 1967), no entanto, a participação destes animais como hospedeiros definitivos no ciclo biológico do protozoário foi comprovada anos depois (FRENKEL et al., 1970). O primeiro relato de *T. gondii* como causador de abortamento em ovinos ocorreu em 1954 na Nova Zelândia, e foi identificado através da visualização microscópica de estruturas sugestivas de *T. gondii* em lesões necróticas presentes nos cotilédones placentários de fetos abortados (HARTLEY et al., 1954), posteriormente utilizados para inoculação em ovelhas prenhes, objetivando confirmar o diagnóstico e a transmissão transplacentária do protozoário (HARTLEY et al., 1957).

3.1.2 CICLO BIOLÓGICO

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório e heteroxeno, capaz de infectar qualquer célula nucleada (BLACK & BOOTHROYD, 2000). O ciclo biológico deste parasito possui duas formas, a sexuada, que ocorre exclusivamente nos felídeos, seus hospedeiros definitivos, e a assexuada, que ocorre no hospedeiro intermediário, compreendendo diversas espécies, e também no definitivo, quando há proliferação do parasito em tecidos extraintestinais (DUBEY, 1991). O protozoário possui três diferentes formas infectantes, taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos contidos em oocistos esporulados (BLACK & BOOTHROYD, 2000).

Os taquizoítos são formas assexuadas do parasito, de proliferação rápida, possuem formato de arco e medem aproximadamente $5\mu\text{m} \times 1,5\text{-}2\mu\text{m}$ (BUXTON, 1990). Possuem a capacidade de penetrar em qualquer célula do hospedeiro intermediário ou quaisquer células extraintestinais do hospedeiro definitivo, seja por penetração ativa ou por fagocitose, havendo seu envolvimento em um vacúolo parasitóforo e, a partir daí sua rápida proliferação através do processo de endodiogenia, que permanece até que a célula hospedeira se rompa e os taquizoítos gerados parasitem células adjacentes (BLACK & BOOTHROYD, 2000). Este processo é responsável pela fase aguda da doença, com o desenvolvimento de sinais clínicos, e permanece até que o hospedeiro venha a óbito ou desenvolva imunidade para combatê-la, havendo a formação de um cisto tecidual contendo bradizoítos (BUXTON, 1990).

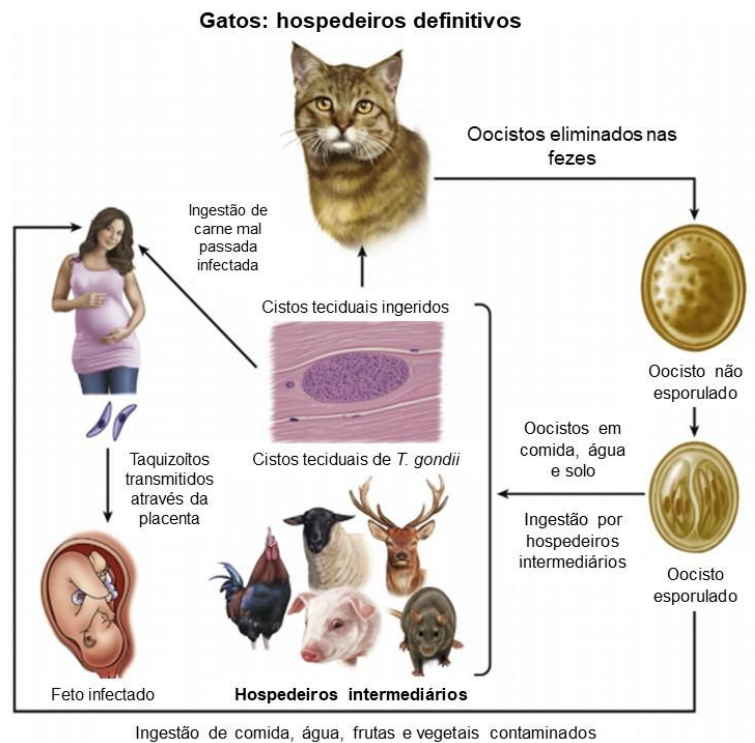
Os bradizoítos medem $7\mu\text{m} \times 1,5\mu\text{m}$, também fazem parte do ciclo assexuado do parasito, no entanto são de lenta proliferação e são envoltos por um cisto, encontrados predominantemente no tecido muscular e nervoso dos hospedeiros (DUBEY et al., 1998). Estas estruturas caracterizam a forma crônica da doença, e não levam a respostas inflamatórias quando intactas, podendo permanecer nos tecidos durante toda a vida do hospedeiro (BLACK & BOOTHROYD, 2000). Os oocistos, encontrados no intestino do hospedeiro definitivo, medem $10\mu\text{m} \times 12\mu\text{m}$ e possuem dois esporocistos com quatro esporozoítos cada, que medem $2\text{-}6\mu\text{m} \times 8\mu\text{m}$ (DUBEY et al., 1998). São originados através do ciclo sexuado do parasito, e eliminados de maneira não esporulada nas fezes de felídeos, portanto ainda não infectantes, sofrendo o processo de esporulação de um a cinco dias após a defecação, dependendo de fatores ambientais favoráveis (DUBEY, 1991). Os oocistos esporulados podem

sobreviver no ambiente por até 18 meses, e são altamente resistentes a desinfetantes comuns (DUBEY, 1994).

Felinos não-imunes podem se infectar ingerindo qualquer forma infectante do protozoário, dando início ao ciclo sexuado. É comum a ingestão de cistos teciduais presentes no músculo esquelético de presas durante o ato de carnivorismo, onde há a destruição do cisto devido a ação de enzimas proteolíticas no intestino delgado, com a liberação de bradizoítos que penetram nos enterócitos, sofrendo um processo de esquizogonia e gametogonia e levando a formação de oocistos não esporulados liberados nas fezes (BUXTON, 1990). A ingestão de outras formas infectantes, como taquizoítos e oocistos esporulados pelos felinos, levam a um maior período pré-patente, e a um menor número de oocistos liberados (DUBEY et al., 1998). Os felinos são capazes de eliminar uma grande quantidade de oocistos, podendo chegar a 10 bilhões (DUBEY & FRENKEL, 1972), porém apenas durante uma a duas semanas após a primo-infecção (ELMORE et al., 2010).

Para hospedeiros intermediários, existem três principais formas de infecção: a transplacentária, a ingestão de cistos teciduais no músculo esquelético de animais infectados e a ingestão de oocistos esporulados no ambiente (DUBEY, 1991) (Figura 1). Quando há ingestão de oocistos, estes liberam os esporozoítos ao nível do intestino delgado, diferenciando-se em taquizoítos que adentram a corrente sanguínea e linfática, levando a uma infecção aguda ou transformando-se em bradizoítos no interior de cistos teciduais (DUBEY, 1994). A infecção transplacentária ocorre quando um animal ainda não imune, é exposto pela primeira vez ao protozoário durante a prenhez, com a migração de taquizoítos para a placenta e tecidos fetais, podendo ocorrer danos em qualquer período gestacional em que ocorra a primo-infecção (DUBEY, 1991). Quando ocorre a ingestão de bradizoítos em cistos teciduais, seja pelo hábito de carnivorismo de predadores ou pelo consumo de carne malpassada por seres humanos, estes se diferenciam em taquizoítos no intestino delgado, podendo levar a uma infecção aguda ou levando novamente a formação de cistos teciduais, predominantemente em músculo esquelético ou sistema nervoso central (DUBEY, 1994). Para seres humanos, existem ainda outras formas menos comuns de contaminação, como transfusões sanguíneas e transplante de órgãos (DUBEY, 1991).

Figura 1. Representação do ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*.



Fonte: Adaptado de Lindsay & Dubey, 2020.

Os ovinos contaminam-se predominantemente através da ingestão de oocistos nas pastagens ou na água, e, menos comumente, ingerindo lóquios fetais contaminados nas pastagens ou, ainda, pelo consumo de leite cru por cordeiros (HILL & DUBEY, 2002). Relatos experimentais também demonstram a transmissão venérea do protozoário, com posterior transmissão ao cordeiro, no entanto, a importância dessa forma de contaminação permanece desconhecida para as condições naturais de criação de ovinos (LOPES et al., 2013). A mortalidade neonatal ocorrerá quando a ovelha for primo-infectada durante a gestação, com parasitemia desenvolvendo-se no 12º dia após a ingestão dos oocistos, cursando com quadro febril e aborto (BUXTON, 1990).

3.1.3 PATOGENIA

A transmissão de *T. gondii* entre os ovinos ocorre de duas formas: a horizontal, através da ingestão de oocistos esporulados no ambiente, e a vertical, por meio da passagem de taquizoítos pela barreira transplacentária da mãe para o feto durante a gestação (INNES et al., 2009). Acredita-se que, no ambiente, uma dose de apenas 200 oocistos ingeridos é suficiente para levar ao abortamento em uma ovelha prenhe

primo-infectada (McCOLGAN et al., 1988). Após a ingestão dos oocistos, ocorre a liberação dos esporozoítos no intestino delgado, e poucos dias após, os taquizoítos já se encontram na corrente sanguínea e linfática, permitindo sua multiplicação em diversos órgãos (DUBEY et al., 1998).

Durante a gestação, a resposta inflamatória a patógenos externos é modulada para que o feto não seja prejudicado, com redução na expressão de alguns mediadores inflamatórios, como a interleucina-2 (IL-2), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o interferon gamma (IFN γ) (ENTRICAN & WHEELHOUSE, 2006). Este é um fator que torna mãe e feto suscetíveis a ação de determinados patógenos, contribuindo para a migração e instalação dos taquizoítos de *T. gondii* nos placentomas e posteriormente nos tecidos fetais (BUXTON & FINLAYSON, 1986). O estágio da prenhez em que houve a contaminação é importante para determinar o quadro reprodutivo da doença, com reabsorção embrionária no início da gestação, seguido por mortalidade fetal quando a imunidade do feto se encontra imatura, natimortos, fetos mumificados ou cordeiros fracos quando há a infecção no terço médio da gestação, e nascimento de animais clinicamente normais, porém infectados por *T. gondii* quando a mãe se infecta ao final da gestação (BUXTON, 1990; BENAVIDES et al., 2017).

Apesar da maioria dos abortamentos ocorrerem de 60 a 90 dias após a infecção (DUBEY et al., 1998), esta disfunção reprodutiva já foi relatada experimentalmente de sete a 11 dias após a inoculação de *T. gondii* em ovelhas prenhes, caracterizados como um quadro agudo provavelmente resultante de alterações vasculares e trombose, e não pela replicação do parasito nos tecidos materno-fetais, em vista da ausência da detecção do DNA do protozoário nas placentas de fetos abortados (CASTAÑO et al., 2014). Após o abortamento, é comum a visualização de focos necróticos na placenta, que se manifestam a olho nu como placas esbranquiçadas (BENAVIDES et al., 2017). As alterações induzidas pelo protozoário são compostas por placentite não supurativa associada a necrose, e no feto, visualiza-se predominantemente encefalite necrotizante não supurativa, além de focos de mineralização, seguida por infiltrado inflamatório em músculo esquelético, coração, pulmões e fígado que se tornam mais intensos à medida em que a gestação se torna mais avançada, devido a maturação do sistema imune fetal e maior disponibilidade de células inflamatórias aptas a responder à multiplicação do parasito em seus órgãos (BENAVIDES et al., 2017).

Um importante aspecto que diferencia a toxoplasmose da neosporose, é que não há recrudescência da infecção em gestações subsequentes após a primo-infecção com *T. gondii*, enquanto que na neosporose, uma infecção persistente por *N. caninum* pode levar a abortos em gestações subsequentes (DUBEY et al., 2006). Porém, a reinfecção experimental com taquizoítos de *T. gondii* em ovelhas previamente infectadas, desencadeou, além de abortamentos, diversas alterações em neonatos, incluindo natimortos, debilidade, malformações e dificuldades locomotoras (SANTOS, 2012).

3.1.4 EPIDEMIOLOGIA

A toxoplasmose possui caráter zoonótico, e por ser amplamente visualizada em pequenos ruminantes, os riscos de contaminação são altos em seres humanos que consomem carne e/ou leite destes animais sem o devido tratamento térmico adequado (KHATER et al., 2013). Os ovinos, por sua vez, contaminam-se predominantemente pela ingestão de oocistos esporulados presentes nas pastagens e na água, e há maior soroprevalência para *T. gondii* em ovinos que pastejam em locais com circulação de felinos pertencentes aos produtores ou à vizinhança (VAN DER PUIJE et al., 2000), havendo correlação fortemente positiva entre a soropositividade para o protozoário e o pastejo destes animais em regime extensivo (MOURA et al., 2015).

Apesar dos felinos liberarem os oocistos apenas após o primeiro contato com o protozoário, existem relatos de uma segunda liberação após inoculação experimental ou durante episódios de imunossupressão (MALMASI et al., 2009). A soroprevalência de *T. gondii* em felinos ao redor do mundo varia de 30-40% (DUBEY & BEATTIE, 1988), superior em animais errantes ou que possuem acesso livre à rua em relação aos felinos criados exclusivamente em ambiente domiciliar, devido à maior exposição com o ambiente externo e à prática de carnivorismo, permitindo a ingestão de possíveis hospedeiros intermediários contendo cistos teciduais e dando continuidade ao ciclo do protozoário (NUTTER et al., 2004). Ainda, felinos criados em ambientes rurais e com livre acesso a vísceras cruas e leite cru possuem maior exposição ao *T. gondii*, com maior soropositividade (COELHO et al., 2011).

Ovelhas soropositivas possuem maior tendência a apresentarem aborto, retorno ao cio e natimortos, e, em um estudo prévio, 52,2% de ovinos com algum problema reprodutivo obtiveram titulação positiva para *T. gondii* (MOURA et al., 2015). Apesar da conhecida importância da primo-infecção na ocorrência de aborto por

toxoplasmose em seres humanos e ovinos, estudos demonstram que podem haver casos de repetição na ocorrência de abortamentos em gestações subsequentes, sugerindo que, muitas vezes, a imunidade persistente adquirida após primeira exposição ao protozoário pode não ocorrer (MORLEY et al., 2007), seja pela transmissão endógena da mãe infectada ao feto, ou pela transmissão exógena através da infecção por diferentes cepas de *T. gondii* (TREES & WILLIAMS, 2005).

Resultados de levantamentos sorológicos em ovinos no Brasil e no mundo são amplamente variáveis, em decorrência de fatores como a técnica e ponto de corte empregados, das características da amostragem como o número de animais, a idade e o tipo de manejo, além das características geográficas do local de origem (MOURA et al., 2015). Tais variações foram visualizados por Tenter et al. (2000), que encontraram soropositividade para *T. gondii* variando de 0 a 92% através da revisão de levantamentos sorológicos em ovinos de diversos países. A umidade e o tipo de vegetação do solo no qual os ovinos realizam o pastejo contribuem para a manutenção da viabilidade dos oocistos, formando um microambiente favorável, com maior soropositividade de ovinos que são criados em regiões úmidas em relação a secas (SILVA et al., 2003), e propriedades que possuam o convívio entre roedores, felinos e ovinos são mais propensas à manutenção da toxoplasmose (LUGOCH et al., 2019). Aves popularmente conhecidas como “galinhas caipiras” criadas no Brasil, assumem um importante papel como indicadores de contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii*, devido a seus hábitos de alimentação geofágicos (DUBEY et al., 2003).

Animais adultos possuem maiores chances de exposição ao protozoário (ANDRADE et al., 2013), e não há diferença significativa para a soropositividade entre machos e fêmeas (SAKATA et al., 2012; LUGOCH et al., 2019), apesar de Van der Puije et al. (2000) terem observado experimentalmente maiores chances de fêmeas se demonstrarem soropositivas, em virtude de aspectos hormonais, físicos e de manejo. No entanto, a discrepância em relação a resultados envolvendo a soroprevalência em diferentes sexos é considerada um fator aleatório, portanto não possui poder de influência sobre os resultados (UENO, 2005). Na serra de Santa Catarina o protozoário está amplamente distribuído, mesorregião que é caracterizada predominantemente por pequenas criações com objetivo de consumo de produtos de ovinos pelos próprios produtores, demonstrando se tratar de uma importante via de infecção aos seres humanos (MOURA et al., 2015).

3.1.5 DIAGNÓSTICO

O abortamento em rebanhos ovinos necessita ser investigado quando uma taxa superior a 2% do rebanho apresenta essa desordem reprodutiva, no entanto, muitas vezes não é possível visualizar o abortamento, e nestes casos, outros sinais devem ser considerados, como taxa de repetição de cio superior a 10% com ou sem grandes intervalos, indicando mortalidade embrionária; ausência de trabalho de parto apesar de diagnóstico positivo de prenhez; corrimento vaginal sanguinolento e, mais evidentemente, a visualização de fetos em diferentes estágios de desenvolvimento acompanhados ou não pela placenta (MENZIES, 2011).

O diagnóstico conclusivo da toxoplasmose ovina requer a associação de diferentes métodos, combinando resultados de caráter anatomopatológico, molecular e soropidemiológico. As alterações macroscópicas visualizadas em episódios de abortamento pela infecção por *T. gondii* não são patognomônicas, mas podem incluir focos de necrose na placenta variando de 2-3mm, multifocais a coalescentes, visualizados como áreas de coloração esbranquiçada, o feto pode estar mumificado ou em diferentes estágios de desenvolvimento e autólise, apresentando edema subcutâneo e variada quantidade de líquido sanguinolento nas cavidades (BUXTON, 1998).

Microscopicamente, lesões consideradas características envolvem alterações predominantemente em sistema nervoso central, músculo esquelético, coração, fígado e placenta, havendo infiltrados inflamatórios não supurativos multifocais associados a necrose (PEREIRA-BUENO et al., 2004). No entanto, muitas vezes não são visualizadas alterações microscópicas consistentes, especialmente em casos de autólise avançada (BUXTON, 1998), e, além disso, estas lesões também podem ser tipicamente encontradas em abortamentos resultantes da infecção por *N. caninum* (MORENO et al., 2012).

Devido às semelhanças estruturais, biológicas e filogenéticas entre *T. gondii* e *N. caninum*, técnicas de diagnóstico mais acurado se fazem necessárias para a diferenciação da infecção entre esses dois protozoários, como a utilização de ferramentas de diagnóstico molecular, como a PCR, essencial para a confirmação do diagnóstico, por ser um método rápido e com alta sensibilidade e especificidade (HURTADO et al., 2001). A PCR permite a detecção do DNA do protozoário mesmo em pequenas quantidades e em tecidos que, muitas vezes, não possuem condições

adequadas para análise histológica e de imuno-histoquímica (OWEN et al., 1998). A imuno-histoquímica é vantajosa para materiais fixados em formol, com detecção de *T. gondii* em cotilédones, coração, pulmões, encéfalo e músculo esquelético de fetos ovinos abortados (UGGLA et al., 1987). No entanto, as chances de reações cruzadas de anticorpos policlonais com *N. caninum* são comuns, portanto esta técnica apresenta desvantagens em relação a outras formas de diagnóstico, como a PCR (SUNDERMANN et al., 1997). Para otimizar as chances de um diagnóstico conclusivo, quaisquer sejam as técnicas diagnósticas empregadas, recomenda-se submeter materiais provenientes de mais de um aborto, incluindo feto e placenta (MENZIES, 2011).

Análises sorológicas de líquidos cavitários e soro fetais podem ser úteis no diagnóstico da toxoplasmose, pois anticorpos maternos não atravessam a placenta, indicando que, quando há a presença de anticorpos fetais, obrigatoriamente houve contato do feto com o protozoário, porém a ausência destes anticorpos não exclui a sua infecção, afinal o seu desenvolvimento dependerá do estágio gestacional, que está diretamente ligado ao grau de imunocompetência fetal, e do tempo decorrente entre a infecção e a realização do exame sorológico (DUBEY et al., 1986).

A sorologia materna é amplamente utilizada para levantamentos epidemiológicos acerca da exposição dos animais ao protozoário, com os testes de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) sendo os mais utilizados, por possuírem alta sensibilidade e especificidade (SAWADOGO et al., 2005). Porém, diferente da PCR que é considerada uma forma direta de diagnóstico da toxoplasmose, a soropositividade da mãe não confirma que *T. gondii* levou ao quadro de abortamento, em virtude da ampla prevalência do protozoário nos rebanhos (DUBEY & KIRKBRIDE, 1984).

3.1.6 CONTROLE E PREVENÇÃO

Em propriedades soronegativas, recomenda-se a restrição de acesso dos felinos da propriedade às instalações dos ovinos, associado à castração dos felinos para evitar ninhadas de felinos que eliminarão oocistos (MENZIES, 2011). Para gatos errantes, a restrição de acesso torna-se dificultada, e sabe-se que, em áreas rurais, machos não castrados podem percorrer uma área que varia de 60-80 hectares em busca de alimento e reprodução (MACDONALD, 1980). Nestes casos, a restrição de fontes de alimento é essencial, recomendando-se o controle especialmente de

roedores, que servem como fontes de infecção aos felinos, perpetuando o ciclo do protozoário, além do descarte correto de materiais resultantes de aborto e carcaças, que possam servir de alimento para animais errantes e silvestres (BUXTON, 1998). Também é importante verificar se há convívio dos ovinos com aves domésticas criadas livremente, especialmente “galinhas caipiras”, que podem assumir um papel importante na ocorrência da enfermidade devido aos seus hábitos alimentares (DUBEY et al., 2003).

As primeiras medidas a serem tomadas envolvem o manejo das fêmeas prenhes, separando-as fisicamente das fêmeas que sofreram abortamento, levando-as para uma área isolada, supervisionada e limpa, garantindo que não sejam contaminadas (MENZIES, 2011). Em rebanhos previamente soropositivos para *T. gondii*, as ovelhas recentemente introduzidas no plantel devem ser testadas, e em caso de soronegatividade, recomenda-se a exposição dos animais aos oocistos para o desenvolvimento de anticorpos anterior à reprodução, elevando as chances de sucesso no parto (BUXTON, 1998).

Medicamentos profiláticos podem ser utilizados durante a gestação, e acredita-se que o fornecimento de monensina nas doses de 16,8mg ou 27,9mg por animal tendem a diminuir as perdas reprodutivas em decorrência do *T. gondii* em relação a animais não medicados (BUXTON et al., 1988). Em ovelhas experimentalmente infectadas pelo protozoário, o decoquinato, também coccidiostático, na dose de 2mg/Kg fornecido diariamente junto ao concentrado, levou a redução no quadro febril resultante da infecção, bem como menores danos à placenta em decorrência da migração dos taquizoítos e aumentou o número e o peso de cordeiros nascidos, diferentemente de ovelhas expostas a oocistos de *T. gondii*, porém não suplementadas com o decoquinato (BUXTON et al., 1996).

Uma vacina viva já é comercializada no Reino Unido, Nova Zelândia e França para reduzir as perdas pela toxoplasmose na ovinocultura (BUXTON & INNES, 1995). É derivada de uma cepa modificada (S48) de *T. gondii*, isolada inicialmente de um feto ovino abortado na Nova Zelândia, e submetida a diversas passagens laboratoriais em tecidos de roedores, perdendo a capacidade de formar cistos teciduais ou oocistos, e possui nome comercial Toxovax® (DUBEY, 2009). Sua aplicação é recomendada no mínimo três semanas antes de submeter os animais à reprodução, induzindo imunidade protetiva durante ao menos 18 meses (BUXTON & INNES, 1995). No entanto, por ser uma vacina viva, possui validade de apenas 10 dias, e pesquisas em

busca de vacinas inativadas permanecem sendo desenvolvidas para reduzir as desvantagens de uma vacina viva, que incluem a curta validade e os riscos de infecção para os envolvidos na sua manipulação e aplicação (DUBEY, 2009).

3.2 *Neospora caninum* em ovinos

3.2.1 HISTÓRICO

Neospora caninum é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, família Sarcocystidae e subfamília Toxoplasminae, juntamente com os gêneros *Toxoplasma*, *Hammondia* e *Besnoitia* (MUGRIDGE et al., 1999). Este parasito possui as mesmas formas infectantes do *T. gondii*, podendo estar presente como taquizoítos, cistos teciduais contendo bradizoítos e, ainda, oocistos, no entanto com particularidades em relação a sua estrutura, imunogenicidade e patogenicidade que permitem diferenciar da toxoplasmose (DUBEY, 1999).

A descoberta deste protozoário ocorreu em um estudo realizado por Dubey et al. (1988) revisando 23 casos de toxoplasmose em cães. Através de microscopia eletrônica, constatou-se que 10 casos haviam sido ocasionados por um protozoário estruturalmente diferente do *T. gondii*, pertencendo a uma nova espécie, a partir daí denominada *Neospora caninum*. Posteriormente, McAllister et al. (1998) determinaram que um dos hospedeiros definitivos do protozoário é o próprio cão doméstico. Outros canídeos selvagens também são reconhecidos como hospedeiros definitivos, e uma infinidade de espécies atua como hospedeiros intermediários (DUBEY, 2003), com o primeiro relato ocorrendo na espécie bovina em um neonato com desordens neurológicas (DUBEY, 1989) e na placenta de bovinos (SHIVAPRASAD et al., 1989).

Este protozoário é considerado como o principal agente infeccioso causador de abortamentos e natimortalidade em bovinos no mundo (DUBEY, 2003). Os ovinos foram confirmados como hospedeiros intermediários por Dubey et al. (1990) no Reino Unido, através da detecção do protozoário em um cordeiro neonato com incoordenação motora, posteriormente detectado por PCR em fetos ovinos abortados, confirmando a infecção transplacentária do protozoário, resultando em problemas reprodutivos também nesta espécie (HÄSSIG et al., 2003). No Brasil, o primeiro isolamento e sequenciamento de *N. caninum* em ovelhas naturalmente infectadas foi realizado por Pena et al. (2007).

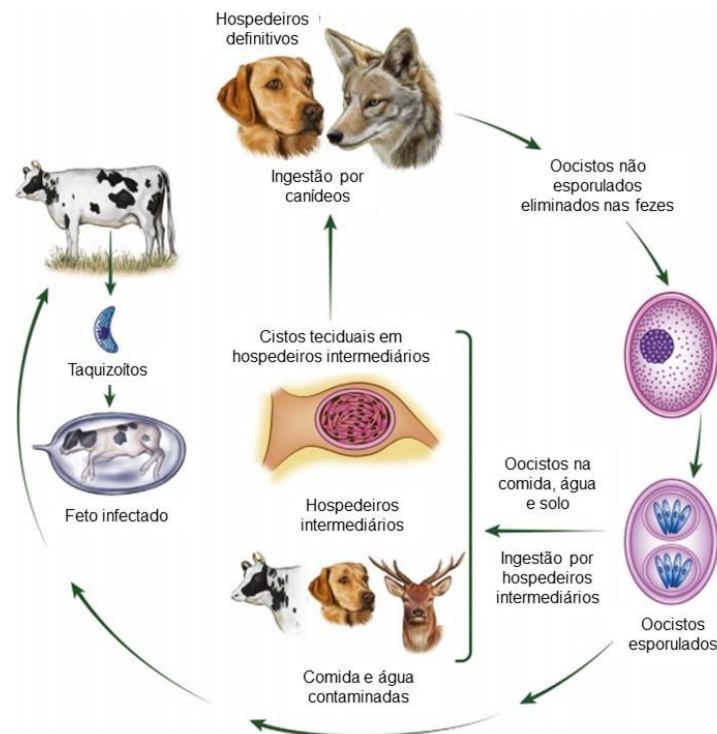
3.2.2 CICLO BIOLÓGICO

Neospora caninum é um protozoário cosmopolita de ciclo heteroxeno, tendo como hospedeiros definitivos os cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) e como intermediários diversas espécies de animais endotérmicos, inclusive os próprios canídeos (DUBEY, 2003) (Figura 2). Além de cães domésticos, oocistos de *N. caninum* já foram detectados nas fezes de alguns canídeos selvagens, considerados potenciais hospedeiros definitivos, como o coiote (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004), a raposa-vermelha (*Vulpes vulpes*) (WAPENAAR et al., 2006), o dingo australiano (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e o lobo-cinzento (*Canis lupus*) (DUBEY et al., 2011). O ciclo evolutivo deste protozoário possui muitas semelhanças com *T. gondii*, com taquizoítos de formato ovoide, lunar ou globular, de aproximadamente 3-7x1,5µm, que se localizam nos hospedeiros intermediários, no interior de um vacúolo parasitóforo do citoplasma da célula hospedeira (DUBEY et al., 2002).

Os cistos teciduais são encontrados predominantemente no sistema nervoso central do hospedeiro intermediário, além de músculo esquelético e cardíaco, possuem até 107µm de comprimento e são repletos por bradizoítos que medem 7-8x2µm (DUBEY, 2003). Os oocistos possuem formato arredondado a ovalado, medem entre 10,6-12,4x10,6-12,0µm, contém dois esporocistos com quatro esporozoítos, cada um medindo aproximadamente 5,8-7,0x1,8-2,2µm, excretados nas fezes dos hospedeiros definitivos, e após 48 a 72 horas a grande maioria de oocistos esporula no ambiente (LINDSAY et al., 1999; DUBEY et al., 2007).

Os cães infectam-se predominantemente através do carnivorismo, por meio da ingestão de taquizoítos e cistos teciduais contidos na musculatura esquelética de hospedeiros intermediários, da mãe para os filhotes através da placenta ou da ingestão de leite contendo taquizoítos (DUBEY & SCHARES, 2011). Após a ingestão de cistos teciduais pelos canídeos, há seu rompimento com liberação de bradizoítos, que se instalam nos enterócitos onde ocorre a reprodução sexuada do parasito, resultando na liberação de oocistos não esporulados nas fezes (LINDSAY et al., 1999). Acredita-se que a quantidade de oocistos nas fezes dos canídeos é inferior em relação à liberada por felinos no ciclo do *T. gondii* (DUBEY et al., 2002), no entanto a liberação de oocistos de *N. caninum* ocorre por um período mais prolongado, cerca de três semanas (AL-MAJALI et al., 2008).

Figura 2. Representação do ciclo biológico de *Neospora caninum*.



Fonte: Adaptado de Lindsay & Dubey, 2020.

A transmissão de *N. caninum* em ruminantes ocorre de duas maneiras, a horizontal e a vertical. A primeira forma tem início quando há a ingestão de oocistos esporulados na água ou pastagens contaminadas, havendo liberação dos esporozoítos no intestino delgado, onde passam a se diferenciar em taquizoítos, que adentram a corrente sanguínea e linfática e proliferam-se rapidamente por meio da endodiogenia, sua reprodução assexuada (MCALLISTER et al., 1998). A outra forma, também conhecida como transplacentária ou congênita, ocorre de mãe para a progênie durante a gestação (DUBEY et al., 2007), e é classificada em exógena, quando a mãe infecta-se durante a prenhez, ou endógena, que ocorre por meio da recrudescência de uma infecção anterior (TREES & WILLIAMS, 2005). Outra classificação permite diferenciar infecções transplacentárias que ocorreram em fêmeas infectadas após o nascimento ou congenitamente infectadas (MCALLISTER et al., 2005).

A transmissão vertical da neosporose é responsável por perpetuar a doença no rebanho, pois diferentemente da toxoplasmose, graças a recrudescência da infecção, problemas reprodutivos podem ocorrer geração após geração, mesmo com a ausência do hospedeiro definitivo liberando oocistos (ANDERSON et al., 2000). Outra

particularidade em relação à toxoplasmose é que ainda não se conhece o verdadeiro potencial zoonótico do *N. caninum*, com alguns relatos da ocorrência de anticorpos contra o protozoário em humanos, o que não confirma a infecção e o caráter zoonótico, mas indica a exposição ao agente (TRANAS et al., 1999; MAGALHÃES et al., 2002).

3.2.3 PATOGENIA

Após um quadro de parasitemia na mãe, seja pela infecção durante a prenhez (exógena) ou após a reativação de uma infecção latente (endógena) (DUBEY et al., 2007), os taquizoítos tendem a migrar para as carúnculas uterinas, adentrando no epitélio coriônico fetal e levando ao aborto devido a interação de diversos fatores (GIBNEY et al., 2008). O dano placentário ocasionado pela ação do protozoário pode levar a uma injúria direta ao feto pelas lesões promovidas nos tecidos fetais, ou indireta, pela interrupção na produção de prostaglandinas pela placenta lesionada com indução de luteólise, ou pela restrição de oxigênio ao feto em decorrência do quadro de inflamação, trombose e necrose dos placentomas (DUBEY et al., 2006; GIBNEY et al., 2008).

O principal sinal clínico observado em ovelhas infectadas por *N. caninum* é o abortamento, além do nascimento de cordeiros fracos, natimortos, ou nascidos clinicamente normais, porém infectados pelo protozoário (MCALLISTER et al., 1996). O período gestacional em que ocorre a infecção influenciará na ocorrência de aborto, pois do início ao meio da gestação o sistema imunológico do feto encontra-se em desenvolvimento, e não é capaz de responder adequadamente à injúria provocada por microrganismos. No entanto, mais ao final da gestação, o feto é capaz de sobreviver à infecção, nascendo clinicamente saudável, mas infectado (WILLIAMS et al., 2000; DUBEY et al., 2006).

Esta condição já foi visualizada experimentalmente através da inoculação de taquizoítos em ovelhas prenhes de 65, 90 e 120 dias, com taxa de aborto de 100% dentre as ovelhas prenhes de 65 dias, e com nascimento de cordeiros saudáveis dentre as ovelhas com 120 dias de gestação, porém, comprovadamente infectados por *N. caninum*, com a visualização imuno-histoquímica de cistos teciduais no encéfalo de 39% dos cordeiros normais (MCALLISTER et al., 1996). As lesões evidenciadas em cordeiros abortados são muito semelhantes às ocasionadas por *T. gondii* (HÄSSIG et al., 2003), mais evidentes no sistema nervoso central, com

encefalite não supurativa associada a focos de necrose, miosite e miocardite mononucleares, além de placentite necrótica mononuclear (DUBEY & LINDSAY, 1990).

3.2.4 EPIDEMIOLOGIA

A exposição dos ovinos ao *N. caninum* já foi relatada em todos os continentes, com índices de soropositividade variando de 0,45% na Inglaterra e País de Gales (HELMICK et al., 2002), até 63% no norte da Jordânia (ABO-SHEHADA & ABU-HALAWEH, 2010). A soropositividade é influenciada por diversos fatores, como o tipo de teste empregado, o número total de animais e as condições de ambiente e manejo a que são submetidos (MOURA et al., 2015). A soropositividade no Brasil varia de 1,8% no Rio Grande do Norte (SOARES et al., 2009) até 64,2% em Pernambuco (TEMBUE et al., 2011). Em Lages, no estado de Santa Catarina, 46,15% das propriedades com criação de ovinos possuem ao menos um animal soropositivo, indicando a forte exposição destes animais ao protozoário (ROSA, 2010).

Apesar do agente não possuir o mesmo impacto reprodutivo e econômico para ovinos como representa na bovinocultura, relatos demonstram a sua importância como causadores de abortamento em ovelhas, ressaltando a necessidade cada vez maior de considerá-lo como um importante diagnóstico diferencial para desordens reprodutivas na ovinocultura, assim como *T. gondii* (HOWE et al., 2008; MORENO et al., 2012). Em criações concomitantes com bovinos, os ovinos podem assumir um importante papel no âmbito epidemiológico da doença, por se tratarem de dois importantes hospedeiros intermediários na manutenção do ciclo do protozoário (VOGEL et al., 2006).

A neosporose em um rebanho pode ocorrer de três formas: epidêmica, endêmica e esporádica. Na primeira forma, há contato e infecção primários pelo protozoário durante a gestação de animais que ainda não haviam sido expostos, possivelmente de uma mesma fonte e no mesmo período, levando a uma grande taxa de abortamento, podendo chegar a 10% (DAVISON et al., 1999; MCALLISTER et al., 2000). Na forma endêmica, está presente uma infecção crônica persistente no rebanho, caracterizada pela passagem transplacentária do protozoário por diversas gerações (HALL et al., 2005), e a forma esporádica ocorre apenas casualmente dentro do rebanho (GOODSWEN et al., 2013).

Além da transmissão transplacentária da mãe para o feto, a ingestão de oocistos não esporulados em alimentos ou água contaminados é reconhecida como uma importante fonte de infecção, e a convivência de cães em piquetes ou instalações para a criação destes animais aumenta o potencial de contaminação e infecção pelo protozoário (DUBEY et al., 2007). Hábitos comuns dentre cães de propriedades, como a ingestão de carne e vísceras cruas, além de restos placentários, podem perpetuar o ciclo no rebanho (VANLEEuwEN et al., 2010). Este costume também reflete em uma maior soroprevalência para *N. caninum* em cães provenientes de ambientes rurais em relação a ambientes urbanos (DUBEY & SCHARES, 2011). Cães alimentados com tecidos neurais e extraneurais de bovinos e bubalinos naturalmente infectados pelo protozoário, liberaram oocistos posteriormente (BANDINI et al., 2011; CAVALCANTE et al., 2011).

Munhóz et al. (2010) constataram que a soropositividade de ovinos em propriedades rurais possui forte associação com o abate de animais nas próprias instalações e com a ingestão de vísceras e carne cruas pelos cães da propriedade, e durante o mesmo estudo, no rebanho de maior soropositividade entre os ovinos (32.3%) houve também a maior soropositividade entre os cães que circulavam no local (100%). Há correlação entre a sorologia positiva para *N. caninum* e a ocorrência de abortamento em ovinos (WEST et al., 2006), porém não há nenhuma associação entre diferentes sexos, idades e raças de ovinos para a ocorrência da neosporose (ROMANELLI et al., 2007).

3.2.5 DIAGNÓSTICO

Para chegar de maneira conclusiva ao diagnóstico de neosporose em uma propriedade, um conjunto de análises são necessárias, tendo início através do histórico do rebanho com transtornos reprodutivos que envolvam abortamentos e/ou nascimento de cordeiros fracos, associando-o com os resultados laboratoriais obtidos (MUNHÓZ et al., 2010). Macroscopicamente, os fetos comumente se apresentam autolisados ou mumificados, sem lesões macroscópicas (DUBEY & SCHARES, 2006). A análise histológica dos tecidos fetais e placenta é imprescindível para a visualização de lesões sugestivas de neosporose, que ocorrem principalmente no sistema nervoso central, com focos de encefalite necrotizante não supurativa, além de miosite e miocardite mononucleares, semelhantes às ocasionadas por *T. gondii* (DUBEY & LINDSAY, 1990).

A imuno-histoquímica é uma das técnicas utilizadas para diferenciar a infecção ocasionada por *N. caninum* e *T. gondii*, e permite a identificação do parasito responsável pelas lesões fetais, predominantemente em encéfalo e coração (DUBEY & SCHARES, 2006), no entanto, pode gerar falsos negativos em decorrência de um baixo número de parasitos ou devido a autólise avançada dos fetos (SOCARRÁS, 2001). Outra desvantagem está relacionada a possíveis reações cruzadas entre protozoários do mesmo filo através da utilização de anticorpos policlonais, podendo levar a falsos positivos para *N. caninum* em animais verdadeiramente infectados por *T. gondii* (VAN MAANEN et al., 2004).

A PCR possui alta sensibilidade e especificidade em relação à imuno-histoquímica, baseada na detecção do DNA do *N. caninum* nos tecidos do feto abortado, assumindo um importante papel para o seu diagnóstico (BASZLER et al., 1999; DUBEY & SCHARES, 2006). Protocolos para quantificar a carga de DNA através de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR) são úteis em estudos relacionados a patogenia da neosporose, além de contribuir em pesquisas para o desenvolvimento de vacinas e medicamentos (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2004).

Testes sorológicos de mães indicam a exposição ao *N. caninum*, porém não confirmam a infecção como causa de abortamento, sendo essencial a análise laboratorial dos tecidos fetais e da placenta (DUBEY, 2003). Apesar de não confirmar a infecção, verificar a presença de anticorpos específicos anti-*N. caninum* traz importantes informações para a avaliação epidemiológica da propriedade, servindo também como um método de triagem de novos animais (HOFFMANN, 2007). As técnicas mais utilizadas são a RIFI e o ELISA (ROMERO & FRANKENA, 2004).

A sorologia de líquidos fetais também pode ser realizada, e usualmente um resultado positivo confirma a infecção por *N. caninum* devido à ausência da passagem de anticorpos maternos ao feto, porém resultados negativos não descartam um possível caso de neosporose devido a síntese de anticorpos fetais ser influenciada pelo período gestacional (DUBEY, 2003). No rebanho, a sorologia permite demonstrar qual o nível de exposição dos animais às fontes de infecção, além de possibilitar a confirmação da transmissão transplacentária entre as gerações através da sorologia positiva em animais jovens nascidos dentro da propriedade (DUBEY & SCHARES, 2006).

3.2.6 CONTROLE E PREVENÇÃO

Medidas de controle são essenciais para reduzir os prejuízos econômicos resultantes da neosporose, e envolvem a restrição de acesso dos cães da propriedade a piquetes e fontes de água dos animais, evitando, também, o seu fornecimento de carne e vísceras cruas, bem como de restos placentários e fetais (DUBEY, 2003). Sugere-se que, em rebanhos que possuam alta taxa de transmissão transplacentária e baixa de transmissão horizontal, haja a seleção dos animais soropositivos da propriedade para isolamento e descarte gradual (FRENCH et al., 1999). Outras medidas de controle recomendadas incluem a restrição de acesso de cães de propriedades vizinhas e canídeos selvagens por meio do controle de possíveis fontes de alimentos a estes animais; instituição de piquetes-maternidade; e aquisição de novos animais com, no mínimo, duas sorologias negativas para *N. caninum* (DUBEY, 2003). As medidas de controle e prevenção são dispendiosas e demandam um período prolongado para demonstrarem êxito, pois ainda não existem tratamentos eficazes contra o protozoário (MUNHÓZ et al., 2010).

Ainda há poucos estudos a respeito do desenvolvimento de vacinas contra *N. caninum* em ovinos. O'Handley et al. (2003), testando uma vacina viva inativada de taquizoítos de *N. caninum* em ovelhas prenhes, verificaram a indução da imunidade humoral nas ovelhas, reduzindo parcialmente a transmissão transplacentária, com redução no número de cordeiros soropositivos. Por outro lado, Jenkins et al. (2004), utilizando uma vacina formulada com extrato proteico do protozoário, observaram redução nas perdas fetais de ovelhas vacinadas, no entanto, os cordeiros nascidos demonstraram-se soropositivos, confirmando que houve a passagem transplacentária de taquizoítos das mães para os fetos. Mais recentemente, Weston et al. (2009) chegaram a titulação adequada para desenvolvimento adequado de imunidade em ovelhas prenhes, ao inocular 106 taquizoítos de *N. caninum* houve taxa de abortamento de 100%, com 105 taquizoítos houve taxa de 50%, e nenhum abortamento foi evidenciado nas ovelhas inoculadas com 50 taquizoítos, demonstrando sucesso na imunoproteção.

4 Neosporose e Toxoplasmose como causas de abortamento em ovinos do estado de Santa Catarina, Brasil: aspectos anatomopatológicos, moleculares e epidemiológicos

Neosporosis and Toxoplasmosis as causes of abortion in sheep in the state of Santa Catarina, Brazil: anatomopathological, molecular and epidemiological aspects

RESUMO

A neosporose e a toxoplasmose são enfermidades parasitárias ocasionadas, respectivamente, pelos protozoários *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*. A toxoplasmose é a principal causa infecciosa de abortamentos em ovinos no mundo, enquanto a neosporose ganha cada vez mais importância como causadora de transtornos reprodutivos nesta espécie. O objetivo do presente trabalho é verificar suas ocorrências em ovinos de Santa Catarina através da sua detecção em tecidos fetais. Todos os fetos ovinos remetidos ao LAPA-CAV/UEDESC foram submetidos a necropsia, com colheita de órgãos para histopatológico, cultivo microbiológico, reação em cadeia da polimerase (PCR) para *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*, utilizando como alvos, respectivamente, as sequências Nc5 e SAG2 em tecido encefálico. As propriedades positivas foram visitadas, havendo aplicação de inquérito padronizado para caracterização das mesmas e avaliação das estratégias de controle. Entre outubro de 2015 e outubro de 2020 foram avaliados 49 fetos ovinos, e destes, houveram 10 (35,71%) casos de neosporose e 8 (28,57%) casos de toxoplasmose, compostos por três propriedades com diagnóstico de neosporose e quatro com toxoplasmose. Macroscopicamente, para os casos de neosporose, houve mumificação e maceração fetal, e, para toxoplasmose, maceração fetal, prognatismo e atresia vaginal. As lesões histopatológicas em casos de neosporose foram compostas por encefalite necrotizante linfoplasmocitária multifocal (10% - 1/10), gliose multifocal (20% - 2/10), miosite linfoplasmocitária multifocal (60% - 6/10), miocardite linfoplasmocitária multifocal (50% - 5/10) e placentite linfoplasmocitária multifocal (10% - 1/10). Para toxoplasmose, foram encefalite necrotizante linfoplasmocitária multifocal (50% - 4/8), gliose multifocal (12,5% - 1/8), miocardite linfoplasmocitária multifocal (37,5% - 3/8) e miosite linfoplasmocitária multifocal (25% - 2/8). Na PCR, houve detecção de *N. caninum* em cinco casos (50%) e de *T. gondii* em quatro (50%). As propriedades com diagnóstico de neosporose possuíam acesso livre de cães do local e de localidades vizinhas às instalações e pastagens dos animais, bem como os casos de toxoplasmose, que possuíam livre acesso de felinos. Havia o descarte incorreto de restos e lóquios fetais em duas propriedades, permitindo a ingestão por cães ou felinos. No ano seguinte, houve o descarte de ovinos que haviam abortado no anterior, e em algumas propriedades passou-se a descartar corretamente lóquios fetais. O trabalho demonstra a ocorrência destas enfermidades em ovinos no estado de Santa Catarina, na forma de surtos ou casos isolados. A associação entre a análise histopatológica e molecular foi essencial para o diagnóstico, permitindo diferenciá-los entre si, e os tecidos fetais com mais lesões histopatológicas foram músculo esquelético, coração e encéfalo. O acompanhamento das propriedades permitiu traçar seus perfis e acompanhar a tomada de medidas de controle, com relatos de redução de abortamentos no ano seguinte.

Palavras-chave: Protozoário. Ovinocultura. Perda reprodutiva. Patologia.

ABSTRACT

Neosporosis and toxoplasmosis are parasitic diseases caused, respectively, by the protozoa *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. Toxoplasmosis is the main infectious cause of abortions in sheep in the world, while neosporosis is increasingly important as a cause of reproductive disorders in sheep. The objective of the present study is to verify its occurrences in sheep flocks of Santa Catarina state through its detection in fetal tissues. All ovine fetuses sent to LAPA-CAV/UDESC were necropsied, with organs samples collected for histopathology, microbiological culture, polymerase chain reaction (PCR) for *N. caninum* and *T. gondii*, using the Nc5 and SAG2 sequences, respectively, as targets in brain tissue. The positive farms were visited, enabling the application of a standardized survey to characterize them and evaluate control strategies. Between October 2015 and October 2020, 49 ovine fetuses were evaluated, and of these, there were 10 (35.71%) cases of neosporosis and 8 (28.57%) cases of toxoplasmosis, composed by three farms with neosporosis and four with toxoplasmosis. Macroscopically, for cases of neosporosis, there was fetal mummification and maceration, and for toxoplasmosis, fetal maceration, prognathism, and vaginal atresia. Histopathological lesions in cases of neosporosis were composed of multifocal lymphoplasmacytic necrotizing encephalitis (10% - 1/10), multifocal gliosis (20% - 2/10), multifocal lymphoplasmacytic myositis (60% - 6/10), multifocal lymphoplasmacytic myocarditis (50% - 5/10) and multifocal lymphoplasmacytic placentitis (10% - 1/10). For toxoplasmosis, there was multifocal lymphoplasmacytic necrotizing encephalitis (50% - 4/8), multifocal gliosis (12.5% - 1/8), multifocal lymphoplasmacytic myocarditis (37.5% - 3/8), and multifocal lymphoplasmacytic myositis (25% - 2/8). In brain PCR, *N. caninum* was detected in five cases (50%) and *T. gondii* in four (50%). The farms diagnosed with neosporosis had free access for dogs from the local and neighboring locations to the sheep installations and pastures, as well as the cases of toxoplasmosis, which had free access for felines. There was incorrect disposal of fetal remains and lochia in two farms, allowing ingestion by dogs or felines. In the following year, sheep that had been aborted in the previous year were discarded, and in some properties, fetal loci were correctly discarded. The study shows the occurrence of these diseases in sheep in the state of Santa Catarina, in the form of outbreaks or isolated cases. The association between histopathological and molecular analysis was essential for the diagnosis, allowing them to be differentiated, and the fetal tissues with more histopathological lesions were skeletal muscle, heart, and brain. The monitoring of the properties made it possible to draw their profiles and monitor the taking of control measures, with reduction in abortions in the following year.

Keywords: Protozoa. Sheep farming. Reproductive loss. Pathology.

4.1 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose e a neosporose são ocasionadas, respectivamente, pelos protozoários *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*, pertencentes ao Filo Apicomplexa, Família Sarcocystidae e Subfamília Toxoplasminae (MUGRIDGE et al., 1999). Ambos os parasitos possuem ciclo heteroxeno e três formas evolutivas, compostas por taquizoítos, de proliferação rápida, bradizoítos, de proliferação lenta, e oocistos, eliminados nas fezes de seus hospedeiros definitivos (DUBEY et al., 2002). Dentre os hospedeiros definitivos de *N. caninum*, os cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) são os mais visualizados, além de alguns canídeos selvagens, como o coiote (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004), a raposa-vermelha (*Vulpes vulpes*) (WAPENAAR et al., 2006), o dingo australiano (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e o lobo-cinzento (*Canis lupus*) (DUBEY et al., 2011). Já *T. gondii* possui como hospedeiros definitivos os felídeos, domésticos e selvagens (DUBEY, 1991).

Os ruminantes são importantes hospedeiros intermediários destes protozoários, e a toxoplasmose é considerada a maior causa infecciosa de abortamento em ovinos no mundo (INNES et al., 2009), e, além do aborto, esta doença leva a uma série de desordens reprodutivas, como reabsorção fetal, natimortos, mortalidade neonatal e nascimento de cordeiros fracos (FREYRE et al., 1997). Já a neosporose é responsável por levar a amplas perdas econômicas para a bovinocultura em muitos países, em decorrência de perdas fetais (LINDSAY et al., 1998; REICHEL, 2000). Para ovinos, apesar de menos frequente, a neosporose tem se mostrado cada vez mais comum para esta espécie, com relatos de detecção molecular deste agente mais frequente que a de *T. gondii*, com percentuais de 6,8 e 5,4%, respectivamente (MORENO et al., 2012).

As lesões provocadas em fetos abortados por uma destas enfermidades incluem, microscopicamente, alterações predominantemente em sistema nervoso central, músculo esquelético, coração, fígado e placenta, havendo infiltrados inflamatórios não supurativos multifocais associados a necrose (PEREIRA-BUENO et al., 2004). No entanto, muitas vezes não são visualizadas alterações microscópicas consistentes, especialmente em casos de autólise avançada (BUXTON, 1998). Em virtude da análise histopatológica ser prejudicada por fatores como autólise e congelamento, e também pela similaridade entre a patogenia e as lesões ocasionadas por estes protozoários, o seu diagnóstico requer a associação de múltiplas técnicas,

unindo a análise histopatológica com a avaliação molecular dos tecidos fetais e placentários (MORENO et al., 2012). A utilização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) traz alta sensibilidade e especificidade ao diagnóstico (DUBEY & SCHARES, 2006), e deve ser interpretada junto a possíveis alterações macro e microscópicas do feto abortado e da placenta, do histórico, e da exclusão de outros patógenos através da utilização de outros exames complementares, como cultivo bacteriano e PCR de causas virais de abortamento (MEIXNER et al., 2020).

Existem diversos trabalhos que confirmam a exposição de ovinos a estes protozoários no estado de Santa Catarina, através de análises sorológicas de diferentes propriedades, com relatos de soroprevalência para *T. gondii* no planalto catarinense de 55,9% (MOURA et al., 2015) e 56,94% de soropositividade no município de Lages (SAKATA et al., 2012); enquanto para *N. caninum*, 46,15% das propriedades com criação de ovinos no município de Lages possuem ao menos um animal soropositivo (ROSA, 2010). No entanto, sabe-se que a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* ou anti-*N. caninum* no soro materno é um indicativo apenas de exposição ao protozoário, e não permite concluir se o aborto foi ocasionado por um dos agentes; para isso, a avaliação dos tecidos fetais é essencial (DUBEY & LINDSAY, 2006).

Em vista da importância da toxoplasmose e neosporose como causa de abortamento, o objetivo do trabalho é determinar sua ocorrência através da análise histopatológica e detecção molecular em tecidos fetais. As informações obtidas permitirão tomar medidas preventivas para evitar perdas econômicas e melhoria na sanidade dos rebanhos.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Necropsia e coleta de materiais

No Laboratório de Patologia Animal (LAPA) do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/UDESC) foram recebidos produtos fetais de ovinos abortados para necropsia, juntamente com o histórico clínico e da propriedade de onde o feto foi encaminhado pelos médicos veterinários responsáveis. Durante a necropsia, efetuou-se a mensuração do comprimento crânio-coccígeo, possibilitando determinar a idade gestacional do feto, em semanas, estabelecendo em qual período da gestação ocorreu o abortamento (SIVACHELVAN et al. 1996). Em seguida, fez-se a avaliação externa do feto,

analisando mucosas e possíveis lesões, com posterior abertura das cavidades abdominal e torácica para visualização de todos os órgãos *in situ*, buscando por alterações macroscópicas. Neste momento, em embalagens plásticas estéreis, foram colhidos assepticamente fígado, pulmão, conteúdo abomasal e placenta, e posteriormente refrigerados ou congelados para envio ao isolamento bacteriano no Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA) do CAV/UEDESC. Amostras de encéfalo foram coletadas e posteriormente congeladas em microtubos para realização da PCR para *T. gondii* e *N. caninum*. Além disso, para realização de análise histopatológica, foram coletados fragmentos de pálpebra, fígado, pulmões, placenta, encéfalo, rins, coração, timo, baço, diafragma, músculo esquelético e abomaso, acondicionados em formalina tamponada a 10%.

4.2.2 Análise histopatológica

Os fragmentos de tecidos acondicionados em formalina tamponada a 10% foram clivados, incluídos em blocos de parafina e processados rotineiramente pela técnica de hematoxilina e eosina (HE), para visualização em microscopia óptica. Todos os órgãos foram avaliados, buscando lesões compatíveis que sugerissem quadros de toxoplasmose ou neosporose de acordo com Dubey & Lindsay, 1990.

4.2.3 Análise microbiológica

Quando haviam lesões histológicas sugestivas de processo infeccioso bacteriano, os fragmentos refrigerados ou congelados de placenta, fígado, pulmão e conteúdo de abomaso foram processados para isolamento bacteriano. A primeira etapa do isolamento foi composta pelo pré-enriquecimento do material com 4g do órgão e 196ml de água peptonada estéril em uma *bag*, seguida da homogeneização em um *Stomacher® 400 Circulator (Laboratory Blender)* e da incubação por 24h a 37°C. Após a incubação, as amostras foram inoculadas em placas com Ágar Sangue e McConkey em cultivo aeróbio por 48h a 37°C. Após o crescimento, era analisada a morfologia das colônias, que eram submetidas a provas bioquímicas para identificação do agente. As provas utilizadas foram Gram, Oxidase, TSI (*Triple Sugar Iron Agar*), Citrato, LIA (*Lisine Iron Agar*), SIM (*Sulphide Indol Motility*), FA (Fenilalanina) e Ureia. Os principais agentes rotineiramente pesquisados foram *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Escherichia coli*, *Campylobacter* sp., e *Salmonella* sp. O isolamento de *Brucella* sp. era 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. Além destes, outros agentes eram pesquisados, de acordo com o histórico específico da propriedade e do feto abortado e também das lesões macroscópicas e histológicas.

4.2.4 Análise molecular para *T. gondii*

Para extração do DNA, aproximadamente 5g de encéfalo de cada feto ovino abortado foi macerado individualmente e incubado com 500µL de tampão de lise e 5µ de proteinase K *overnight* a 42°C. Após, a extração do DNA foi realizada pelo método de fenol-clorofórmio. Os *primers* selecionados SAG2.F4/SAG2.R4 (59GCTACCTCGAACAGGAACAC39)/(59GCATCAACAGTCTTCGTTGC39), respectivamente, amplificaram separadamente as extremidades 59 e 39 do locus SAG2 de *T. gondii* com produtos de 340 pares de base (pb), de acordo com Moura et al. (2011). A reação foi realizada com um volume final de 20µL, contendo 2µL de tampão, 0,6µL de MgCl₂, 0,4µL de dNTP, 0,6µL do *primer* SAG2.F4, 0,4µL do *primer* SAG2.R4, 0,1µL de *Taq DNA Polymerase*, 1µL de DNA e 14,9µL de água ultrapura autoclavada. Subsequentemente, a amplificação ocorreu em termociclador com desnaturação inicial a 94°C por 3min, seguida por 40 ciclos a 94°C por 45seg para desnaturação, a 60.5°C por 30seg para anelamento, a 72°C por 40seg para extensão; e com extensão final a 72°C por 10 min. As amostras amplificadas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1,5% para visualização. Os controles positivos utilizados foram taquizoítos purificados de *T. gondii* e os controles negativos foram compostos por água ultrapura autoclavada.

4.2.5 Análise molecular para *N. caninum*

Para extração do DNA, como descrito previamente na análise molecular para *T. gondii*, aproximadamente 5g de encéfalo de cada feto ovino abortado foi macerada individualmente e incubada com 500µL de tampão de lise e 5µ de proteinase K *overnight* a 42°C. Depois, a extração do DNA foi realizada manualmente, seguindo o método de fenol-clorofórmio. Para PCR, a região Nc5 foi selecionada como a sequência alvo para amplificação de DNA. Os *primers* Np21/Np6 (5'-CCCAGTGCGTCCAATCCTGTA-3')/(5'-CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT-3') amplificaram um produto de 337pb, de acordo com Müller et al. (1996). Os

componentes das reações de PCR, condições do termociclador e da eletroforese são as mesmas descritas na seção 4.2.4 da PCR de *T. gondii*, com controle positivo composto por taquizoítos da cepa Nc-Bahia, e controle negativo por água ultrapura autoclavada.

4.2.6 Visita técnica às propriedades positivas

Mediante resultado anatomopatológico e/ou molecular positivos para toxoplasmose ou neosporose, foi realizada uma visita técnica pré-agendada, após comum acordo com o médico veterinário responsável pela propriedade e também com o produtor. Foi, então, aplicado um questionário junto ao ovinocultor, adaptado de Hein et al. (2012), abordando características gerais de propriedade, assim como aspectos do manejo reprodutivo, biosseguridade, instalações, condições sanitárias e controle de resíduos utilizados na propriedade, avaliando as características presentes nas propriedades positivas para alguma destas enfermidades (Apêndice I).

Um ano após a primeira visita a propriedade, foi efetuado novo contato com o ovinocultor, a fim de realizar um novo inquérito, avaliando se as medidas de controle e prevenção adotadas pelo produtor e médico veterinário foram efetivas e se os episódios de abortamento e desordens reprodutivas foram reduzidos ou eliminados.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Caracterização e origem dos fetos ovinos

Entre outubro de 2015 e outubro de 2020 foram avaliados 49 fetos ovinos, remetidos ao LAPA-CAV/UDESC. Destes, 77,55% (38/49) dos casos foram compostos pelo envio do feto para realização de necropsia nas instalações do laboratório, e 22,45% (11/49) foram colhidos a campo pelo médico veterinário responsável, remetendo os órgãos fixados em formalina 10% e refrigerados, para análise histopatológica e exames complementares, respectivamente. Quanto ao sexo dos fetos analisados, 40,82% (20/49) eram fêmeas e 46,94% (23/49) eram machos, e o restante, composto por 12,24% (6/49), não teve o sexo informado no histórico. A raça predominante foi a Lacaune (36,74% - 18/49), seguida de Texel (22,46% - 11/49), Mestiça (12,24% - 6/49), Dorper (6,12% - 3/49), Corriedale (4,08% - 2/49), Crioula e Hampshire, ambas com um caso (2,04% cada). Sete animais (14,28%) não possuíam

raça informada. As idades gestacionais determinadas através da mensuração crânio-coccígea encontram-se dispostas na Tabela 1.

Tabela 1. Idades gestacionais de fetos ovinos remetidos ao LAPA-CAV/UEDESC entre outubro de 2015 e outubro de 2020, determinadas através da mensuração do comprimento crânio-coccígeo.

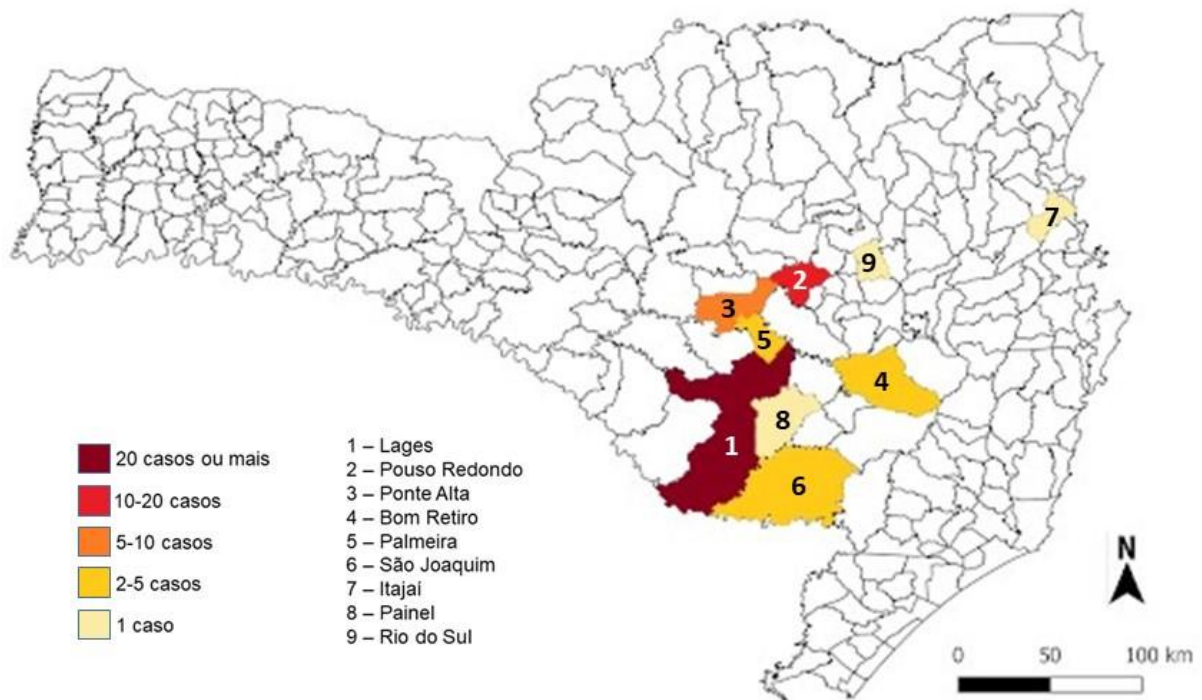
Idade gestacional	Varição de comprimento crânio-coccígeo	FR (%)	FA
18-20 semanas	41-54cm	42,86	21
15-17 semanas	33-40cm	16,33	8
12-14 semanas	24-32cm	12,24	6
9-11 semanas	15-20cm	8,16	4
6-8 semanas	14cm	2,04	1
Não informado	-	18,37	9
TOTAL	-	100	49

FR: Frequência relativa; **FA:** Frequência absoluta.

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Foram recebidos fetos ovinos de duas mesorregiões do estado de Santa Catarina, compostas pela Serrana (75,51% - 37/49) com a participação dos municípios de Lages, Ponte Alta, Bom Retiro, São Joaquim, Palmeira e Paniel, e o Vale do Itajaí (24,49% - 12/49), com envio de fetos dos municípios de Pouso Redondo, Itajaí e Rio do Sul. A disposição dos municípios com a respectiva quantidade de fetos remetidos encontra-se na Figura 3.

Figura 3. Distribuição de municípios que enviaram fetos ovinos para o LAPA CAV/UEDESC entre outubro de 2015 e outubro de 2020, com respectiva quantidade de casos por local.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

4.3.2 Diagnósticos das causas de abortamento em fetos ovinos

Do total de fetos ovinos necropsiados, foi possível estabelecer o diagnóstico em 57,14% dos animais (28/49). Destes, a doença prevalente, composta por 10 (35,71%) casos, foi a neosporose, seguida por oito (28,57%) casos de toxoplasmose.

4.3.2.1 Neosporose

Os casos de neosporose foram provenientes de três propriedades. Os municípios de origem foram Lages, na mesorregião serrana, com 70% dos casos (7/10), oriundos de uma propriedade com o envio de 12 fetos, dos quais sete possuíram alterações compatíveis com a enfermidade (Caso 1); e Pouso Redondo, no Alto Vale do Itajaí, com 30% (3/10), havendo um caso com o envio de dois fetos provenientes de uma gestação gemelar (Caso 2), e um caso com o envio de um feto em outra propriedade (Caso 3). Quanto ao sexo, cinco fetos (50%) eram machos e quatro (40%) fêmeas, e em um feto o sexo não foi informado. A raça predominante foi a Lacaune (70% - 7/10), seguida pela Dorper (20% - 2/10) e em um feto a raça não foi informada. Dentre as idades gestacionais, a mais visualizada foi entre 18 e 20

semanas (60% - 6/10), seguida por um caso (10%) com gestação entre 15 e 17 semanas, e dois casos (20%) com período gestacional entre 9 e 11 semanas. Um feto não teve idade gestacional informada.

Macroscopicamente, os fetos enviados possuíam diferentes graus de autólise, e foram visualizados um caso de mumificação fetal e um caso de maceração fetal em um parto gemelar (Figura 4). Nos demais fetos, foram evidenciadas apenas alterações inespecíficas, incluindo edema e hemorragia focalmente extensos localizados em subcutâneo, variando de moderados a acentuados (20% - 2/10) e líquido serosanguinolento localizado em cavidade abdominal e torácica, com quantidades variando de discreta a acentuada (20% - 2/10). Em quatro casos (40%) a placenta foi enviada para análise, sem alterações macroscópicas em todos os casos.

Figura 4. Fetos da espécie ovina, gestação gemelar. Maceração, à esquerda, e mumificação fetal, à direita, em abortamento ocasionado por *Neospora caninum*.

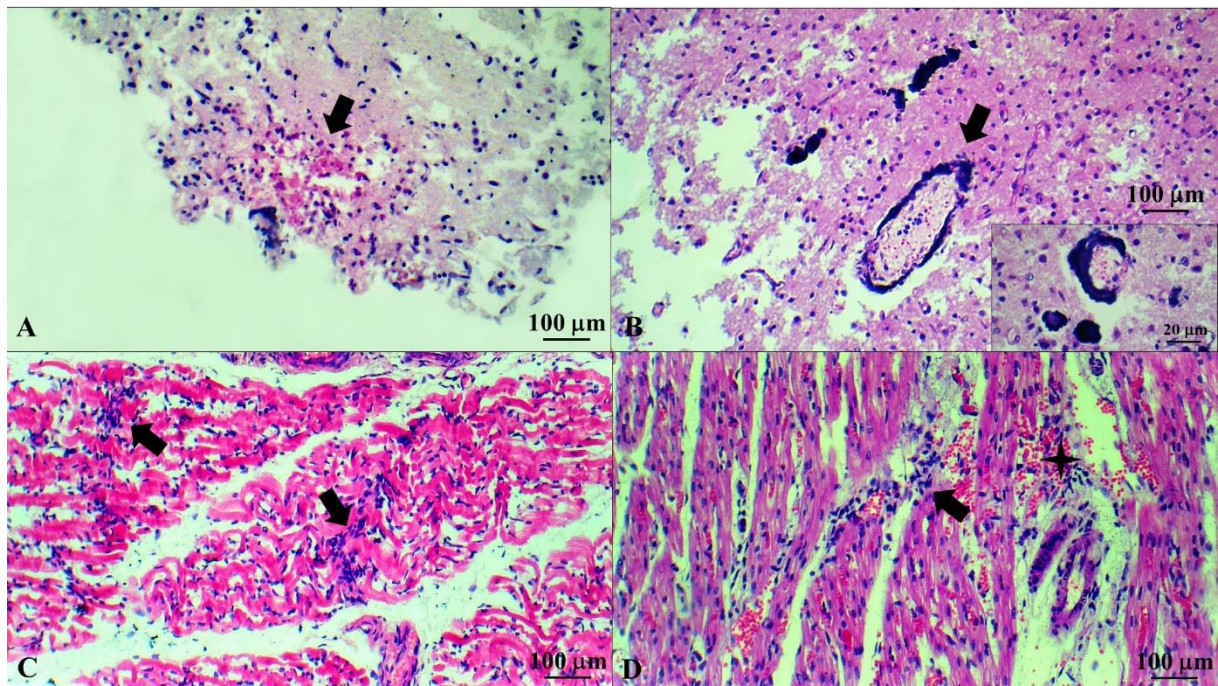


Fonte: A própria autora, 2020.

Microscopicamente, as lesões visualizadas nos casos de neosporose restringiram-se ao encéfalo, músculo esquelético e coração, e, foram compostas, respectivamente, por encefalite necrotizante linfoplasmocitária multifocal discreta (Figura 5A) associada a focos de mineralização, especialmente da parede de vasos (10% - 1/10) (Figura 5B), gliose multifocal discreta (10% - 1/10) a moderada (10% - 1/10), miosite linfoplasmocitária multifocal discreta (40% - 4/10) (Figura 5C) a moderada (20% - 2/10); miocardite linfoplasmocitária multifocal discreta (40% - 4/10)

a moderada (10% - 1/10), por vezes acompanhada por áreas focais de hemorragia (10% - 1/10) (Figura 5D). Um dos casos em que foi remetida a placenta para análise, possuía placentite linfoplasmocitária multifocal discreta associada a focos de necrose. Na análise por PCR de encéfalo, houveram resultados positivos para detecção de *N. caninum* em cinco casos (50% - 5/10).

Figura 5. Neosporose como causa de abortamentos em ovinos do estado de Santa Catarina. **A) Encéfalo:** encefalite necrotizante linfoplasmocitária focal discreta (seta). Obj. 10x. **B) Encéfalo:** mineralização multifocal moderada, predominantemente de vasos sanguíneos (seta). Obj. 10x. **No detalhe:** mineralização em maior aumento. Obj. 40x. **C) Músculo esquelético:** miosite linfoplasmocitária multifocal discreta (setas). Obj. 10x. **D) Coração:** miocardite linfoplasmocitária multifocal discreta (seta) acompanhada por hemorragia focal discreta (estrela). Obj. 10x. Hematoxilina e Eosina.



Fonte: A própria autora, 2020.

No Caso 1, havendo um surto com histórico de mais de 20 abortamentos ovinos e envio de 12 fetos, houveram alterações histopatológicas e/ou detecção molecular de *N. caninum* em sete animais (58,33%), e, os cinco animais restantes não puderam ser considerados casos de neosporose por não possuírem alterações sugestivas da enfermidade e/ou resultados positivos na PCR. O Caso 2 possui histórico de um surto composto por cinco abortamentos na propriedade, no entanto com o envio apenas de dois produtos da mesma ovelha, com associação entre achados histopatológicos e moleculares em um dos fetos, e considerando seu irmão também um caso de neosporose, mesmo sem alterações, por tratar-se de um parto gemelar. O Caso 3,

que ocorreu de maneira esporádica na propriedade, foi determinado através da detecção molecular de *N. caninum*, não havendo alterações histopatológicas em virtude do avançado estado de autólise. A distribuição dos casos de neosporose com a associação dos achados histopatológicos e moleculares encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2. Distribuição individual dos abortamentos ovinos ocasionados por *Neospora caninum* diagnosticados pelo LAPA-CAV/UEDESC entre outubro de 2015 e outubro de 2020, com respectivas alterações histopatológicas e resultados de análise molecular.

FETO	ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS			PCR <i>N. caninum</i>
	Músculo esquelético	Coração	Encéfalo	
CASO 1 – Lages/SC				
1	+	-	-	Positivo
2	-	+	+	Negativo
3	-	-	+	Positivo
4	++	++	++	Positivo
5	+	+	-	Negativo
6	+	+	-	Negativo
7	+	+	-	Negativo
CASO 2 – Pouso Redondo/SC				
8 (MA)	-	-	-	Negativo
9 (MU)	++	-	-	Positivo
CASO 3 – Pouso Redondo/SC				
10 (AA)	-	-	-	Positivo

Intensidades das lesões: ausente (-); discreta (+); moderada (++); acentuada (+++).

MA: maceração fetal; **MU:** mumificação fetal; **AA:** autólise acentuada.

Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

A caracterização das propriedades de criação de ovinos acometidas por neosporose encontra-se na Tabela 3. As três propriedades possuíam assistência de médicos veterinários, quando solicitado, e apresentavam, como principais problemas sanitários, transtornos reprodutivos, seguidos de verminose e mastite. A propriedade do Caso 1, que relatou mais de 20 perdas fetais, atingindo um índice de abortamento de cerca de 33,33%, possuía criação concomitante de bovinocultura de corte, e foram relatados problemas relacionados a neosporose também nesta espécie. O livre acesso de cães, pertencentes a propriedade ou a vizinhos, foi visualizado em todas as propriedades (Figura 6), bem como a rara circulação de animais selvagens, como o graxaim-do-mato (*Cerdocyon thous*), a onça-parda (*Puma concolor*) e javalis (*Sus scrofa*).

Tabela 3. Caracterização de propriedades de ovinos com transtornos reprodutivos associados a infecção por *Neospora caninum* diagnosticados pelo LAPA-CAV/UDESC entre outubro de 2015 e outubro de 2020.

CARACTERÍSTICA	CASO 1	CASO 2	CASO 3
Tamanho (ha)	145	13	34
Uso para ovinocultura (ha)	12	6	12
Plantel total de ovinos	60	60	13
Aptidão	Corte e leite	Corte	Corte
Sistema de criação	Extensiva	Semi-intensivo	Semi-intensivo
Criação de outros animais	Bovinicultura de corte	Não	Bovinicultura de corte
Aquisição de animais	Reposição própria	Mista (compra + reposição própria)	Reposição própria
Abortamentos	>20 casos	5 casos	1 caso
Período gestacional	Quarto e quinto mês	Quarto e quinto mês	Quinto mês
Idade reprodutiva das mães	Primíparas e múltiparas	Primíparas e múltiparas	Múltipara
Nascimento de cordeiros fracos	3 casos	2 casos	2 casos
Destino de restos/lóquios fetais	Decompõem no ambiente	Enterrados	Enterrados
No. Cães na propriedade	0	6	5
Acesso de cães de vizinhos	Sim	Sim	Sim
Acesso de cães às instalações e pastagens	Sim, livre	Sim, livre	Sim, livre
Ingestão de lóquios fetais por cães	Sim, frequentemente	Sim, esporadicamente	Sim, esporadicamente
Circulação de animais selvagens	Sim, rara	Sim, rara	Sim, rara

Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

Figura 6. Caracterização de propriedade de ovinos com transtornos reprodutivos associados a infecção por *Neospora caninum* (Caso 2 – município de Pouso Redondo/SC). Livre acesso de cães às pastagens dos ovinos.



Fonte: A própria autora, 2020.

Em novo inquérito, realizado um ano após o primeiro contato com as propriedades com diagnóstico de neosporose, constatou-se redução significativa da taxa de abortamentos nas propriedades do Caso 1 e Caso 2. Na propriedade do Caso 2, não foram mais relatados abortamentos no ano seguinte, havendo o descarte das ovelhas que haviam abortado no ano anterior, enquanto o contato dos cães da propriedade com as instalações e pastagens tornou-se restrito, e enterrar os restos e lóquios fetais após as parições permaneceu sendo a forma de descarte. Já na propriedade do Caso 1, foi relatado apenas um abortamento no ano posterior, em uma ovelha primípara. As demais ovelhas, que haviam abortado no ano anterior, foram descartadas. O acesso de cães de propriedades vizinhas permaneceu inalterado, bem como o descarte dos restos fetais e placentários, deixados para decompor no ambiente. Na propriedade do Caso 3 não foram registrados novos casos de abortamentos ou quaisquer outros transtornos reprodutivos no ano seguinte.

4.3.2.2 Toxoplasmose

Os oito casos de Toxoplasmose tiveram origem em quatro propriedades. Os municípios de origem dos surtos foram Ponte Alta (Caso 1), na mesorregião serrana, com o envio de cinco fetos e alterações compatíveis em quatro, correspondendo a 50% dos casos totais (4/8), seguido de Pouso Redondo (Caso 2), no Alto Vale do Itajaí, com o envio de quatro fetos, sendo dois com lesões compatíveis, correspondendo a 25% dos casos totais (2/8), Palmeira, na mesorregião serrana, com o envio de um feto ovino (Caso 3), e Rio do Sul, no Alto Vale do Itajaí, também com o envio de um caso (Caso 4). Quanto ao sexo, quatro fetos (50%) eram fêmeas e três (37,5%) machos, e um feto não teve o sexo informado (12,5%). As raças foram compostas por mestiça (4/8 – 50%) e Texel (3/8 – 37,5%), enquanto um feto não teve sua raça informada. As idades gestacionais foram compostas por 12 a 14 semanas de gestação (3/8 – 37,5%) e de 15 a 17 semanas de gestação (3/8 – 37,5%). Houveram, ainda, dois casos em que a idade gestacional não foi informada (2/8 – 25%).

Macroscopicamente, assim como nos casos de neosporose, os fetos encontravam-se em diferentes estados de autólise. Foi visualizado um caso de prognatismo (Figura 7) e um caso de atresia vaginal, ambos fetos pertencentes ao Caso 2, no município de Pouso Redondo. Nos fetos pertencentes ao Caso 1, no município de Ponte Alta, foram evidenciados um caso de maceração fetal, além de fetos com alterações inespecíficas, que incluem edema cervical ventral e torácico cranial focalmente extenso, moderado (2/8 – 25%) e moderada quantidade de líquido serosanguinolento em cavidade abdominal (3/8 – 25%). Em apenas um caso (12,5%) a placenta foi enviada para análise laboratorial, e não demonstrou alterações macroscópicas.

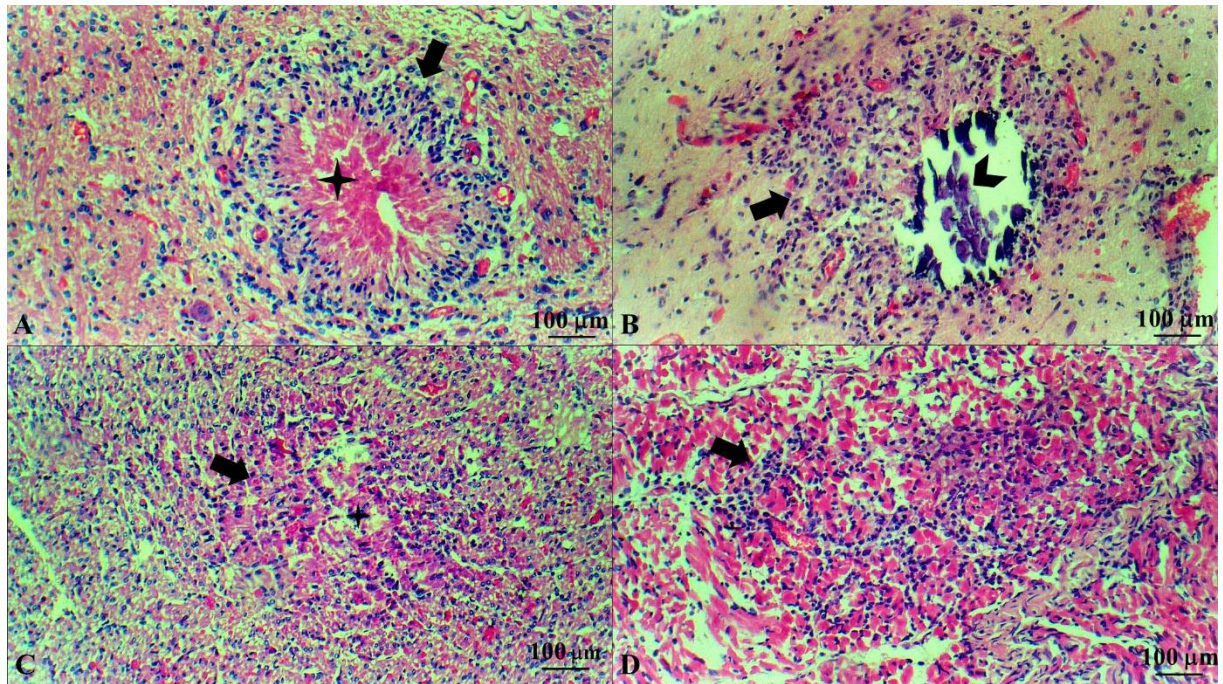
Figura 7. Feto ovino, fêmea, pertencente a uma propriedade com abortamentos por *Toxoplasma gondii* (Caso 2). Prognatismo (seta). No detalhe: rebatimento de pele evidenciando o prognatismo.



Fonte: A própria autora, 2020.

Microscopicamente, as lesões visualizadas nos casos de toxoplasmose situaram-se em encéfalo, coração e músculo esquelético, e, foram compostas, respectivamente, por encefalite necrotizante linfoplasmocitária multifocal acentuada (50% - 4/8) (Figura 8A), por vezes associada a mineralização (12,5% - 1/8) (Figura 8B) e gliose multifocal discreta (12,5% - 1/8); miocardite linfoplasmocitária multifocal discreta (37,5% - 3/8), acompanhada por necrose focal discreta de cardiomiócitos (12,5% - 1/8) (Figura 8C) e miosite linfoplasmocitária multifocal discreta (12,5% - 1/8) a moderada (12,5% - 1/8) (Figura 8D). Na análise por PCR de encéfalo, houveram resultados positivos para detecção de *T. gondii* em quatro casos (50%).

Figura 8. Toxoplasmose como causa de abortamentos em ovinos do estado de Santa Catarina. **A) Encéfalo:** encefalite necrotizante (estrela) focal acentuada, circundada por infiltrado linfoplasmocitário (seta). Obj. 10x. **B) Encéfalo:** encefalite necrotizante acompanhada por mineralização (cabeça de seta) focal acentuada, circundada por infiltrado linfoplasmocitário (seta). Obj. 10x. **C) Coração:** miocardite linfoplasmocitária focal discreta (seta) acompanhada por necrose de cardiomiócitos focal discreta (estrela). Obj. de 10x. **D) Músculo esquelético:** miosite linfoplasmocitária multifocal moderada (seta). Obj. 10x. Hematoxilina e Eosina.



Fonte: A própria autora, 2020.

No Caso 1, com histórico de um surto de 14 abortamentos ovinos, houve o envio de cinco fetos, com a associação entre achados histopatológicos e/ou moleculares em quatro (80%), enquanto no Caso 2, caracterizado por um surto de 15 abortamentos ovinos, houve envio de quatro animais, com alterações histopatológicas e/ou detecção molecular de *T. gondii* em dois (50%). Os animais restantes, para ambos os casos, não foram considerados toxoplasmose pela ausência de alterações histopatológicas e/ou moleculares compatíveis. Os Casos 3 e 4, ocorridos de forma esporádica nas propriedades, possuíam grau avançado de autólise, impossibilitando a visualização histológica dos tecidos, porém com detecção através da PCR de encéfalo. A distribuição dos casos de toxoplasmose com a associação dos achados histopatológicos e moleculares encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4. Distribuição individual dos abortamentos ovinos ocasionados por *Toxoplasma gondii* diagnosticados pelo LAPA-CAV/UEDESC entre outubro de 2015 e outubro de 2020, com respectivas alterações histopatológicas e resultados de análise molecular.

FETO	ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS			PCR <i>T. gondii</i>
	Músculo esquelético	Coração	Encéfalo	
CASO 1 – Ponte Alta/SC				
1	+	+	+++	Negativo
2	++	+	+++	Positivo
3	-	-	+++	Negativo
4 (MA)	-	+	+++	Negativo
CASO 2 – Pouso Redondo/SC				
5	-	-	-	Positivo
6	-	-	++	Negativo
CASO 3 – Palmeira/SC				
7 (AA)	-	-	-	Positivo
CASO 4 – Rio do Sul/SC				
8 (AA)	-	-	-	Positivo

Intensidades das lesões: ausente (-); discreta (+); moderada (++); acentuada (+++).

MA: maceração fetal; **AA:** autólise acentuada.

Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

A caracterização das propriedades de criação de ovinos acometidas por toxoplasmose encontra-se na Tabela 5. As quatro propriedades possuíam assistência de médicos veterinários, quando solicitado. As propriedades que relataram surtos de abortamentos possuíam, além dos transtornos reprodutivos, verminoses e problemas de cascos como principais desordens sanitárias. As propriedades dos Casos 3 e 4 não relataram quaisquer outros problemas sanitários no rebanho. Na propriedade do Caso 2, foi relatado um caso de toxoplasmose humana, em uma pessoa imunocompetente, que residia na localidade vizinha, com sintomatologia composta por linfadenomegalia generalizada e febre persistente. Já na propriedade do Caso 3, relata-se uma ninhada de felinos no local no mesmo período em que houve o abortamento em um ovino. Em todas as quatro propriedades, havia a circulação de felinos em meios às pastagens e instalações, como no aprisco, e a circulação de animais selvagens, com espécies predominantes semelhantes às relatadas nas propriedades com casos de neosporose.

Tabela 5. Caracterização de propriedades de ovinos com transtornos reprodutivos associados a infecção por *Toxoplasma gondii* diagnosticados pelo LAPA-CAV/UEDESC entre outubro de 2015 e outubro de 2020.

CARACTERÍSTICA	CASO 1	CASO 2	CASO 3	CASO 4
Tamanho (ha)	46	24	12	300
Uso para ovinocultura (ha)	13	6,5	12	10
Plantel total de ovinos	69	70	60	40
Aptidão	Corte	Corte	Corte	Lazer
Sistema de criação	Extensivo	Semi-confinamento	Extensivo	Extensivo
Criação de outros animais	Bovinocultura de corte, Avicultura e Suinocultura	Não	Não	Bovinocultura de corte
Aquisição de animais	Mista (compra + reposição própria)	Reposição própria	Reposição própria	Mista (compra + reposição própria)
Abortamentos	14 casos	15 casos	1 caso	1 caso
Período gestacional	Quinto mês	Quarto e quinto mês	Quinto mês	Quinto mês
Idade reprodutiva das mães	Primíparas e múltiparas	Primíparas e múltiparas	Múltipara	Múltipara
Nascimento de cordeiros fracos	1 caso	2 casos	2 casos	Não
Destino de restos/lóquios fetais	Decompõem no ambiente	Enterrados	Enterrados	Compostagem
No. Gatos na propriedade	1	4	2	2
Acesso de gatos de vizinhos	Sim	Sim	Sim	Sim
Acesso de gatos às instalações e pastagens	Sim, livre	Sim, livre	Sim, livre	Sim, livre
Ingestão de lóquios fetais por gatos	Sim, esporadicamente	Nunca visualizado	Nunca visualizado	Nunca visualizado
Circulação de animais selvagens	Sim, frequentemente	Sim, raramente	Sim, raramente	Sim, frequentemente

Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

Na propriedade do Caso 1, foi possível estabelecer novo contato um ano após o envio dos fetos para análise, e, dos ovinos que apresentaram abortamento no ano anterior, sete foram descartados, e, dentre os que permaneceram na propriedade, não foram relatados abortamentos novamente, com apenas um caso em uma ovelha primípara. De acordo com os produtores, foi possível efetuar diversas alterações no manejo, possibilitando a redução, também, de outros problemas sanitários relatados, como verminoses e problemas de casco. Outra alteração realizada foi o descarte correto de lóquios fetais, antes deixados para decompor no ambiente, e agora enterrados. O acesso de felinos da propriedade e de propriedades vizinhas permaneceu inalterado, no entanto, não foi visualizada a circulação de novos animais em relação ao ano anterior.

4.4 DISCUSSÃO

Dos 49 fetos ovinos avaliados neste estudo, a doença mais visualizada foi a neosporose seguida da toxoplasmose, assim como o observado em estudos anteriores que também determinaram a frequência destas enfermidades como causas de abortamento em fetos de pequenos ruminantes, havendo prevalência de neosporose (6,8%) em relação a toxoplasmose (5,4%) (MORENO et al., 2012). Considerada a principal causa infecciosa de abortamentos em bovinos no mundo, levando a grandes prejuízos econômicos devido a perdas reprodutivas (DUBEY & SCHARES, 2011), a neosporose passou a ser cada vez mais relatada também em ovinos e caprinos (DUBEY & LINDSAY, 1990; KOBAYASHI et al., 2001; WEST et al. 2006; MORENO et al. 2012; GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2014), e, assim como neste estudo, demonstram a crescente importância desta enfermidade para ovinos.

A prevalência da infecção de *N. caninum*, determinada através de PCR em fetos ovinos, varia de 2% (MASALA et al., 2007) a 18,9% (HUGHES et al., 2006), inferiores ao percentual de 35,71% encontrado; a toxoplasmose, principal causa de abortamentos em ovinos no mundo (INNES et al., 2009), já foi mais frequente em relação a neosporose em pesquisas anteriores (MASALA et al., 2007), porém seus percentuais de detecção foram inferiores aos evidenciados neste estudo, com 8,7% para diagnóstico histopatológico e 6,9% de detecção através de PCR (PEREIRA-BUENO et al., 2004). No entanto, o alto percentual visualizado para ambas enfermidades pode justificar-se pela presença de dois surtos de neosporose e dois de toxoplasmose, e não apenas casos individuais, o que leva a um alto número de fetos

enviados para análise de uma mesma propriedade, culminando com o aumento na quantidade de casos destas doenças. Outro aspecto que influencia na ocorrência destas enfermidades é a associação de mais de uma técnica diagnóstica, ou seja, análise histopatológica e PCR, aumentando a possibilidade de detecção destes agentes, o que é recomendado em virtude da similaridade entre estes protozoários (MORENO et al., 2012).

As idades gestacionais observadas nos casos de neosporose e toxoplasmose, variaram de períodos iniciais, até fetos a termo. Sabe-se que, embora a maioria dos abortamentos ocorra em ovelhas primo-infectadas por *T. gondii* entre 60 e 90 dias de gestação (DUBEY et al., 1998), os abortos podem ocorrer em qualquer período, evidenciado em um estudo anterior onde fetos ovinos abortados em decorrência de toxoplasmose possuíam comprimentos variando de 6 a 54cm (HURTADO et al., 2001). No caso de neosporose, o abortamento dependerá do momento em que ocorre a infecção ou a sua recrudescência, e a inoculação experimental de taquizoítos em ovelhas prenhes demonstrou 100% de abortamentos nas ovelhas com 65 dias de gestação, enquanto houve o nascimento de cordeiros saudáveis, porém infectados com *N. caninum*, nas ovelhas que se encontravam com 120 dias de gestação no momento da inoculação (MCALLISTER et al., 1996).

Esta diferença na ocorrência de abortos é influenciada pelas condições imunológicas do feto, consideradas rudimentares do início ao meio da gestação, havendo a ocorrência de natimortos, nascimento de cordeiros fracos ou de cordeiros infectados, porém hígidos, quando infectados mais ao final da gestação (MCALLISTER et al., 1996; WILLIAMS et al., 2000; DUBEY et al., 2006). Conforme relatado por todas as propriedades avaliadas, o nascimento de cordeiros fracos pode estar associado a ocorrência destas enfermidades.

Achados como líquido serosanguinolento nas cavidades torácica e abdominal ou edema e hemorragia localizados em subcutâneo, são comumente observados em fetos abortados de ruminantes (PEREIRA et al., 2013), assim como evidenciados em alguns dos fetos avaliados no estudo. Estas alterações são atribuídas principalmente ao processo de autólise fetal ou decorrentes de um congelamento prévio à análise, havendo a formação de líquido livre em cavidade torácica cerca de 24 a 144 horas após a morte, e na cavidade abdominal há a formação de líquido até 16 horas após a morte fetal (PÉREZ et al., 2003), e devido a isso, não podem ser considerados achados específicos para causas infecciosas de abortamento (PEREIRA et al., 2013).

Alterações macroscópicas, como mumificações e macerações fetais podem ser evidenciadas tanto em casos de toxoplasmose como de neosporose, com relatos de detecção de *N. caninum* em até 25% de fetos bovinos mumificados através de PCR (GHANEM et al., 2009). A mumificação fetal já foi relatada, também, em um surto de neosporose em um rebanho ovino na Argentina (HECKER et al., 2019). Já em casos de toxoplasmose ovina, a mumificação e a maceração fetal são esperados quando a infecção ocorre, principalmente, entre 40 e 120 dias de gestação (GIVENS & MARLEY, 2008).

Alguns eventos são necessários para que a mumificação ocorra, como a infecção e morte fetal após o desenvolvimento ósseo, a reabsorção rápida de fluidos uterinos e fetais, a ausência de oxigênio no ambiente uterino até o processo de mumificação estar completo, e a ausência de populações bacterianas, com a permanência da cérvix fechada para evitar a entrada de bactérias presentes no canal vaginal (DROST, 2007). Já na maceração fetal, é necessária a presença de oxigênio e bactérias que levem ao processo de putrefação (LEFEBVRE, 2015). Não há relatos prévios que apontem casos de maceração e mumificação fetal ocorrendo simultaneamente em gestações gemelares de ovinos, e dentre as hipóteses para esta ocorrência, sugere-se que, em virtude destas gestações serem dicoriônicas, pode ter ocorrido a entrada de micro-organismos que levem à putrefação apenas em uma das placentas, promovendo a maceração de um dos fetos. A outra hipótese é a de que o feto mumificado poderia estar presente desde uma gestação prévia, e foi expulso juntamente com o feto macerado, sendo um evento comumente visualizado em suínos e cães (GRUNERT & BIRGEL, 1982).

Focos necróticos na placenta visualizados macroscopicamente como placas esbranquiçadas são relatados em casos de abortamento por estes protozoários (BENAVIDES et al., 2017), no entanto, nos casos estudados não foi possível visualizá-los, podendo ser explicado pela escassez no envio de placentas para análise, e pelo alto grau de autólise em muitas delas, visto que os fetos podem estar mortos no útero de 24 a 48 horas antes da expulsão (GIVENS & MARLEY, 2008). O não-envio da placenta para análises laboratoriais limita as chances de diagnósticos conclusivos em causas de abortamento, visto que os agentes infecciosos podem multiplicar-se na placenta antes de levar ao abortamento (PÉREZ et al., 2003).

Anomalias como os casos de prognatismo e atresia vaginal evidenciados no Caso 2 de toxoplasmose, já foram atribuídas anteriormente a infecção por *T. gondii*

em um feto ovino abortado, que possuía hidrocefalia e escoliose (WOODS & ANDERSON, 1992). O prognatismo, definido como a projeção rostral da mandíbula, é uma alteração frequentemente visualizada em rebanhos de pequenos ruminantes, podendo ser atribuída, além de causas infecciosas, a alterações genéticas e consanguinidade entre os animais, e recomenda-se eliminá-los do rebanho em virtude da dificuldade na alimentação e por sua alta herdabilidade (MAGALHÃES et al., 2008). Casos de atresia vaginal em ovinos são raros, com relatos mais comuns de atresia anal associada a fístulas retro-vaginais, passíveis de correção cirúrgica e atribuídas, na maioria das vezes, a causas genéticas (ANTONIOLI et al., 2017).

As alterações microscópicas visualizadas em fetos abortados neste estudo são compatíveis com as lesões mais comumente observadas em casos de neosporose e toxoplasmose, compostas, no sistema nervoso central, por encefalite necrotizante não-supurativa, multifocal (HURTADO et al., 2001; DUBEY, 2003) com áreas de gliose multifocais (DUBEY et al., 1990; JENKINS et al., 2002), além de focos de infiltrado linfoplasmocitário mais frequente em musculatura esquelética e cardíaca, mas também podendo ocorrer em fígado e placenta, por vezes, com a associação de focos necróticos (PEREIRA-BUENO et al., 2004). De forma geral, as lesões em músculo esquelético e coração foram mais frequentes em casos de neosporose no presente estudo. Casos de miosite e miocardite em fetos ovinos abortados por *N. caninum* são frequentemente relatados (DUBEY & LINDSAY, 1990), no entanto não há estudos que demonstrem as razões para tal predileção de *N. caninum* por músculo esquelético e coração em ovinos em relação a *T. gondii*, e, em virtude da distribuição multifocal destes protozoários, a detecção de suas lesões através de análise histopatológica nem sempre é possível (PEREIRA-BUENO et al., 2004), podendo justificar a menor frequência de lesões musculares e miocárdicas decorrentes de toxoplasmose. Outro fator que pode contribuir com a maior frequência de lesões musculares e miocárdicas é o estado de autólise do sistema nervoso central, muitas vezes já de aspecto liquefeito durante a necropsia, impossibilitando sua visualização histológica adequada (BUXTON, 1991).

Por sua vez, as lesões encefálicas dos casos de toxoplasmose demonstraram-se mais comuns e mais acentuadas que as de neosporose. O mesmo já foi evidenciado anteriormente em caprinos, cujos abortamentos em decorrência de *N. caninum* demonstraram apenas focos de gliose em encéfalo (MORENO et al., 2012), como evidenciado nos fetos ovinos com neosporose, que possuíam focos de gliose

em sua maioria discretos, associados a áreas de necrose discretas. A mineralização multifocal visualizada nos casos de neosporose, já foi relatada anteriormente associada a focos de necrose encefálica em bovinos e caprinos (BARR et al., 1992; DUBEY et al., 1998). Em contrapartida, os casos de toxoplasmose em ovinos demonstraram focos de necrose central bem evidenciados, por vezes com centro mineralizado, e envolto por células inflamatórias mononucleares, de acordo com o observado por estudos anteriores (HURTADO et al., 2001; MEIXNER et al., 2020). Comparativamente, o padrão lesional visualizado nos casos de toxoplasmose ovina assemelha-se aos focos de encefalite necrotizante ocasionados por *N. caninum* em bovinos (COSTA, 2020). Fatores que podem levar a uma menor intensidade ou até ausência de lesões microscópicas em fetos acometidos por essas enfermidades, são os processos de autólise fetal, dificultando a visualização histológica dos tecidos, e a cronologia da infecção por um desses protozoários, podendo contribuir para uma menor extensão das lesões demonstradas (BUXTON, 1991).

Sabe-se que um feto fresco possui até 53 vezes maiores chances de obtenção de diagnósticos definitivos em relação a fetos autolisados (SCHLAFER et al., 2015), porém as chances de serem coletados ainda em boas condições após o abortamento são baixas em virtude da rápida autólise, da demora na coleta a campo e remetimento muitas vezes em condições inadequadas de armazenamento. O alto número de fetos em avançado estado de autólise já foi observado também em outros trabalhos. No Brasil, Pereira et al. (2013), analisando fetos abortados de pequenos ruminantes, classificaram 60,87% dos animais como muito autolisados, enquanto na Noruega, Engeland et al. (1998), observaram que 65% dos fetos caprinos avaliados estavam acentuadamente decompostos. Este fator é o principal ponto limitante no diagnóstico das causas de abortamento, e pode ser a razão pela qual neste estudo houve um caso de neosporose e três casos de toxoplasmose com detecção dos protozoários através da PCR, porém sem lesões histológicas. Os quatro casos demonstravam alto grau de autólise, impossibilitando a distinção adequada da arquitetura e populações celulares dos órgãos avaliados.

Apesar de essencial, apenas a avaliação histopatológica dos tecidos fetais e placentários não é suficiente para diferenciar a infecção ocasionada por *T. gondii* e *N. caninum* em virtude da similaridade entre as lesões (DUBEY & LINDSAY, 1990; MCALLISTER et al., 1996; MORENO et al., 2012). A utilização da PCR, se mostra importante para a confirmação do diagnóstico (DUBEY, 2003), como realizado no

estudo. Esta técnica vem sendo cada vez mais utilizada na rotina de diagnóstico destas causas de abortamento em ovinos, e, quando comparada a histopatologia e a técnicas sorológicas, se mostra mais sensível e específica, especialmente por ser capaz de detectar o DNA destes protozoários, que são fortemente resistentes à degradação, permitindo o diagnóstico mesmo em tecidos intensamente autolisados, que já não estariam em condições adequadas para avaliação histopatológica ou imuno-histoquímica (HURTADO et al., 2001). Em contrapartida, quatro casos de neosporose e de toxoplasmose possuíram lesões características de infecção por um destes protozoários e obtiveram resultados negativos na PCR, o que já foi visualizado em estudos anteriores, e esta discrepância pode ser justificada pela distribuição do protozoário nos tecidos, havendo diferenças na representatividade da amostra de encéfalo colhida para análise histopatológica e para PCR, havendo o DNA parasitário em um fragmento, e lesões características em outro (PEREIRA-BUENO et al., 2004; MORENO et al., 2012).

A imuno-histoquímica é uma técnica utilizada como auxílio na confirmação da infecção por *N. caninum* ou *T. gondii*, no entanto, possui a desvantagem de apresentar frequentemente reações cruzadas entre estes dois parasitos, reduzindo a sua eficácia no diagnóstico conclusivo destas enfermidades (SUNDERMANN et al., 1997; DUBEY, 2003). Em ovinos, relata-se a detecção imuno-histoquímica de *T. gondii* em cotilédones, coração, pulmões, encéfalo e músculo esquelético de fetos (UGGLA et al., 1987). Para bovinos com neosporose, comparando-a com a técnica de PCR em tecidos fetais, a utilização de imuno-histoquímica foi menos sensível e menos específica para a detecção de *N. caninum* (VAN MAANEN et al., 2004).

Na caracterização das propriedades acometidas por *N. caninum*, foram evidenciados diversos tamanhos de propriedades e diferentes graus de tecnificação, e a aptidão predominante foi de corte, no entanto, não há nenhuma associação entre diferentes raças para a ocorrência da neosporose (ROMANELLI et al., 2007). Foi relatada tanto a ocorrência de surtos quanto casos esporádicos, corroborando com as diferentes formas de manifestação de neosporose dentro das propriedades. Pode ocorrer de maneira epidêmica no caso de surtos, quando há contato e infecção primários pelo protozoário durante a gestação de animais que ainda não haviam sido expostos, possivelmente de uma mesma fonte e no mesmo período, levando a uma grande taxa de abortamento, podendo chegar a 10% (DAVISON et al., 1999; MCALLISTER et al., 2000). Esta forma já foi demonstrada em um surto de neosporose

em ovinos da raça Santa Inês, relatado no Mato Grosso do Sul, resultando em 10 abortamentos em um rebanho de 268 animais, com confirmação através de marcação imuno-histoquímica de tecidos fetais (PINTO et al., 2012). A forma epidêmica foi evidenciada principalmente no Caso 1, com a ocorrência de mais de 20 abortamentos em um curto período de tempo, chegando a um índice de abortamentos de aproximadamente 33,33%, e também no Caso 2, apesar de possuir um menor número de abortamentos. A maneira esporádica, que ocorre como casos isolados, é relatada apenas casualmente dentro do rebanho (GOODSWEN et al., 2013), como ocorreu no Caso 3.

No Caso 1 foi relatada, também, a criação concomitante de bovinos de corte, com problemas reprodutivos associados a neosporose. Por se tratarem de duas espécies que atuam como importantes hospedeiros intermediários na manutenção do ciclo de *N. caninum*, acredita-se que a criação simultânea de bovinos e ovinos pode se tornar um potencial fator de risco no aspecto epidemiológico da enfermidade na propriedade (VOGEL et al., 2006). A visualização de abortamentos tanto em primíparas quanto em múltiparas nas propriedades avaliadas é compatível com a capacidade de *N. caninum* em manter uma infecção crônica no rebanho, havendo sua passagem transplacentária por diversas gerações, e, também, pela sua alta habilidade em levar a recrudescência da infecção em diferentes gestações (HALL et al., 2005). Apesar da reposição externa de animais ser a principal forma de introdução de patógenos em um rebanho, especialmente se, após adquirido, não for submetido a testes laboratoriais e quarentena (SANTOS, 2003), a reposição própria de animais, no caso de neosporose, pode contribuir para a manutenção de animais infectados pelo protozoário no rebanho, caso não haja acompanhamento sorológico e detecção das matrizes positivas.

A criação extensiva, relatada no Caso 1, contribuiu para uma maior exposição dos ovinos aos oocistos presentes nas pastagens e água, e a convivência dos cães, sejam da propriedade ou não, como visualizado, aumenta consideravelmente o potencial de contaminação e infecção pelo protozoário (DUBEY et al., 2007), agravada pelo hábito de carnivorismo destes animais, ingerindo restos e lóquios fetais que possuem, geralmente, alta carga de taquizoítos (VANLEEuwEN et al., 2010). Na propriedade do Caso 1, os restos e lóquios fetais eram descartados incorretamente, que os mantinha decompondo no ambiente, facilitando o acesso dos cães para ingeri-los, permitindo a ocorrência do ciclo sexuado do parasito e posterior eliminação de

oocistos nas fezes (BANDINI et al., 2011; CAVALCANTE et al., 2011). A eliminação pode se dar por cerca de até três semanas (AL-MAJALI et al., 2008), contaminando as pastagens e fontes de água ingeridos pelos ovinos e permitindo sua infecção.

No ano seguinte, houve redução significativa nos casos de abortamentos nas propriedades do Caso 1 e Caso 2, e quanto às medidas de controle tomadas pelos produtores, o descarte de animais que abortaram foi o mais relatado, no entanto, o controle ideal se dá através da seleção de animais soropositivos, promovendo o descarte gradual dos mesmos (FRENCH et al., 1999), aliado a medidas como a restrição de acesso dos cães da propriedade a piquetes e fontes de água dos animais, evitando, também, o seu fornecimento de carne e vísceras cruas, bem como de restos placentários e fetais (DUBEY, 2003).

As criações de ovinos acometidas por toxoplasmose neste estudo variaram em tamanhos e níveis de tecnificação, possuíam finalidade de corte e sistema de criação extensivo, o que favorece a ingestão de oocistos esporulados presentes na pastagem e na água, principalmente se houver a circulação livre de felinos no local (VAN DER PUIJE et al., 2000), com forte correlação entre a soropositividade para o protozoário em ovinos e o pastejo em regime extensivo (MOURA et al., 2015). O Caso 3 relatou ainda, ninhada de felinos no local durante o período em que houve o abortamento, e sabe-se que a presença de felinos jovens contribui para o ciclo de *T. gondii*, visto que a eliminação dos oocistos por seus hospedeiros definitivos ocorre após o primeiro contato com o protozoário (ELMORE et al., 2010).

O relato de um caso de toxoplasmose humana próximo a propriedade do Caso 2 demonstra a importância zoonótica da infecção por *T. gondii*, e, em humanos, os riscos de contaminação são altos após o consumo de carne e/ou leite sem o tratamento térmico adequado de animais considerados hospedeiros intermediários, como os ovinos (KHATER et al., 2013), sugerindo a importância na detecção da fonte de infecção de *T. gondii* na região em questão, evitando novos casos em animais e humanos. Outro importante fator associado é a criação simultânea de diversas outras espécies de animais, como no Caso 1, com a criação concomitante de bovinos de corte, aves e suínos, visto que *T. gondii* possui a capacidade de parasitar todos estes indivíduos (BUXTON, 1990), e devido a isso, o convívio de múltiplas espécies num mesmo local é conhecidamente um fator de risco para a ocorrência da doença na propriedade (MACHADO & LIMA, 1987). O relato de abortamentos tanto em primíparas quanto em múltiparas nas propriedades estudadas, ocorre porque o

episódio de aborto é influenciado pelo momento de vida em que ocorre a primo-infecção, desde que o indivíduo ainda não seja imune (DUBEY, 1991).

Para o controle de toxoplasmose na propriedade do Caso 1, foi realizado o descarte de alguns animais que haviam abortado, no entanto, os que foram mantidos na propriedade não demonstraram problemas reprodutivos na gestação seguinte, o que é característico da imunidade inata promovida após a primo-infecção com *T. gondii*, levando a problemas reprodutivos apenas na gestação em que ocorreu a exposição inicial. Porém, deve-se ressaltar que podem haver casos de repetição na ocorrência de abortamentos em gestações subsequentes, sugerindo que, muitas vezes, a imunidade persistente adquirida após primeira exposição ao protozoário pode não ocorrer (MORLEY et al., 2007), seja pela transmissão endógena da mãe infectada ao feto, ou pela transmissão exógena através da infecção por diferentes cepas de *T. gondii* (TREES & WILLIAMS, 2005). Além disso, outras alterações de manejo são recomendadas, como o descarte correto de restos fetais e a não-circulação de novos felinos nas instalações e pastagens dos ovinos, bem como controle de roedores, que servem como fontes de infecção aos felinos, animais errantes e silvestres, perpetuando o ciclo do protozoário (BUXTON, 1998).

4.5 CONCLUSÕES

Há a ocorrência de abortamentos causados por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em ovinos no estado de Santa Catarina, manifestando-se através de surtos ou casos isolados.

A associação entre a histopatologia e a PCR dos fetos abortados é essencial para aumentar as chances de diagnóstico destas enfermidades de origem parasitária, pois isoladamente podem não chegar ao diagnóstico conclusivo, permitindo, assim, diferenciá-las entre si. Os tecidos fetais onde mais observa-se lesões histopatológicas são músculo esquelético, coração e encéfalo.

O acompanhamento das propriedades acometidas permitiu traçar o perfil das mesmas, avaliando possíveis fatores associados à infecção, orientando produtores para evitar novos casos. A tomada de medidas de controle foi parcialmente efetivada, e pode ter contribuído na redução na taxa de abortamentos no ano seguinte, levando a redução no prejuízo econômico destas criações.

5 Microcefalia e hidrocefalia em um feto ovino com infecção por *Neospora caninum*

Microcephaly and hydrocephalus in an ovine fetus infected with *Neospora caninum*

RESUMO

Malformações na espécie ovina originárias de causas infecciosas são atribuídas, principalmente, a diferentes vírus conhecidamente teratogênicos, levando a alterações que incluem artrogripose, hidrocefalia e microcefalia em cordeiros. No entanto, a atuação de protozoários na origem de anomalias em fetos e neonatos ovinos é pobremente conhecida. O objetivo deste trabalho é relatar um caso de hidrocefalia não-comunicante e microcefalia em um feto ovino infectado por *N. caninum*. O feto da raça Crioula possuía idade compatível com 18-20 semanas de gestação ao ser abortado, sendo um episódio único, oriundo de uma ovelha primípara. Macroscopicamente, evidenciou-se achatamento e estreitamento moderado do crânio, e, ao abri-lo, a porção dos hemisférios cerebrais se apresentava acentuadamente reduzida de tamanho, medindo 3,5x3,5x0,5cm, com achatamento difuso acentuado dos giros cerebrais. Ao corte, evidenciava-se dilatação difusa acentuada dos ventrículos laterais. Fígado, pulmão e conteúdo abomasal foram submetidos a cultivo bacteriano, sem crescimento. Baço e timo foram coletados para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *pestivirus*, com resultados negativos. Amostras de encéfalo e líquido cefalorraquidiano foram submetidas a PCR para detecção de *Toxoplasma gondii* e *N. caninum*, havendo resultado positivo na detecção de *N. caninum* em líquido cefalorraquidiano. Amostras de todos os órgãos foram colhidas em formalina tamponada a 10% para análise histopatológica. Havia encefalite necrotizante linfoplasmocitária focal discreta no assoalho do ventrículo lateral e gliose multifocal discreta, além de miosite linfoplasmocitária multifocal discreta. Este agente nunca antes havia sido relatado como teratogênico em ovinos, e sua detecção em líquido cefalorraquidiano pode ser justificada pela patogenia da malformação, associada a processos inflamatórios no tecido encefálico subependimal, com perda do parênquima celular para o interior dos ventrículos, junto ao líquido. Processos inflamatórios que levem a destruição de progenitores neuronais em regiões subventriculares podem estar associados a microcefalia. Conclui-se, através da sua detecção molecular em líquido cefalorraquidiano, que foi possível relatar o que parece ser o primeiro caso de neosporose associado a hidrocefalia não-comunicante e microcefalia em um feto ovino.

Palavras-chave: Protozoário. Anomalia. Teratogenia. Abortamento.

ABSTRACT

Malformations in sheep with infectious origins are mainly attributed to different viruses known to be teratogenic, leading to changes that include arthrogryposis, hydrocephalus, and microcephaly in lambs. However, the role of protozoa in causing anomalies in fetuses and ovine newborns is poorly known. This study aims to report a case of non-communicating hydrocephalus and microcephaly in a sheep fetus infected with *N. caninum*. The Crioula breed fetus was 18-20 weeks old when it was aborted, being a single episode, originating from a primiparous sheep. Macroscopically, there was moderate flattening and narrowing of the skull, and, when opening it, the portion of the cerebral hemispheres was markedly reduced in size, measuring 3.5x3.5x0.5cm, with marked diffuse flattening of the brain gyri. Marked diffuse dilation of the lateral ventricles was evident. Liver, lung, and abomasal contents were submitted to bacterial culture, without growth. Spleen and thymus were collected for Polymerase Chain Reaction (PCR) for pestivirus, with negative results. Brain and cerebrospinal fluid samples were submitted to PCR to detect *Toxoplasma gondii* and *N. caninum*, with positive results in the detection of *N. caninum* in cerebrospinal fluid. Samples of all organs were collected in 10% buffered formalin for histopathological analysis. There was discrete focal lymphoplasmacytic necrotizing encephalitis on the floor of the lateral ventricle and discrete multifocal gliosis, in addition to discrete multifocal lymphoplasmacytic myositis. This agent has never before been reported as teratogenic in sheep, and its detection in cerebrospinal fluid can be justified by the pathogenesis of the malformation, associated with inflammatory processes in the subependymal brain tissue, with loss of cellular parenchyma into the ventricles, next to the cerebrospinal fluid. Inflammatory processes that lead to the destruction of neuronal progenitors in subventricular regions may be associated with microcephaly. It is concluded, through its molecular detection in cerebrospinal fluid, that it was possible to report what appears to be the first case of neosporosis associated with non-communicating hydrocephalus and microcephaly in an ovine fetus.

Keywords: Protozoan. Anomaly. Teratogeny. Abortion.

5.1 INTRODUÇÃO

A frequência de malformações congênitas varia de acordo com as espécies, e para ovinos, sua ocorrência é de aproximadamente 2% (SCHILD, 2007). As malformações em fetos e neonatos ovinos podem ser atribuídas a uma série de agentes infecciosos, especialmente virais, como algumas arboviroses que incluem vírus da família *Bunyaviridae*, como o vírus Akabane, responsável por levar a anormalidades caracterizadas por artrogripose, hidrocefalia e microcefalia em cordeiros (PARSONSON et al., 1977); o vírus Cache-Valley, da mesma família, que leva, principalmente, a hidranencefalia e artrogripose (CHUNG et al., 1990); e, de forma mais recente, um *Orthobunyavirus* tem sido relatado como uma enfermidade emergente, especialmente na Europa, descoberto em 2011 e denominado como vírus Schmallerberg, resultando em rigidez articular de cordeiros, escoliose e anormalidades em sistema nervoso central (DOMINGUEZ et al., 2012).

Vírus do gênero *Pestivirus*, como o causador da *Border Disease*, levam frequentemente a anormalidades musculoesqueléticas, crescimento retardado de cordeiros e baixa taxa de sobrevivência entre neonatos acometidos (GARCÍA-PÉREZ et al., 2009), além de alterações em sistema nervoso central, como hidranencefalia, porencefalia, hidrocefalia e hipoplasia cerebelar (BARLOW et al., 1980; OGUZOGLU et al., 2012). Os cordeiros apresentam também displasia ou atrofia da retina, microftalmia, catarata e hipoplasia tímica, e pode ser descrita como *Hairy Shaker Disease*, devido aos tremores generalizados e aos danos no desenvolvimento dos folículos pilosos (NETTLETON et al., 1998; BRAUN et al., 2002; SANDVIK, 2014). O *Pestivirus* já foi relatado no Brasil em ovinos através da técnica de imunohistoquímica, com sua detecção em encéfalo e linfonodos mesentéricos de um animal de dois meses de idade, que possuía tremores musculares, hipertermia e incoordenação motora (PESCADOR et al., 2004). O vírus causador da língua azul, do gênero *Orbivirus*, também pode levar a uma série de malformações em ovinos, que incluem hidrocefalia, prognatismo, cegueira e artrogripose (ALFIERI et al., 2007).

Demais agentes infecciosos, como *Toxoplasma gondii*, principal causador de abortamentos em ovinos (INNES et al., 2009), possuem relatos escassos de malformações nesta espécie, com apenas um caso de escoliose e hidrocefalia (WOODS & ANDERSON, 1992), enquanto em humanos, este agente é amplamente

conhecido por levar a uma tríade de lesões composta por hidrocefalia, retinocoroidite e encefalite (INNES, 2010), além de microcefalia (DEVAKUMAR et al., 2018).

A neosporose é uma enfermidade parasitária, ocasionada pelo *Neospora caninum*, protozoário pertencente ao Filo Apicomplexa, assim como *T. gondii*, compartilhando entre si similaridades filogenéticas em relação a sua estrutura, imunogenicidade e patogenicidade (DUBEY, 1999). A neosporose é amplamente relatada como causa de abortamentos em bovinos (DUBEY, 2003), com relatos desta enfermidade em ovinos cada vez mais frequentes (MORENO et al., 2012). O objetivo do presente trabalho é relatar um caso de hidrocefalia e microcefalia em um feto da espécie ovina infectado por *N. caninum*.

5.2 RELATO DE CASO

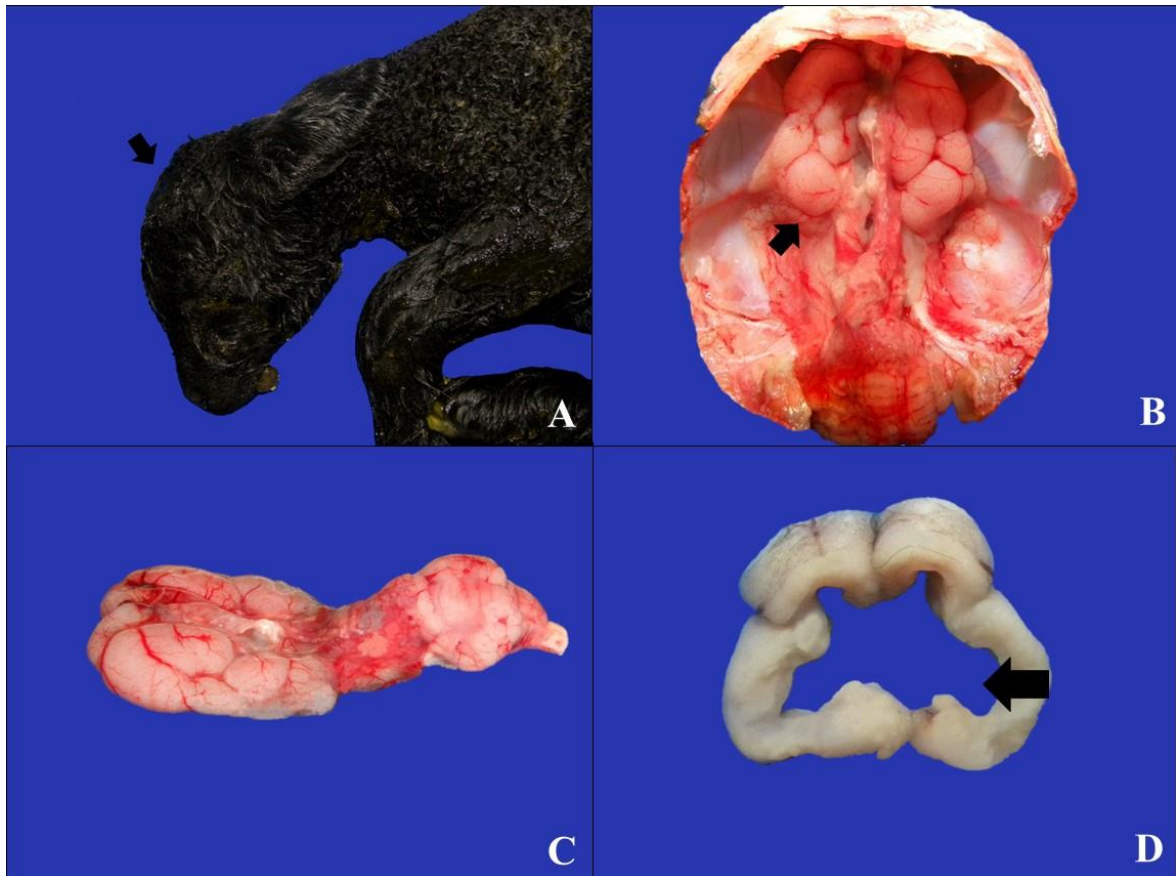
Um feto ovino, macho, da raça Crioula, foi remetido para necropsia ao Laboratório de Patologia Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (LAPA-CAV/UDESC) do município de Lages, em Santa Catarina, Brasil. A propriedade em questão possuía área total de 500ha, com utilização de 5ha para criação de ovinos. O plantel era de 18 fêmeas com finalidade de corte, compostas por oito ovelhas prenhas, sendo duas primíparas e seis múltiparas, e dez borregas, além do carneiro reprodutor, trocado periodicamente.

As ovelhas eram criadas exclusivamente à pasto, alimentadas com pastagem cultivada de aveia e azevém no inverno, e pastagem nativa durante o verão, suplementadas com silagem de milho, além de sal mineral misturado a sal homeopático fornecidos à vontade no cocho dos animais. Não haviam plantas tóxicas localizadas em meio à pastagem ingerida pelos animais. A propriedade possuía quatro cães, que tinham livre acesso às pastagens, fontes de água e instalações. Além disso, esporadicamente os cães consumiam lóquios fetais após o parto. Nunca foram relatados problemas sanitários na propriedade, tampouco transtornos reprodutivos. A mãe do feto era primípara, possuía origem através de reposição própria, e nunca havia sido levada a eventos de aglomeração ou outras propriedades. Este tratou-se de um caso esporádico de abortamentos na propriedade, sem relatos de outros casos.

Na necropsia do feto, o comprimento crânio-coccígeo foi de 40cm, compatível com 18-20 semanas de gestação (SIVACHELVAN et al., 1996). Evidenciava-se achatamento e estreitamento moderado da calota craniana (Figura 9A). Após a abertura do crânio, visualizou-se tamanho reduzido da porção telencefálica (Figura

9B), onde notou-se que a porção dos hemisférios cerebrais media 3,5x3,5x0,5cm, com achatamento acentuado dos giros cerebrais (Figura 9C). Ao corte, evidenciou-se dilatação difusa acentuada dos ventrículos laterais, preenchidos por líquido cefalorraquidiano (Figura 9D). O peso da massa encefálica foi de 12g, composta por 9g de porção telencefálica e 3g de cerebelo.

Figura 9. Feto ovino, macho, raça Crioula, com microcefalia e hidrocefalia secundários a infecção por *Neospora caninum*. **A)** achatamento e estreitamento moderado da calota craniana (seta). **B)** abertura da calota craniana, com acentuada diminuição de telencéfalo (seta). **C)** vista lateral do encéfalo, demonstrando acentuado achatamento dos giros cerebrais e da massa telencefálica. **D)** córtex frontal do encéfalo, com acentuada dilatação dos ventrículos laterais (seta).



Fonte: A própria autora, 2020.

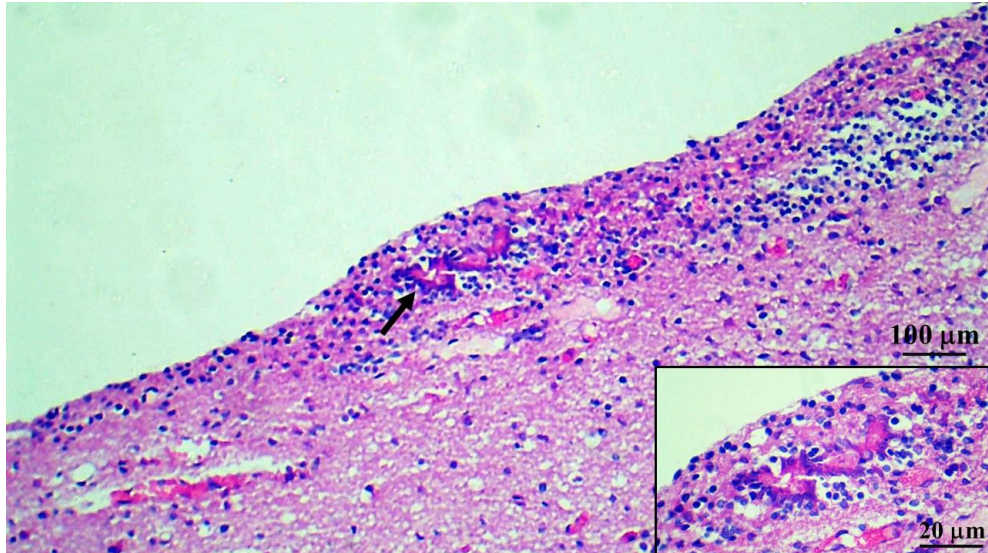
Para exame histopatológico, fragmentos de pálpebra, fígado, pulmões, placenta, encéfalo, rins, coração, timo, baço, diafragma, músculo esquelético e abomaso foram colhidos e acondicionados em frascos contendo formalina tamponada a 10%, processados rotineiramente para histopatologia e corados com hematoxilina e eosina (HE) para visualização dos tecidos em microscopia óptica. Para cultivo microbiológico, foram coletados fragmentos de fígado, pulmão e conteúdo abomasal,

refrigerados e remetidos ao Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA) do CAV/UEDESC, com pré-enriquecimento do material com 4g do órgão e 196ml de água peptonada estéril em uma *bag*, seguida da homogeneização em um *Stomacher® 400 Circulator (Laboratory Blender)* e da incubação por 24h a 37°C. Após a incubação, as amostras foram inoculadas em placas com Ágar Sangue e McConkey em cultivo aeróbio por 48h a 37°C, sem crescimento bacteriano nas amostras.

Quanto a análise molecular, encéfalo e líquido cefalorraquidiano foram colhidos em microtubos, congelados, para realização de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *T. gondii* e *N. caninum*, enquanto fragmentos de baço e timo foram submetidos a RT-PCR para o *Pestivirus* causador da *Border Disease* (BDV), de acordo com Canal et al. (1996). Para a PCR de *T. gondii*, os *primers* selecionados SAG2.F4/SAG2.R4 (59GCTACCTCGAACAGGAACAC39)/(59GCATCAACAGTCTTCGTTGC39), respectivamente, amplificaram separadamente as extremidades 59 e 39 do locus SAG2 do *T. gondii* com produtos de 340pb, de acordo com Moura et al., (2011), enquanto para *N. caninum*, os *primers* Np21/Np6 (5'-CCCAGTGCGTCCAATCCTGTA-3')/(5'-CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT-3') amplificaram produtos de 337pb, de acordo com Müller et al. (1996). Os resultados para a detecção de *T. gondii* e *Border Disease Virus* foram negativos, enquanto em líquido cefalorraquidiano houve resultado positivo para a detecção de *N. caninum*.

Histologicamente, foi evidenciada encefalite necrotizante linfoplasmocitária focal discreta, localizada no assoalho dos ventrículos laterais (Figura 10), além de gliose multifocal discreta e miosite linfoplasmocitária multifocal discreta.

Figura 10. Feto ovino, macho, raça Crioula, com microcefalia e hidrocefalia secundários a infecção por *Neospora caninum*. **Encéfalo:** encefalite necrotizante linfoplasmocitária focal discreta, localizada no córtex cerebral, a nível do assoalho dos ventrículos laterais (seta). Obj. 10x. **No detalhe:** lesão em maior aumento. Obj. 40x. Hematoxilina e Eosina.



Fonte: A própria autora, 2020.

5.3 DISCUSSÃO

A hidrocefalia é uma das alterações congêntas mais comumente observadas em animais domésticos (SCHMIDT & ONDREKA, 2020), e pode ser classificada de três formas: comunicante (não obstrutiva), mais rara e caracterizada por acúmulo de líquido cefalorraquidiano tanto nos ventrículos, quanto no espaço subaracnóideo, secundária a dificuldades nos processos de reabsorção do líquido; não-comunicante (obstrutiva), mais comum e visualizada em processos obstrutivos ou estenóticos, secundários a causas infecciosas, neoplásicas ou degenerativas, resultando na dilatação dos ventrículos rostrais à obstrução do fluxo (CANTILE & YOUSSEF, 2016), e existe, ainda, a forma compensatória, que ocorre quando o líquido se acumula em cavitações onde o tecido nervoso não foi formado, ou foi destruído (SUMMERS et al., 1995). A hidrocefalia observada neste relato é compatível com a forma não-comunicante, confirmada pela visualização dos ventrículos laterais dilatados. Uma evolução da hidrocefalia é a atrofia e destruição do tecido encefálico adjacente ao ventrículo, resultante de sua expansão (SILVA et al., 2016).

Causas não-infecciosas de malformações em ovinos e caprinos podem estar associadas a ingestão de algumas plantas tóxicas, como *Mimosa tenuiflora* (jurema-

preta), encontrada no nordeste brasileiro e responsável por levar a abortamentos e múltiplas anormalidades, principalmente musculoesqueléticas (DANTAS et al., 2010; SANTOS et al., 2012). A ausência de plantas tóxicas nos piquetes utilizados para criação dos animais, descarta atribuir a malformação à ingestão de plantas com propriedades teratogênicas. Ainda com origem nutricional, a deficiência de cobre em ovinos pode levar a alterações congênitas que levam a uma condição conhecida como ataxia enzoótica, resultante da desmielinização do sistema nervoso central, que geralmente acontece em forma de surtos (SOUSA et al., 2009). Esta possibilidade também pode ser excluída, devido a suplementação dos animais com sal mineral na propriedade e manifestação de apenas um caso isolado de malformação. Outro fator que deve ser considerado quando há ocorrência de anomalias congênitas em uma propriedade, é o carneiro reprodutor. O uso do mesmo reprodutor pode estar relacionado a doenças hereditárias por genes recessivos (SCHILD, 2007). A troca periódica do carneiro e a ocorrência de apenas um caso isolado de malformação dentre os seus produtos, permite eliminar também este fator como origem das anomalias visualizadas neste caso.

Alguns vírus conhecidamente causadores de malformações em fetos ovinos, como o vírus Akabane (PARSONSON et al., 1977), o vírus Cache-Valley (CHUNG et al., 1990), o vírus Schmallenberg (DOMINGUEZ et al., 2012), o *pestivirus* causador da *Border Disease* (GARCÍA-PÉREZ et al., 2009) e o *orbivirus* causador da Língua Azul (ALFIERI et al., 2007) possuem predileção por células endoteliais, e sua destruição culmina com um processo reparador gliovascular, que pode resultar no bloqueio da passagem do líquido cefalorraquidiano através dos forames intraventriculares ou do aqueduto mesencefálico, levando a hidrocefalia não-comunicante (CANTILE & YOUSSEF, 2016). Para protozoários, a patogenia pode estar relacionada a um dano inflamatório ao tecido subependimial próximo aos ventrículos gerado pelo parasito, resultando em descamação celular para o interior das cavidades, que podem se acumular ao longo das passagens interventriculares, resultando em bloqueio e dilatação dos ventrículos laterais, como já relatada em casos de toxoplasmose (DUBEY & BEATTIE, 1988). A evidenciação de um foco de encefalite necrotizante linfoplasmocitária localizada no assoalho dos ventrículos laterais, reforça que o surgimento da hidrocefalia não-comunicante, neste caso, pode ter seguido estes eventos.

Infecções por *T. gondii* são frequentes em seres humanos, e, em casos de transmissão congênita, os relatos de mineralizações intracranianas, hidrocefalia, microcefalia e retinocoroidite são frequentes em recém-nascidos (McAULEY, 2014). Já em animais domésticos, existe apenas um relato de um feto ovino com hidrocefalia e escoliose acometido por *T. gondii*, com confirmação através de análise histopatológica, em que foi possível evidenciar um foco de necrose no encéfalo em substância cinzenta, associado a presença de cistos, com detecção do protozoário através da PCR (WOODS & ANDERSON, 1992). A encefalite necrotizante linfoplasmocitária focal, a gliose multifocal e a miosite linfoplasmocitária, como visualizadas neste caso, são consideradas principais lesões microscópicas inflamatórias observadas em casos de fetos com neosporose ou toxoplasmose, além de alterações em músculo cardíaco e placenta, compostas por miocardite e placentite linfoplasmocitárias (DUBEY & LINDSAY, 1990).

A neosporose vem ganhando destaque crescente como causa de mortalidade em fetos de pequenos ruminantes, mostrando-se cada vez mais comum (MORENO et al., 2012), no entanto, malformações associadas a *N. caninum* são raras, e nunca antes relatadas em ovinos. Em bovinos, há um caso de hidrocefalia *ex-vacuo* em um feto abortado infectado pelo protozoário, com detecção histológica de inúmeros taquizoítos em meio a focos de encefalite necrotizante linfoplasmocitária multifocal acentuada, além de gliose difusa, infiltrado linfoplasmocitário perivascular e áreas multifocais de mineralização (DUBEY et al., 1998). Outro caso relata artrogripose e malformação de medula espinhal em um neonato bovino, que possuía assimetria dos segmentos cervical caudal e torácico cranial, associada a redução da substância cinzenta em região ventral e cavitação focal, com cistos ao longo da medula espinhal, confirmados através de imuno-histoquímica para *N. caninum* (DUBEY et al., 1990). Em caprinos, já foi relatada a detecção de *N. caninum* por imuno-histoquímica em cistos teciduais presentes no encéfalo de um feto com hidrocefalia e hipoplasia cerebelar (DUBEY et al., 1996). Em cabritos, já houve sua presença associada a um quadro de encefalite granulomatosa, com detecção através de imuno-histoquímica (CORBELLINI et al., 2001), e a um quadro de hidrocefalia *ex-vacuo* e porencefalia, com confirmação da infecção por *N. caninum* também através da marcação imuno-histoquímica de cistos teciduais no neurópilo e citoplasma de neurônios (VARASCHIN et al., 2012). Ambos casos de hidrocefalia *ex-vacuo* relatados anteriormente associados a infecção por este protozoário, possuíam focos de necrose encefálica

com distribuição e intensidade superiores ao caso observado neste ovino, sugerindo que a patogenia mais compatível com o caso esteja associada a obstrução no fluxo do líquido, e não a expansão compensatória dos ventrículos devido a malácia no tecido encefálico.

O uso da PCR é uma das principais formas de se chegar ao diagnóstico conclusivo desta enfermidade (DUBEY, 2003), e a ausência da detecção de *N. caninum* através de PCR em tecido encefálico, neste caso, e a presença do seu DNA em líquido cefalorraquidiano, sustenta a possibilidade de que, em virtude da escassez de tecido nervoso e da localização das lesões inflamatórias próximas ao assoalho ventricular, a descamação celular para o interior do espaço ventricular foi favorecida, sendo possível detectá-lo desta forma. O uso de líquido cefalorraquidiano no diagnóstico de neosporose já foi utilizado para visualização direta de taquizoítos em um cão com ataxia generalizada após tratamento imunossupressivo (GALGUT et al., 2010). Ainda em cães, o líquido cefalorraquidiano foi o segundo tipo de amostra com maior detecção do protozoário, através da PCR (26,2%), atrás apenas de músculo esquelético (30%) (POURAMINI et al., 2017).

É importante ressaltar a diferença entre a hidrocefalia, como evidenciada no feto em questão, de outras duas alterações cavitárias no sistema nervoso central, a hidranencefalia e porencefalia, ambas visualizadas mais frequentemente em processos infecciosos virais em ovinos: a primeira resulta na destruição do parênquima e na formação de grandes cavitações no encéfalo, havendo a remanescência de pouco ou nenhum tecido nervoso, enquanto a segunda é caracterizada por pequenos cistos na parede dos hemisférios cerebrais (BARLOW, 1980). A microcefalia, outra anormalidade congênita observada no presente caso, é tida como um encéfalo anormalmente menor do que o normal, e é mais comumente visualizada na porção dos hemisférios cerebrais, com redução igualmente proporcional à substância branca e cinzenta, muitas vezes dando a impressão de um cerebelo maior do que o usual, e, em casos de microcefalia, externamente é possível evidenciar um achatamento e estreitamento do crânio, como visto no feto em questão (VANDEVELDE et al., 2012; CANTILE & YOUSSEF, 2016). A proporção entre o peso do cerebelo em relação ao encéfalo de animais normais pode variar de 8,3% a 11,01% (DONE et al., 1980), inferior a observada neste caso, em que o cerebelo foi equivalente a 25% do peso total do encéfalo, corroborando com os achados de

microcefalia que levam a reduções mais significativas apenas nos hemisférios cerebrais.

Durante o período embrionário, o tecido nervoso é composto por progenitores neuronais proliferativos, localizados na zona ventricular em torno do tubo neural, e de acordo com o desenvolvimento do embrião, neurônios começam a emergir para que uma nova população de progenitores surja, havendo a expansão da população neuronal do encéfalo; e é durante o processo de expansão que os progenitores neuronais servem como um alvo para patógenos, em virtude do suprimento sanguíneo cerebral totalmente estabelecido (DEVAKUMAR et al., 2018). A microcefalia surge por defeitos na neurogênese associados a interrupção da proliferação de progenitores neurais, seja por defeitos na divisão mitótica ou na regulação de seu ciclo celular, ou, ainda, por defeitos resultantes de danos ao DNA, levando a um número reduzido de células neuronais e gliais no encéfalo (PASSEMARD et al., 2013), e em ovinos é relatada em algumas infecções virais, como por *Pestivirus* (POTTS et al., 1985).

Em humanos, determinadas causas virais de microcefalia em recém-nascidos, como o Zika vírus, possuem patogenia mais elucidada (CUGOLA et al., 2016; DANG et al., 2016), e sabe-se que este vírus possui maior predileção pelos progenitores neuronais localizados na zona ventricular e, posteriormente, zona subventricular, levando a sua destruição e, conseqüentemente, a um tamanho reduzido do encéfalo (GARCEZ et al., 2016). Em um estudo *post-mortem* de recém-nascidos infectados com Zika vírus, as principais lesões histológicas no encéfalo caracterizaram-se como áreas multifocais de mineralização distrófica, gliose difusa, degeneração e necrose de células neuronais e gliais, com grande perda de volume da zona subventricular e substância branca, acompanhada por rarefação axonal e infiltrado de macrófagos (SCHWARTZ, 2017), também visualizada em um estudo de inoculação experimental do Zika virus em leitões, que demonstraram depleção neuronal moderada a severa (SCHREUR et al., 2017).

A microcefalia por infecção de protozoários permanece com patogenia obscura, mesmo para humanos com infecção congênita por *T. gondii* (DEVAKUMAR et al., 2018), e no presente caso, a redução acentuada nas proporções de hemisférios cerebrais pode estar associada a lesões inflamatórias localizadas na zona subventricular, culminando na destruição de progenitores neuronais. Até o momento, não haviam sido relatados casos de microcefalia associados a *N. caninum* em animais domésticos. Um importante diferencial para esta alteração é a hipoplasia

prosencefálica, porém nesta malformação, diferente da microcefalia, não há a formação das porções mais rostrais do encéfalo devido a um defeito no fechamento do tubo neural, e macroscopicamente os hemisférios cerebrais não se encontram delimitados em direito e esquerdo, não há circunvoluções bem definidas, os ossos do crânio podem estar fechados de forma incompleta e pode haver ausência de meninges e ventrículos, havendo relatos desta anomalia em bovinos e um caprino (PAVARINI et al., 2008; CALDAS et al., 2017; NASCIMENTO, 2020).

5.4 CONCLUSÃO

Este parece ser o primeiro relato de hidrocefalia e microcefalia em um feto ovino infectado por *N. caninum*, com detecção molecular do protozoário em líquido cefalorraquidiano. Apesar de nunca antes relatado como um agente teratogênico em ovinos, sua ocorrência neste caso alerta para seu potencial como causador de malformações nesta espécie, e, junto com outros agentes infecciosos, deve ser considerado como um dos diferenciais para este tipo de alteração em fetos e neonatos ovinos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho alerta para a ocorrência de abortamentos decorrentes da infecção por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em ovinos no estado de Santa Catarina, manifestando-se através de surtos ou casos isolados, com frequência semelhante entre a ocorrência de ambas as enfermidades.

A associação entre análise histopatológica e análise molecular através de PCR dos fetos abortados foi essencial para o diagnóstico destas enfermidades de origem parasitária, pois, isoladamente, podem não levar a um diagnóstico conclusivo, permitindo, assim, diferenciá-las entre si. Os tecidos fetais onde mais observaram-se lesões histopatológicas foram músculo esquelético, coração e encéfalo.

O acompanhamento das propriedades acometidas por estas enfermidades permitiu traçar o perfil das mesmas, avaliando possíveis fatores associados à infecção. A tomada de medidas de controle foi parcialmente efetivada, podendo ter contribuído na redução na taxa de abortamentos, levando a redução no prejuízo econômico destas criações.

O trabalho também trouxe o primeiro relato de hidrocefalia não-comunicante e microcefalia em um feto ovino infectado por *N. caninum*, com detecção molecular do protozoário em líquido cefalorraquidiano. Apesar de nunca antes relatado como um agente teratogênico em ovinos, sua ocorrência neste caso alerta para seu possível potencial como causador de malformações nesta espécie, e, junto com outros agentes infecciosos, deve ser considerado como um dos diferenciais para este tipo de alteração em fetos e neonatos ovinos.

7. REFERÊNCIAS

- ABO-SHEHADA, M.N.; ABU-HALAWEH, M.M. Flock-level seroprevalence of, and risk factors for, *Neospora caninum* among sheep and goats in northern Jordan. **Preventive Veterinary Medicine**, v.93, p.25-32, 2010.
- ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; TAKIUCHI, E. et al. Reoviridae. In: FLORES, E.F. (Ed). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: UFSM, 1.ed., v.1, p.775-805, 2007.
- AL-MAJALI, A.M.; JAWASREH, K.I.; TALAFHA, H.A. et al. Neosporosis in sheep and different breeds of goats from Southern Jordan: prevalence and risk factors analysis. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v.3, n.2, p.47-52, 2008.
- ANDERSON, M.L.; ANDRIANARIVO, A.G.; CONRAD, P.A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.417-431, 2000.
- ANDRADE, M.M.C.; CARNEIRO, M.; MEDEIROS, A.D. et al. Seroprevalence and risk factors associated with ovine toxoplasmosis in Northeast Brazil. **Parasite**, v.20, 2013.
- ANDREOTTI, R. Diagnóstico e controle da neosporose em bovinos. **Embrapa Gado de Corte**, Campo Grande, v.136, 2003, 51p.
- ANTONIOLI, M.L.; CARVALHO, J.R.G.; BUSTAMANTE, C.C. Atresia anal com fistula retovaginal em ovino: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.69, n.5, p.1167-1171, 2017.
- BANDINI, L.A.; NETO, A.F.; PENA, H.F. et al. Experimental infection of dogs (*Canis familiaris*) with sporulated oocysts of *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v.176, n.2-3, p.151-156, 2011.
- BARLOW, R.M. Morphogenesis of hydranencephaly and other intracranial malformations in progeny of pregnant ewes infected with pestiviruses. **Journal of Comparative Pathology**, v.90, n.1, p.87-98, 1980.
- BASZLER, T.V.; LONG, M.T.; MCELWAIN, T.F. et al. Interferon- γ and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. **International Journal for Parasitology**, v.29, n.10, p.1635-1646, 1999.

- BENAVIDES, J.; FERNÁNDEZ, M.; CASTAÑO, P. et al. Ovine toxoplasmosis: a new look at its pathogenesis. **Journal of Comparative Pathology**, v.157, n.1, p.34-38, 2017.
- BLACK, M.W.; BOOTHROYD, J.C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.3, p.607-623, 2000.
- BLEWETT, D.A.; TREES, A.J. The epidemiology of ovine toxoplasmosis with special respect to control. **British Veterinary Journal**, v.143, p.128–135, 1987.
- BARR, B.C.; ANDERSON, M.L.; WOODS, L.W. et al. *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.4, p.365-367, 1992.
- BRAUN, U.; HILBE, M.; EHRENSPERGER, F. et al. Border Disease in einem Schafbetrieb. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v.144, p.419-426, 2002.
- BUXTON, D.; FINLAYSON, J. Experimental infection of pregnant sheep with *Toxoplasma gondii*: pathological and immunological observations on the placenta and foetus. **Journal of Comparative Pathology**, v.96, p.319–333, 1986.
- BUXTON, D.; BLEWETT, D.A.; TREES, A.J. et al. Further studies in the use of monensin in the control of experimental ovine toxoplasmosis. **Journal of Comparative Pathology**, v.98, n.2, p.225-236, 1988.
- BUXTON, D. Ovine toxoplasmosis: a review. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v.83, p.509-511, 1990.
- BUXTON, D. Toxoplasmosis. In: MARTIN, W.B.; AITKEN, I.D. (Eds.) **Diseases of Sheep**. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p.49-58.
- BUXTON, D.; INNES, E.A. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. **Parasitology**, v.110, n.S1, p. S11-S16, 1995.
- BUXTON, D.; BREBNER, J.; WRIGHT, S. et al. Decoquinate and the control of experimental ovine toxoplasmosis. **Veterinary Record**, v.138, n.18, p.434-436, 1996.
- BUXTON, D. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. **Veterinary Research**, v.29, p.289–310, 1998.

CALDAS, S.A.; NOGUEIRA, V.A.; CALDAS, L.V.L. et al. Hipoplasia prosencefália em bezerro: relato de caso. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v.39, n.4, p.275-278, 2017.

CAMARGO, M.E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v.10, p.143-169, 1974.

CANAL, C.W.; HOTZEL, I.; ALMEIA, L.L. et al. Differentiation of classical swine fever virus from ruminant pestiviruses by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). **Veterinary Microbiology**, v.48, p.373-379, 1996.

CANTILE, C.; YOUSSEF, S. Nervous System. In: MAXIE, M.G. (Ed.), **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals**, 6.ed. Elsevier, Saunders, Maryland Heights, Missouri, 2016.

CASTAÑO, P.; FUERTES, M.; FERRE, I. et al. Placental thrombosis in acute phase abortions during experimental *Toxoplasma gondii* in sheep. **Veterinary Research**, v.45, n.1, p.9, 2014.

CASTAÑO, P.; FUERTES, M.; REGIDOR-CERRILLO, J. et al. Experimental ovine toxoplasmosis: influence of the gestational stage on the clinical course, lesion development and parasite distribution. **Veterinary Research**, p.47, n.1, p.43, 2016.

CAVALCANTE, G.T.; MONTEIRO, R.M.; SOARES, R.M. et al. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed different tissues from naturally infected cattle. **Veterinary Parasitology**, v.179, n.1-3, p.220-223, 2011.

CHUNG, S.I.; LIVINGSTON JR, C.W.; EDWARDS, J.F. et al. Evidence that Cache Valley virus induces congenital malformations in sheep. **Veterinary Microbiology**, v.21, n.4, p.297-307, 1990.

COELHO, W.M.D.; AMARANTE, A.F.T.; APOLINÁRIO, J.C. et al. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Leishmania* spp. infections and risk factors for cats from Brazil. **Parasitology Research**, v.109, n.4, p.1009, 2011.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; PÉREZ-PÉREZ, V. et al. Characterization of pathology and parasite load in outbred and inbred mouse models of chronic *Neospora caninum* infection. **Journal of Parasitology**, v.90, n.3, p.579-583, 2004.

- CONRAD, P.A.; SVERLOW, K.W.; ANDERSON, M.L. 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.; COLODEL, E.M.; DRIEMEIER, D. Granulomatous encephalitis in a neurologically impaired goat kid associated with degeneration of *Neospora caninum* tissue cysts. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, p.416-419, 2001.
- COSTA, L.S. Neosporose como causa de abortamento em bovinos do estado de Santa Catarina: caracterização anatomopatológica, molecular e sorológica. 2020. 88f. **Dissertação de Mestrado**. Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2020.
- CUGOLA, F.R.; FERNANDES, I.R.; RUSSO, R.B. et al. The Brazilian Zika Virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v.534, p. 267-271, 2016.
- DANG, J.; TIWARI, S.K.; LICHINCHI, G. et al. Zika virus depletes neural progenitors in human cerebral organoids through activation of the innate immune receptor TLR3. **Cell Stem Cell**, v.19, p.258-265, 2016.
- DANTAS, A.F.M.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R.M.T. et al. Malformações congênitas em ruminantes no semiárido do Nordeste brasileiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.10, p.807-815, 2010.
- DAVISON, H.C.; OTTER, A.; TREES, A.J. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. **International Journal for Parasitology**, v.29, n.10, p.1683-1689, 1999.
- DEVAKUMAR, D.; BAMFORD, A.; FERREIRA, M.U. et al. Infectious causes of microcephaly: epidemiology, pathogenesis, diagnosis and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v.18, n.1, p.e1-e13, 2018.
- DOMINGUEZ, M.; HENDRIKX, P.; ZIENTARA, S. et al. Preliminary estimate of Schmallenberg virus infection impact in sheep flocks – France. **Veterinary Record**, v.171, n.17, p.426, 2012.
- DONE, J.T.; TERLECKI, S.; RICHARDSON, C. et al. Bovine virus diarrhea-mucosal disease virus: pathogenicity for the fetal calf following maternal infection. **Veterinary Research**, v.7, p.473-479, 1980.

DROST, M. Complications during gestation in the cow. **Theriogenology**, v.68, p.487-491, 2007.

DUBEY, J.P.; FRENKEL, J.K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **Journal of Protozoology**, v.19, n.1, p.155-177, 1972.

DUBEY, J.P.; KIRKBRIDE, C.A. Epizootics of ovine abortion due to *Toxoplasma gondii* in north central United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.184, n.6, p.657-660, 1984.

DUBEY, J.P.; MILLER, S.; POWELL, E.C. et al. Epizootiologic investigations on a sheep farm with *Toxoplasma gondii*-induced abortions. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.188, n.2, p.155-158, 1986.

DUBEY, J.P.; BEATTIE, C.P. Toxoplasmosis of animals and man. **CRC Press**, Inc., 1988.

DUBEY, J.P. Congenital neosporosis in a calf. **Veterinary Record** v.125, p.486, 1989.

DUBEY, J.P.; HARTLEY, W.J.; LINDSAY, D.S. et al. Fatal congenital *Neospora caninum* infection in a lamb. **Journal of Parasitology**, v.76, n.1, p.127-130, 1990.

DUBEY, J.P.; HARTLEY, W.J.; LINDSAY, D.S. Congenital *Neospora caninum* infection in a calf with spinal cord anomaly. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.197, p.1043-1044, 1990.

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

DUBEY, J.P.; SONN, R.J.; HEDSTROM, O. et al. Sorologic and histologic diagnosis of toxoplasmic abortion in sheep in Oregon. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.196, n.2, p.291-294, 1990.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis – an overview. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.22, p.88-92, 1991.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.205, n.11, p.1593-1598, 1994.

- DUBEY, J.P.; MORALES, J.A.; VILLALOBOS, P. et al. Neosporosis-associated abortion in a dairy goat. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.208, p.263-265, 1996.
- DUBEY, J.P.; ABBITT, B.; TOPPER, M.J. et al. Hydrocephalus associated with *Neospora caninum* in an aborted bovine fetus. **Journal of Comparative Pathology**, v.118, n.2, p.169-173, 1998.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; SPEER, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* – tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n.2, p.267-299, 1998.
- DUBEY, J.P. Recent advances in *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.84, p.349-367, 1999.
- DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v.32, p.929-946, 2002.
- DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, v.41, n.1, p.1–16, 2003.
- DUBEY, J.P.; GRAHAM, D.H.; DAHL, E. et al. *Toxoplasma gondii* isolates from free-ranging chickens from United States. **The Journal of Parasitology**, v.89, p.1060-1062, 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.; LINDSAY, D.S. Neosporosis, Toxoplasmosis and Sarcocystosis in ruminants. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v.22, p.645-671, 2006.
- DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.140, n.1-2, p.1-34, 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. The history of *Toxoplasma gondii*: the first 100 years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.55, n.6, p.467-475, 2008.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis in sheep – the last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v.163, n.1-2, p.1-14, 2009.

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

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

EDMONDSON, M.A.; ROBERTS, J.F.; BAIRD, A.N. et al. Theriogeneology of sheep and goats. In: PUGH, D.G., BAIRD, A.N. (Eds.), **In Sheep and Goat Medicine**, 2.ed. Elsevier, Saunders, Maryland Heights, Missouri, p. 63043, 2012.

ELMORE, S.A.; JONES, J.L.; CONRAD, P.A. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends in Parasitology**, v.26, n.4, p.190-196, 2010.

ENGELAND, I.V.; WALDELAND, H.; ANDRESEN, O. et al. Foetal loss in dairy goats: an epidemiological study in 22 herds. **Small Ruminant Research**, v.30, n.1, p.37-48, 1998.

ENTRICAN, G.; WHEELHOUSE, N.M. Immunity in the female sheep reproductive tract. **Veterinary Research**, v.37, p.295–309, 2006.

FILHO, Z.F.H.; MARTINS, E.C.; MAGALHÃES, K.A. et al. Boletim do Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos. Pesquisa da Pecuária Municipal 2018: análise do rebanho de caprinos e ovinos. **Embrapa Caprinos e Ovinos**, Ceará, n.9, 2019, 16p.

FRENCH, N.P.; CLANCY, D.; DAVISON, H.C. et al. Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle, transmission and options of control. **International Journal for Parasitology**, v.29, n.10, p.1691-1704, 1999.

FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P.; MILLER, N.L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, v.167, p.893–896, 1970.

FREYRE, A., BONINO, J., FALCÓN, J. et al. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. **Veterinary Parasitology**, v.73, n.1-2, p.13–15, 1997.

GALGUT, B.I.; JANARDHAN, K.S.; GRONDIN, T.M. et al. Detection of *Neospora caninum* tachyzoites in cerebrospinal fluid of a dog following prednisone and cyclosporine therapy. **Veterinary Clinical Pathology**, v.39, n.3, p.386-390, 2010.

GARCEZ, P.P.; LOIOLA, E.C.; MADEIRO DA COSTA, R. et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. **Science**, v.352, p.816-818, 2016.

GARCÍA-PÉREZ, A.L.; JUSTE, R.A.; GONZÁLEZ, L. Revisión de la casuística de abortos ovinos del trienio (96-98) en NEIKER (SIMA). In: XXIII JORNADAS CIENTÍFICAS DE LA SEOC. **Anais...** Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, Vitoria-Gasteiz, 1998.

GARCÍA-PÉREZ, A.L.; MORENO, B.; ADURIZ, G. Necropsia y toma de muestras de abortos ovinos. **Revista Ovis: Tratado de Patología y Producción Ovina**, v.86, p.65–76, 2003.

GARCÍA-PÉREZ, A.L.; MINGUIJÓN, E.; BARANDIKA, J.F. et al. Detection of Border Disease virus in fetuses, stillbirths, and newborn lambs from natural and experimental infections. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.21, n.3, p.331-337, 2009.

GHANEM, M.E.; SUZUKI, T.; AKITA, M. 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, 2009.

GIBNEY, E.H.; KIPAR, A.; ROSBOTTOM, A. 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 for Parasitology**, v.38, n.5, p.579-588, 2008.

GIVENS, M.D.; MARLEY, M.S.D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. **Theriogenology**, v.70, n.3, p.270-285, 2008.

- GONDIM, L.F.; MCALLISTER, M.M., PITT, W.C. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.34, n.2, p.159-161, 2004.
- GONZÁLEZ-WARLETA M.; CASTRO-HERMIDA J.A.; REGIDOR-CERRILLO J. *Neospora caninum* infection as a cause of reproductive failure in a sheep flock. **Veterinary Research**, v.45, p.88, 2014.
- 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.
- GRUNERT, E.; BIRGEL, E.H. **Obstetrícia Veterinária**. Porto Alegre: Sulina, 1982. 323p.
- HALL, C.A.; REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. **Veterinary Parasitology**, v.128, n.3-4, p.231-241, 2005.
- HARTLEY, W.J.; JEBSON, J.L.; MCFARLANE, D. New Zealand type II abortion in ewes. **Australian Veterinary Journal**, v.30, n.7, p.216-218, 1954.
- HARTLEY, W.J.; MARSHALL, S.C. Toxoplasmosis as a cause of ovine perinatal mortality. **New Zealand Veterinary Journal**, v.5, p.119–124, 1957.
- HÄSSIG, M.; SAGER, H.; REITT, K. et al. *Neospora caninum* in sheep: a herd case report. **Veterinary Parasitology**, v.117, p.213-220, 2003.
- HECKER, Y.P.; MORRELL, E.L.; FIORENTINO, M.A. et al. Ovine abortion by *Neospora caninum*: first case reported in Argentina. **Acta Parasitologica**, v.64, n.4, p.950-955, 2019.
- HEIN, H.E.; MACHADO, G.; MIRANDA, I.C.S. 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, n.5, p.396-400, 2012.
- HELMICK, B.; OTTER, A.; MCGARRY, J. et al. Serological investigation of aborted sheep and pigs for infection by *Neospora caninum*. **Research in Veterinary Science**, v.73, p.187-189, 2002.

- HILL, D.; DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v.8, n.10, p.634-640, 2002.
- HOFFMANN, D.C.S. Cinética, avaliação da transmissão vertical e monitoramento da transferência passiva de anticorpos anti-*Neospora* sp. em equinos. 2007, 91f. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2007.
- HOWE, L.; WEST, D.M.; COLLETT, M.G. et al. The role of *Neospora caninum* in three cases of unexplained ewe abortions in the Southern North Island of New Zealand. **Small Ruminant Research**, v.75, n.2-3, p.115-122, 2008.
- HUGHES, J.M.; WILLIAMS, R.H.; MORLEY, E.K. et al. The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR in naturally occurring mammal populations. **Parasitology**, v.132, p.29-36, 2006.
- HURTADO, A.; ADURIZ, G.; MORENO, B. et al. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. **Veterinary Parasitology**, v.102, n.1-2, p.17-27, 2001.
- HUTCHISON, W.M. The nematode transmission of *Toxoplasma gondii*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.61, p.80–89, 1967.
- INNES, E.A.; BARTLEY, P.M.; BUXTON, D. Ovine toxoplasmosis. **Parasitology**, v.136, n.14, p.1887-1894, 2009.
- INNES, E.A. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. **Zoonosis and Public Health**, v.57, n.1, p.1-7, 2010.
- JENKINS, M.C.; BASZLER, T.; BJORKMAN, C. et al. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **International Journal for Parasitology**, v.32, n.5, p.631-636, 2002.
- JENKINS, M.C.; TUO, W.B.; DUBEY, J.P. Evaluation of vaccination with *Neospora caninum* protein for prevention of fetal loss associated with experimentally induced neosporosis in sheep. **American Journal of Veterinary Research**, v.65, n.10, p.1404-1408, 2004.
- KHATER, H.; KHALIFA, N.; BARAKAT, A. Serological and molecular studies of ovine and human toxoplasmosis with a trial of treatment of infected ewe. **Scientific Journal of Veterinary Advances**, v.2, n.11, p.157-168, 2013.

- KING, J.S.; SLAPETA, J.; JENKINS, D.J. et al. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.40, n.8, p.945-950, 2010.
- KOBAYASHI, Y.; YAMADA, M.; OMATA, Y. et al. Naturally occurring *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses. **Journal of Parasitology**, v.87, p.434–436, 2001.
- LEFEBVRE, R.C. Fetal mummification in the major domestic species: current perspectives on causes and management. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, v.6, p.233-244, 2015.
- LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.G. et al. A newly revised classification of the Protozoa. **The Journal of Protozoology**, v.27, n.1, p.37-58, 1980.
- 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, p.1521-1523, 1999.
- LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. Neosporosis, Toxoplasmosis and Sarcocystosis in ruminants: An Update. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.36, n.1, p.205-222.
- LOPES, W.D.Z.; RODRIGUEZ, J.D.A.; SOUZA, F.A. et al. Sexual transmission of *Toxoplasma gondii* in sheep. **Veterinary Parasitology**, v.195, n.1-2, p.47-56, 2013.
- LUGOCH, G.; NORO, M.; ANDRADE, J. Metanálise da prevalência de toxoplasmose em gatos e ovinos no Brasil. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v.6, n.1, p.41-70, 2019.
- MACDONALD, D. The behaviour and ecology of farm cats. In: **The Ecology and Control of Feral Cats, Herts**. University Federation for Animal Welfare, Potters Bar, p.23-29, 1980.
- MACHADO, T.M.M.; LIMA, J.D. Frequência de anticorpos anti-*T. gondii* em caprinos criados sob diferentes formas de exploração no estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.39, n.2, p.255-264, 1987.

MAGALHÃES, F.B.; JESUS, E.E.V.; ALMEIDA, M.A.O. et al. Serologic evidences of human *Neospora caninum* infection in Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY. **Anais...** Bahia, 2002.

MAGALHÃES, V.R.; SANTANA, A.F.; OLIVEIRA, A.C. Levantamento da ocorrência de anomalias da mandíbula em caprinos e ovinos, encontrada em cinco municípios da microrregião de Irecê (BA). **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.2, p.341-345, 2008.

MAGALHÃES, F.J.R.; RIBEIRO-ANDRADE, M.; ALCÂNTARA, A.M. et al. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in sheep and cattle from Fernando de Noronha Island, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.25, n.4, p. 511-515, 2016.

MALMASI, A.; MOSALLANEJAD, B.; MOHEBALI, M. et al. Prevention of shedding and re-shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts in experimentally infected cats treated with oral clindamycin: a preliminary study. **Zoonoses and Public Health**, v.56, n.2, p.102-104, 2009.

MASALA, G.; PORCU, R.; DAGA, C. et al. Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia Italy by PCR. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.19, p.96-98, 2007.

McALLISTER, M.M.; McGUIRE, A.M.; JOLLEY, W.R. et al. Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. **Veterinary Pathology**, v.33, n.6, p.647-655, 1996.

McALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.28, n.9, p.1473-1478, 1998.

McALLISTER, M.M.; BJÖRKMAN, C.; ANDERSON-SPRECHER, R. et al. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.217, n.6, p.881-887, 2000.

McALLISTER, M.M. The comparative pathology of neosporosis. In: FÓRUM BRASILEIRO DE ESTUDOS SOBRE *Neospora caninum*. **Anais...** São Paulo: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, p.14-16, 2005.

- McAULEY, J.B. Congenital toxoplasmosis. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v.3, n.1, p.S30-S35, 2014.
- McCOLGAN, C.; BUXTON, D.; BLEWETT, D.A. Titration of *Toxoplasma gondii* oocysts in non-pregnant sheep and the effects of subsequent challenge during pregnancy. **The Veterinary Record**, v.123, n.18, p.467-470, 1988.
- MEIXNER, N.; SOMMER, M.F.; SCUDA, N. et al. Comparative aspects of laboratory testing for the detection of *Toxoplasma gondii* and its differentiation from *Neospora caninum* as the etiologic agent of ovine abortion. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.32, n.6, p.898-907, 2020.
- MENZIES, P.I. Control of important causes of infectious abortion in sheep and goats. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.27, n.1, p.81-93, 2011.
- MORENO, B.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; VILLA, A. et al. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. **Veterinary Parasitology**, v.187, n.1-2, p.312-318, 2012.
- MORLEY, E.K.; WILLIAMS, R.H.; HUGHES, J.M. et al. Evidence that primary infection of Charollais sheep with *Toxoplasma gondii* may not prevent foetal infection and abortion in subsequent lambings. **Parasitology**, v.135, n.2, p.169-173, 2008.
- MOURA, A.B.; OSAKI, S.C.; ZULPO, D.L. et al. Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em suínos e ovinos abatidos no município de Guarapuava, PR, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, n.1, p.54-56, 2007.
- MOURA, R.L.S.; CARVALHO, F.S.; O'DWYER, H.N.S. et al. Identificação de *Toxoplasma gondii* em leite de ovelhas do Sul da Bahia. In: 38° CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 2011.
- MOURA, A.B.; SILVA, M.O.; TREVISANI, N. et al. *Toxoplasma gondii*: soroprevalência e fatores de risco em ovelhas no planalto serrano de Santa Catarina, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.74, n.3, p.200-206, 2015.
- MUGRIDGE, N.B.; MORRISON, D.A.; HECKEROTH, A.R. et al. Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals

that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1545-1556, 1999.

MÜLLER, N.; ZIMMERMANN, V.; HENTRICH, B. 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.

MUNHÓZ, K.F.; NETO, M.L.; SANTOS, S.M.A. et al. Occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in sheep from farms located in northern Parana, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, n.4, p.1031-1039, 2010.

NASCIMENTO, W.S. Hipoplasia prosencefálica em um caprino. 2020. 32f. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2020.

NETTLETON, P.F.; GILRAY, J.A.; RUSSO, P. et al. Border disease of sheep and goats. **Veterinary Research**, v.29, p.327-340, 1998.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection a corps de *Leishman* (ou organismes voisins) du gondi. **Comptes rendus de l'Académie des Sciences**, v.147, p.763-766, 1908.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Comptes rendus de l'Académie des Sciences**, v.148, p.369-372, 1909.

NUTTER, F.B.; DUBEY, J.P.; LEVINE, J. F. et al. Seroprevalences of antibodies against *Bartonella henselae* and *Toxoplasma gondii* and fecal shedding of *Cryptosporidium* spp, *Giardia* spp, and *Toxocara cati* in feral and pet domestic cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.225, n.9, p.1394-1398, 2004.

OGUZOGLU, T.C. A review of Border Disease virus infection in ruminants: molecular characterization, pathogenesis, diagnosis and control. **Animal Health, Production and Hygiene**, v.1, p.1-9, 2012.

O'HANDLEY, R.M.; MORGAN, S.A.; PARKER, C. et al. Vaccination of ewes for prevention of vertical transmission of *Neospora caninum*. **American Journal of Veterinary Research**, v.64, n.4, p.449-452, 2003.

- OPORTO, B.; BARANDIKA, J.F.; HURTADO, A. et al. Incidence of ovine abortion by *Coxiella burnetii* in Northern Spain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1078, p.498–501, 2006.
- OWEN, M.R.; CLARKSON, M.J.; TREES, A.J. Acute phase toxoplasma abortions in sheep. **Veterinary Record**, v.142, n.18, p.480-482, 1998.
- 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.
- PARSONSON, I.M.; DELLA-PORTA, A.J.; SNOWDON, W.A. Congenital abnormalities in newborn lambs after infection of pregnant sheep with Akabane virus. **Infection and Immunity**, v.15, n.1, p.254-262, 1977.
- PASSEMARD, S.; KAINDL, A.M.; VERLOES, A. Microcephaly. **Handbook of Clinical Neurology**, v.111, p.129-141, 2013.
- PAVARINI, S.P.; SONNE, L.; ANTONIASSI, N.A.B. et al. Anomalias congênitas em fetos bovinos abortados no Sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.3, p.149-154, 2008.
- PENA, H.F.; SOARES, R.M.; RAGOZO, A.M. et al. Isolation and molecular detection of *Neospora caninum* from naturally infected sheep from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.147, p.61-66, 2007.
- PEREIRA, M.F.; MOTA, R.A.; PEIXOTO, R.M. et al. Estudo de casos de aborto em caprinos e ovinos no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.16, n.1-2-3, p.18-30, 2013.
- PEREIRA-BUENO, J.; QUINTANILLA-GONZALO, A.; PÉREZ-PÉREZ, V. et al. Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. **Veterinary Parasitology**, v.121, n.1-2, p.33-43, 2004.
- PÉREZ, A.L.; MORENO, B.; ADURIZ, G. Necropsia y toma de muestras de abortos ovinos. **Revista Ovis: Tratado de Patología y Producción Ovina**, n.86, p.65-67, 2003.

- PESCADOR, C.A.; CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D. Neurological disorder associated with pestivirus infection in sheep in Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, v.34, n.3, p.935-938, 2004.
- PINTO, A.P.; BACHA, F.B.; SANTOS, B.S. et al. Abortos por *Neospora caninum* em ovinos em Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, p.739-742, 2012.
- POTTS, B.J.; BERRY, L.J.; OSBURN, B.I. et al. Viral persistence and abnormalities of the central nervous system after congenital infection of sheep with Border Disease Virus. **The Journal of Infectious Diseases**, v.151, n.2, p.337-343, 1985.
- POURAMINI, A.; JAMSHIDI, S.; SHAYAN, P. et al. Molecular and serological detection of *Neospora caninum* in multiple tissues and CSF in asymptomatic infected stray dogs. **Iranian Journal of Veterinary Medicine**, v.11, n.2, p.105-112, 2017.
- REICHEL, M.P. *Neospora caninum* infection in Australia and New Zealand. **Australian Veterinary Journal**, v.78, p.258-261, 2000.
- ROMANELLI, P.R.; FREIRE, R.L.; VIDOTTO, O. et al. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v.82, p.202-207, 2007.
- ROMERO, J.J.; FRANKENA, K. Bovine neosporosis: a review. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.3, n.12, p.901-913, 2004.
- ROSA, L.D. Prevalência e fatores de risco para infecção por *Neospora caninum* em ovinos no município de Lages, Santa Catarina, Brasil. 2010. 49f. **Dissertação de Mestrado**. Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2010.
- ROSSI, G.F.; CABRAL, D.D.; SILVA, D.A.O. et al. Frequência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em ovinos do município de Uberlândia, MG. In: VIII Encontro Interno e XII Seminário de Iniciação Científica. **Anais...** Universidade Federal de Uberlândia. 2008.
- SAKATA, F.B.L.S.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A. Anticorpos toxoplásmicos em ovinos de Lages, Santa Catarina, Brasil, e comparação utilizando RIFI e ELISA. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, n.3, p.196-200, 2012.

SANDVIK, T. Border disease virus: time to take more notice? **Veterinary Record**, v.174, p.65-66, 2014.

SANTOS, M.V. Biossegurança aplicada ao controle de mastite. **Balde Branco**, v.463, p.62-65, 2003.

SANTOS, J.R.; DANTAS, A.F.M.; RIET-CORREA, F. Malformações, abortos e mortalidade embrionária em ovinos causada pela ingestão de *Mimosa tenuiflora* (Leguminosae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.11, p.1103-1106, 2012.

SANTOS, T.R. Toxoplasmose congênita em ovelhas reinfectedadas experimentalmente. 2012. 119f. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

SAWADOGO, P.; HAFID, J.; BELLETE, B. et al. Seroprevalence of *T. gondii* in sheep from Marrakech, Morocco. **Veterinary Parasitology**, v.120, n.1-2, p.89-92, 2005.

SCHILD, A.L. Defeitos congênitos. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A. & BORGES, J.R.J. (Eds.) **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. Santa Maria, RS: Pallotti, 3.ed. v.1, p.25-55, 2007.

SCHLAFER, D.H.; FOSTER, R.A. Female Genital System. In: MAXIE, M.G. (Ed.) **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. 6.ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2015.

SCHMIDT, M.; ONDREKA, N. Hydrocephalus in animals. In: CINALLI, G.; OZEK, M.; SAINTE-ROSE, C. (Eds.) **Pediatric Hydrocephalus**. Vol.3. Cham: Springer, p.53-95, 2018.

SCHREUR, P.J.W.; KEULEN, L.V.; ANJEMA, D. et al. Microencephaly in fetal piglets following in utero inoculation of Zika virus. **Emerging Microbes and Infections**, v.7, n.1, p.1-11, 2018.

SCHWARTZ, D.A. Autopsy and postmortem studies are concordant: pathology of Zika Virus infection is neurotropic in fetuses and infants with microcephaly following transplacental transmission. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v.141, n.1, p.68-72, 2017.

SHIVAPRASAD, H.L.; ELY, R.; DUBEY, J.P. A neospora-like protozoon found in na aborted ovine placenta. **Veterinary Parasitology**, v.34, n.1-2, p.145-148, 1989.

- SILVA, A.; CORRÊA, M.J.U.; BASTOS, A.M. Sistema ventricular. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v.14, n.2, p.60-65, 2003.
- SILVA, A.V.; CUNHA, E.L.P.; MEIRELES, L.R. et al. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soroepidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência Rural**, v.33, n.1, p.115-119, 2003.
- SILVA, S.A.; CASTRO, M.R.; WILSON, T.M. et al. Hidrocefalia congênita em cão – relato de dois casos. **Enciclopédia Biosfera**, v.13, n.24, p.580, 2016.
- SIMPLÍCIO, A.A. Caprinocultura e ovinocultura de corte no Brasil: pontos para reflexão. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília, n.52, p.27-36, 2011.
- SIVACHELVAN, M.N.; GHALI ALI, M.; CHIBUZO, G.A. Foetal age estimation in sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v.19, n.1, p.69-76, 1996.
- SOARES, H.S.; AHID, S.M.M.; BEZERRA, A.C.D.S. et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in sheep from Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.160, p.211-214, 2009.
- SOCARRÁS, T.J.O. Infecção experimental de ovelhas deslanadas com *Neospora caninum*. 74f, 2001. **Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária**, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.
- SOUSA, I.K.F.; MINERVINO, A.H.H.; BARROS, I.O. et al. Surto de ataxia enzoótica em ovinos em Mossoró – RN. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, p.134-139, 2009. Suplemento 1.
- SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita de' conigli. incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell' uomo. Nota preliminare pel. **Revista da Sociedade Científica de São Paulo**, v.3, p.109-112, 1908.
- SPÓSITO FILHA, E.; OLIVEIRA, S.M. Divulgação técnica: Toxoplasmose. **Biológico**, v.71, n.1, p.13-15, 2009.
- SUMMERS, B.A.; CUMMINGS, J.F.; LAHUNTA, A. Malformations of the central nervous system. In: SUMMERS, B.A.; CUMMINGS, J.F.; LAHUNTA, A. (Eds): **Veterinary Neuropathology**, St. Louis: Mosby, 2000.

SUNDERMANN, C.A.; ESTRIDGE, B.H.; BRANTON, M.S. et al. Immunohistochemical diagnosis of *Toxoplasma gondii*: potential for cross-reactivity with *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, v.83, n.3, p.440-443, 1997.

TEMBUE, A.A.; RAMOS, R.A.; SOUSA, T.R. et al. Serological survey of *Neospora caninum* in small ruminants from Pernambuco State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, p.246-248, 2011.

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal of Parasitology**, v.30, n.12-13, p.1217-1258, 2000.

TRANAS, J.; HEINZEN, R.A.; WEISS, L.M. et al. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.6, p.765-767, 1999.

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

UENO, T.E.H. Prevalência das infecções por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em matrizes e reprodutores ovinos de rebanhos comerciais do Distrito Federal. Brasil. 2005. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

UGGLA, A.; SJÖLAND, L.; DUBEY, J.P. Immunohistochemical diagnosis of toxoplasmosis in fetuses and fetal membranes of sheep. **American Journal of Veterinary Research**, v.48, n.3, p.348-351, 1987.

VAN DER PUIJE, W.N.A.; BOSOMPEM, K.M.; CANACOO, E.A. et al. The prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Ghanaian sheep and goats. **Acta Tropica**, v.76, n.1, p.21-26, 2000.

VANDEVELDE, M.; HIGGINGS, R.J.; OEVERMANN, A. *Veterinary Neuropathology: Essentials of Theory and Practice*. 1.ed. Bern: Willey-Blackwell, 2012, 209p.

VANLEEUVEN, J.A.; HADDAD, J.P.; DOHOO, I.R. et al. Risk factors associated with *Neospora caninum* seropositivity in randomly sampled Canadian dairy cows and herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v.93, n.2-3, p.129-138, 2010.

- VAN MAANEN, C.; WOUDA, W.; SCHARES, G. et al. An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. **Veterinary Parasitology**, v.126, n.4, p.351-364, 2004.
- VARASCHIN, M.S.; HIRSCH, C.; WOUTERS, F. et al. Congenital neosporosis in goats from the State of Minas Gerais, Brazil. **Korean Journal of Parasitology**, v.50, n.1, p.63-67, 2012.
- VIANA, J.G.A. Panorama geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, v.4, n.12, p.1-10, 2008.
- VOGEL, F.S.F.; ARENHART, S.; BAUERMANN, 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.
- WAPENAAR, W.; JENKINS, M.C.; O'HANDLEY, R.M. et al. *Neospora caninum*-like oocysts observed in feces of free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) and coyotes (*Canis latrans*). **Journal of Parasitology**, v.92, n.6, p.1270-1274, 2006.
- WEST, D.; POMROY, W.; COLLETT, M. et al. A possible role for *Neospora caninum* in ovine abortion in New Zealand. **Small Ruminant Research**, v.62, p.135–138, 2006.
- WESTON, J.F.; HOWE, L.; COLLETT, M.G. et al. Dose-titration challenge of Young pregnant sheep with *Neospora caninum* tachyzoites. **Veterinary Parasitology**, v.164, n.2-4, p.183-191, 2009.
- WILLIAMS, D.J.L.; GUY, C.S.; MCGARRY, J.W. et al. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. **Parasitology**, v.121, n.4, p.347-358, 2000.
- WOODS, L.W.; ANDERSON, M.L. Scoliosis and hydrocephalus in an ovine fetus infected with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.4, n.2, p.220-222, 1992.

8. APÊNDICE I (DUAS PÁGINAS)



OCORRÊNCIA DE ABORTAMENTOS EM OVINOS NATURALMENTE INFECTADOS POR *Toxoplasma gondii* E *Neospora caninum* NO ESTADO DE SANTA CATARINA

Responsável: Jéssica Aline Withoef

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

() Carrapato

() Mastite

() Problema respiratório

() Problema reprodutivo

() Parasitoses

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 ovinos? _____

1.2 Qual é o tamanho total do plantel de ovinos? _____

1.3 Qual a aptidão dos ovinos? _____

1.4 Qual/quais raça(s) utilizadas na produção? _____

1.5 Quantas ovelhas são:

_____ Primíparas (ovelhas de primeira cria);

_____ Multíparas.

1.6 Possui quantas borregas para reposição _____

2.0 Quantas pessoas trabalham diretamente com os ovinos? _____

3

4.0 Há quanto tempo está criando ovinos nesta propriedade?

_____ anos e ½ < 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 ovinocultura, há alguma outra atividade?

() **sim** () não

() Bovinocultura () Avicultura () Agricultura () Outra _____

Biosseguridade

6.0 O/a Sr.(a) já levou ovinos 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 ovelhas 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 ovinos 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 ovinos?

() **não; apenas carneiro; 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 macho (monta Natural)?

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

() sim

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

() Nascido na propriedade

() Comprado

() Emprestado

11.0 O/A Sr. (a) realiza a prática de ultrassom para diagnóstico gestacional nos ovinos?

() não

() sim

12.0 A propriedade possui piquetes maternidade?

() Não

() Sim

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

() 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 ovelha**, para ser fornecido aos cordeiros?

() não

() sim

14.0 Nos últimos anos o/a Sr.(a) observou **nascimentos de cordeiros fracos?**

() não

() **sim; caso sim, Quantos aproximadamente?**(_____)

Quantos morreram?(_____)

15.0 Nos últimos anos houve aumento da ocorrência* de retorno

ao cio nos ovinos (que tenha fugido da normalidade)?

() não () sim

15.1 Nos últimos anos houve aumento da ocorrência* de aborto** nos ovinos (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 ovinos 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?

() 1-2 mês () 5º mês

() 3-4 mês () Todos os meses

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, cordeiro ou placenta)?

() Não () Sim

15.6 Gatos da sua propriedade ou propriedades vizinhas podem ter acesso aos produtos de aborto (feto, cordeiro ou placenta)?

() Não () Sim

Condições sanitárias

16.0 Nos últimos anos o/a Sr.(a) adotou alguma vacinação nos ovinos?

() sim () não realiza vacinação

Quais _____

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 ovinos?

() não

() sim; caso sim, Quais? () Cochos e bebedouros

() pastagens () Instalações de ordenha

17.3 Cães de propriedades vizinhas têm acesso ao mesmo ambiente dos ovinos?

() não () sim

18.0 Nos últimos anos o/a Sr.(a) observou a presença de animais silvestres na propriedade (canídeos ou felídeos)?

() 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, ratão 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

Leão-baio

() Nunca () Às vezes () Sempre

Outros? _____

Manejo/ instalações

19.0 Como é o sistema de produção em sua propriedade?

() Confinado; () Á pasto.

() Semi-confinado;

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

*Contato físico quer dizer: contato focinho-focinho ou espiro/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 ovinos 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 ovinos?

() 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) mantém 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 ovinos, 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

Observações:

Identificação Funcional

Data da aplicação: ____ / ____ / ____