



**IVAM MOREIRA DE OLIVEIRA JUNIOR**

**DETECÇÃO DE DNA DE *Neospora caninum* EM COLOSTRO,  
LEITE E GLÂNDULA MAMÁRIA DE CABRAS  
NATURALMENTE INFECTADAS**

**LAVRAS - MG  
2024**

**IVAM MOREIRA DE OLIVEIRA JUNIOR**

**DETECÇÃO DE DNA DE *Neospora caninum* EM COLOSTRO, LEITE E GLÂNDULA  
MAMÁRIA DE CABRAS NATURALMENTE INFECTADAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Patologia Veterinária, para a obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Mary Suzan Varaschin  
Orientadora

**LAVRAS-MG  
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Oliveira Junior, Ivam Moreira de.

Detecção de DNA de *Neospora caninum* em colostro, leite e glândula mamária de cabras naturalmente infectadas / Ivam Moreira de Oliveira Junior. - 2023.

43 p. : il.

Orientador(a): Mary Suzan Varaschin.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.  
Bibliografia.

1. Ciências Veterinárias. 2. Patologia Animal. 3. Neosporose. I. Varaschin, Mary Suzan. II. Título.

**IVAM MOREIRA DE OLIVEIRA JUNIOR**

**DETECÇÃO DE DNA DE *Neospora caninum* EM COLOSTRO, LEITE E GLÂNDULA  
MAMÁRIA DE CABRAS NATURALMENTE INFECTADAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Patologia Veterinária, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 30 de novembro de 2023

Dra. Glaucia Denise Kommers - UFSM

Dra. Isis Abel Bezerra- UFPA

Dr. Djeison Lutier Raymundo - UFLA

Dr. Flademir Wouters - UFLA

Profa. Dra. Mary Suzan Varaschin  
Orientadora

**LAVRAS-MG  
2024**

*Aos meus pais e familiares por acreditarem em mim e por sempre estarem ao meu lado, por todo o apoio, compreensão e, acima de tudo, amor.*

Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pelas bênçãos derramadas em minha vida e por todas as conquistas alcançadas.

Aos meus pais, principalmente a minha mãe, Claudineia Rodrigues da Silva, por todo o esforço e dedicação para me ver chegar até aqui, ao meu pai Ivan Moreira de Oliveira e à minha irmã Jessika, por todo o apoio e conselhos durante todos esses anos. Aos meus avós, tios, tias e primos.

Ao Setor de Patologia Veterinária da UFLA e aos amigos e colegas de jornada, pois dividimos juntos diversos momentos durante essa jornada.

À minha orientadora, Mary Suzan Varaschin, por toda paciência e apoio durante todos esses anos, desde a iniciação científica. Aos demais professores da Patologia, Angélica T. Barth Wouters, Flademir Wouters, Djeison Lutier Raymundo, por todo ensinamento, dedicação e exemplo.

Ao Laboratório Integrado em Saúde Coletiva da UFLA, na pessoa da professora Elaine M. Seles Dorneles, agradeço imensamente por todo o auxílio e dedicação.

Aos alunos de iniciação científica Ana Paula, Daniel e Amanda, que cuidaram tão bem das cabras e auxiliaram diversas vezes quando precisei.

Ao Sr. Francisco que sempre ajudou a cuidar tão bem das cabras e do laboratório.

Enfim, sem vocês esse trabalho não seria possível.

**MUITO OBRIGADO!!!**

*“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre”*

Paulo Freire

## RESUMO

*Neospora caninum* tem o cão e outros carnívoros selvagens como hospedeiros definitivos, os quais eliminam oocistos pelas fezes, que servem como fonte de infecção, por via oral, para outras espécies. Entretanto, a transmissão vertical é considerada a principal fonte de infecção e manutenção do *N. caninum* nos rebanhos. A transmissão do parasito por via lactogênica é pouco estudada, não existindo estudos em caprinos e ovinos. Assim como, nas várias espécies animais, o leite não foi avaliado em diferentes períodos de lactação quanto a presença do DNA do parasito e a glândula mamária em lactação quanto a presença de lesões ou do agente. Desta forma, o objetivo deste estudo foi pesquisar a presença de *N. caninum* em glândula mamária pela histopatologia, Imuno-histoquímica e PCR, detectar o DNA de *N. caninum* no colostro e leite por meio de PCR e de anticorpos anti-*N. caninum* no soro sanguíneo pela RIFI no parto e ao longo do período de lactação. Foram utilizadas dez cabras naturalmente infectadas confirmadas pela presença de anticorpos anti-*N. caninum* pela RIFI e como controles negativos três cabras soronegativas. Duas cabras positivas morreram ao longo do período experimental. Foram coletadas amostras de sangue das cabras no dia do parto (mãe e filhote antes de mamar o colostro) e mensalmente (mãe e filhote) até o dia 120 pós-parto. Também foram coletados 10 mL de colostro e de leite através de ordenha manual no dia do parto (D0), dia 3 (D3), D6, D9, D12, D15, D30, D45, D60, D75, D90, D105 e D120, totalizando 105 amostras de animais positivos e 39 de animais negativos. As cabras foram eutanasiadas sob anestesia profunda ao final dos 120 dias e amostras da glândula mamária foram submetidas à PCR e IHQ. Histologicamente havia inflamação linfoplasmocitária leve ou moderada em quatro e três cabras, respectivamente, entretanto não foi observado o parasito na histopatologia e na IHQ, mas nove das 10 cabras positivas apresentaram *Amplicons* em glândula mamária e 62 das 105 amostras de leite e colostro foram positivas na PCR, sendo o colostro positivo em oito das nove amostras testadas (88,88%). Os resultados demonstram que a via lactogênica é uma possível rota de transmissão do *N. caninum*, além de chamar a atenção para a necessidade de se testar os bancos de colostro frequentemente utilizados em ruminantes.

**Palavras-chave:** Caprinos. Leite, Neosporose. PCR.



## ABSTRACT

*Neospora caninum* has dogs and other wild carnivores as definitive hosts, which shed oocysts with the faeces, that serve as a source of oral infection for other species. However, vertical transmission is considered the main source of infection and maintenance of *N. caninum* in herds. The transmission of the parasite via the lactogenic route is poorly studied, with no studies in goats and sheep. Likewise, in the various animal species, milk was not evaluated in different lactation periods for the presence of the parasite's DNA and the lactating mammary gland for the presence of lesions or the agent. Therefore, the aim of the present study was to reevaluate the presence of *N. caninum* by histopathology, immunohistochemistry (IHC) and PCR in the mammary gland, detect *N. caninum* DNA in colostrum and milk by PCR and anti-*N. caninum* antibodies in blood serum by RIFI at birth and throughout the lactation period. Ten naturally infected goats with anti-*N. caninum* antibodies confirmed by RIFI were used and three seronegative goats as negative controls. Two positive goats died during the experimental period. Blood samples were collected from the goats on the day of birth (mother and goat kids before the ingestion colostrum) and monthly (mother and goat kids) until day 120 postpartum. Also, 10 mL of colostrum and milk were collected through manual milking on the day of parturition (D0), day 3 (D3), D6, D9, D12, D15, D30, D45, D60, D75, D90, D105 and D120, totaling 105 samples from positive and 39 from negative animals. The goats were euthanized under deep anesthesia at the end of 120 days and mammary gland samples were subjected to PCR and IHC. Histologically, there was discrete or moderate lymphoplasmacytic inflammation in four and three goats, respectively, however, the parasite was not observed in histopathology and IHC, but nine of the 10 positive goats presented *Amplicons* in the mammary gland and 62 of the 105 milk and colostrum samples were positive in the PCR, with colostrum being positive in eight of the nine samples tested (88.88%). The results demonstrate that the lactogenic via is a possible transmission route for *N. caninum* and draws attention to the need to test colostrum banks, frequently used in ruminants.

**Key words:** Goats. Milk, Neosporosis. PCR

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### PRIMEIRA PARTE

Figura 1: Ciclo de vida do <i>Neospora caninum</i> .....	15
--	----

### SEGUNDA PARTE

Fig. 1: Locais de coleta de material de glândula mamária de cabras. LD: Lateral direito. LE: Lateral esquerdo. M: medial.....	32
Fig. 2. Detecção de DNA de <i>Neospora caninum</i> em glândula mamária e colostro de cabras naturalmente infectadas.....	36
Fig. 3. Detecção de DNA de <i>Neospora caninum</i> em colostro e leite da cabra naturalmente infectadas.....	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado da Reação de Imunofluorescência Indireta em soro sanguíneo de cabras naturalmente infectadas por <i>Neospora caninum</i> do dia do parto até 120 dias de lactação.....	36
Tabela 2. Titulação por Reação de Imunofluorescência Indireta em soro sanguíneo pré-colostro dos cabritos de cabras naturalmente infectadas por <i>Neospora caninum</i> . ....	36
Tabela 3. Resultado da PCR das glândulas mamárias das cabras naturalmente infectadas por <i>Neospora caninum</i> .....	37
Tabela 4. Resultado da PCR do colostro e leite de cabras naturalmente infectadas por <i>N. caninum</i> .....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
IgG	Imunoglobulina G
IHQ	Imuno-histoquímica
M	Molar
min	Minutos
Mg	Miligrama
mM	Micromolar
Ng	Nanograma
°C	Graus Celsius
Pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia de polimerase
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
ml	Microlitro
µm	Micrômetro

## SUMÁRIO

### PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO .....	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	14
2.1 <i>Neospora caninum</i> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.2 Importância da doença .....	16
2.3 Transmissão .....	16
2.3.1 Transmissão vertical .....	16
2.4.2 Detecção de anticorpos em soro sanguíneo, colostro e leite .....	20
3. REFERÊNCIAS .....	21
SEGUNDA PARTE – ARTIGO .....	29
RESUMO .....	30
INTRODUÇÃO .....	31
MATERIAIS E MÉTODOS .....	31
Manejo dos caprinos e coleta de sangue .....	31
Coleta das amostras de colostro e leite .....	32
Coleta de material para exame histopatológico, imuno-histoquímico e PCR .....	32
Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) .....	33
Histopatologia e Imuno-histoquímica .....	35
RESULTADOS .....	35
DISCUSSÃO .....	39
CONCLUSÃO .....	40
REFERÊNCIAS .....	40
ANEXO 1 .....	43

## 1. INTRODUÇÃO

*Neospora caninum* é um protozoário do filo Apicomplexa, que possui os canídeos como hospedeiros definitivos (Dubey *et al.*, 1988; Dubey; Schares, 2011). A neosporose é considerada uma importante causa de aborto em gado leiteiro e de corte em todo o mundo (Dubey; Schares, 2011) e em caprinos vem se destacando como importante agente de falhas reprodutivas (Costa *et al.*, 2014, Mesquita *et al.*, 2013, Varaschin *et al.*, 2012).

Apesar do cão e outros carnívoros eliminarem oocistos no ambiente e estes servirem como fonte de infecção, por via oral, para outras espécies, a transmissão vertical desse agente é considerada a principal fonte de infecção (Almeria *et al.*, 2003) para bovinos (Dubey *et al.*, 2017; Macaldowie *et al.*, 2004) e caprinos (Costa *et al.*, 2014; Mesquita *et al.*, 2013; Varaschin *et al.*, 2012).

A neosporose clínica em ruminantes é manifestada pela ocorrência de abortos recorrentes e falhas reprodutivas com repetição de cio. Os abortos ocorrem geralmente no período de 5 a 6 meses de gestação em bovinos e os fetos podem morrer no útero, serem absorvidos, mumificados, macerados, nascerem mortos, nascerem vivos com sinais clínicos ou nascerem clinicamente normais, mas permanentemente infectados (Dubey *et al.*, 2011). Já em caprinos, poucos relatos de abortos ou falhas reprodutivas são descritos (Mesquita *et al.*, 2013; Varaschin *et al.*, 2012), porém o nascimento de animais não infectados também é relatado (Mesquita *et al.*, 2013).

O aborto ocorre após transmissão transplacentária. Esta pode ser dividida em exógena ou endógena. A primeira é decorrente da ingestão de oocistos liberados nas fezes de cães, já a segunda é devido a recrudesência dos bradizoítos encistados que se transformam na forma infectante chamada de taquizoítos (Dubey *et al.*, 2011; Rosbottom *et al.* 2008), porém a grande maioria dos animais nasce clinicamente sadia (Macaldowie *et al.*, 2004; Mesquita *et al.*, 2013). Após a transmissão não se sabe ao certo os mecanismos específicos causadores do aborto. Possivelmente fatores como tempo da primeira infecção, tempo de recrudesência da infecção em animais persistentemente infectados, os efeitos da gestação na imunidade materna, o tipo da cepa parasitária, susceptibilidade do hospedeiro e o estágio de desenvolvimento fetal em que a infecção foi adquirida podem influenciar na ocorrência ou não do aborto.

Muitos estudos vêm sendo conduzidos para explicar a patogenia da neosporose. Algumas respostas nosso grupo de estudo demonstrou, entre elas, que a infecção por *N.*

*caninum* persiste através das gerações de cabras congenitamente infectadas. Estudando até cinco gerações de cabras, em 95 amostras de soro de animais positivos, 93 continham anticorpos anti-*N. caninum* (97,8%) (Oliveira Junior *et al.*, 2020). Também comprovamos, que com o aumento do número de gerações, os filhotes tenderam a ter títulos anti *N. caninum* menores ( $p=0,021$ ) no dia do nascimento. Alterações reprodutivas como abortos, natimortos ou retenção fetal ocorreram numa taxa de 10,4% e não foram influenciadas pelo título anti-*N. caninum* da mãe, no dia do parto ou aborto. Também detectamos a presença de DNA de *Neospora caninum* em 25% das glândulas mamárias de cabras adultas e secas (Nakagaki *et al.*, 2016), sendo importante saber se essa positividade pode alterar durante a lactação.

Há poucos estudos sobre a importância da via lactogênica na transmissão do *N. caninum*, principalmente em animais naturalmente infectados. Davison *et al.* (2001) demonstraram experimentalmente a transmissão de *N. caninum* via leite para bezerros recém-nascidos, no qual foram inoculados taquizoítos no colostro e leite e fornecido aos animais na primeira semana de vida. Outros trabalhos também detectaram o DNA do parasito no colostro e leite de bovinos, principalmente em leite a granel (Dubey, Schares e Ortega-Mora, 2007; Gharekhani *et al.*, 2021; Moskwa *et al.*, 2003), porém algumas lacunas ainda precisam ser elucidadas, com por exemplo, se há um período específico da lactação para a transmissão do agente. Dessa forma, este projeto tem por objetivo detectar o DNA do *Neospora caninum* em colostro e leite nas diferentes fases da lactação, associado a detecção do agente e avaliação de lesões em glândula mamária de cabras naturalmente infectadas.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Neospora caninum*

A neosporose é uma doença causada pelo *Neospora caninum*, protozoário do filo Apicomplexa, família Sarcocystidae (Dubey *et al.*, 1988). Este parasito é estruturalmente e geneticamente semelhante ao *Toxoplasma gondii*, porém antigenicamente distinto (Mineo *et al.*, 2001; Reid *et al.*, 2012).

O *Neospora caninum* possui ciclo de vida heteroxeno, ou seja, a reprodução dele ocorre de maneira sexuada no hospedeiro definitivo e de forma assexuada no hospedeiro intermediário, sendo o cão (*Canis familiaris*) (McCallister *et al.*, 1998), o coiote (*Canis latrans*) (Gondim *et al.*, 2004), o dingo (*Canis lupus dingo*) (King *et al.*, 2010) e o lobo cinzento (*Canis lupus*) (Dubey *et al.*, 2011) os hospedeiros definitivos e várias espécies animais, entre

elas, os caprinos (McAllister *et al.*, 1998) os hospedeiros intermediários.

O ciclo de vida do *N. caninum* (Figura 1) se divide em três estágios infecciosos: taquizoítos, bradizoítos e oocistos (Dubey, 2017). Os hospedeiros definitivos eliminam oocistos não esporulados nas fezes, após a ingestão de tecidos ou órgãos dos hospedeiros intermediários, provavelmente ingerindo membranas placentárias de animais infectados com cistos teciduais. Os oocistos não esporulados medem em torno de 10-11µm de diâmetro. A esporulação ocorre em torno de 24 horas após a eliminação dos oocistos nas fezes e medem  $11,7 \times 11,3\mu\text{m}$  (Dubey, 2017; Lindsay *et al.*, 1996). Os cistos de *N. caninum* são arredondados a ovalados, revestidos por uma parede espessa que pode chegar até 4 µm, e são preenchidos por bradizoítos medindo aproximadamente 8 x 2µm, alongados e com um núcleo subterminal (Dubey *et al.*, 2002). Os taquizoítos são ovoides, lunares ou globulares, e medem, dependendo do estágio de divisão de 2 x 6-7,5µm e dividem-se em dois zoítos por endodiogenia. Em animais infectados, os taquizoítos podem ser encontrados em diversas células tais como células do sistema nervoso central, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, miócitos, células tubulares renais e hepatócitos (Dubey, 2017).

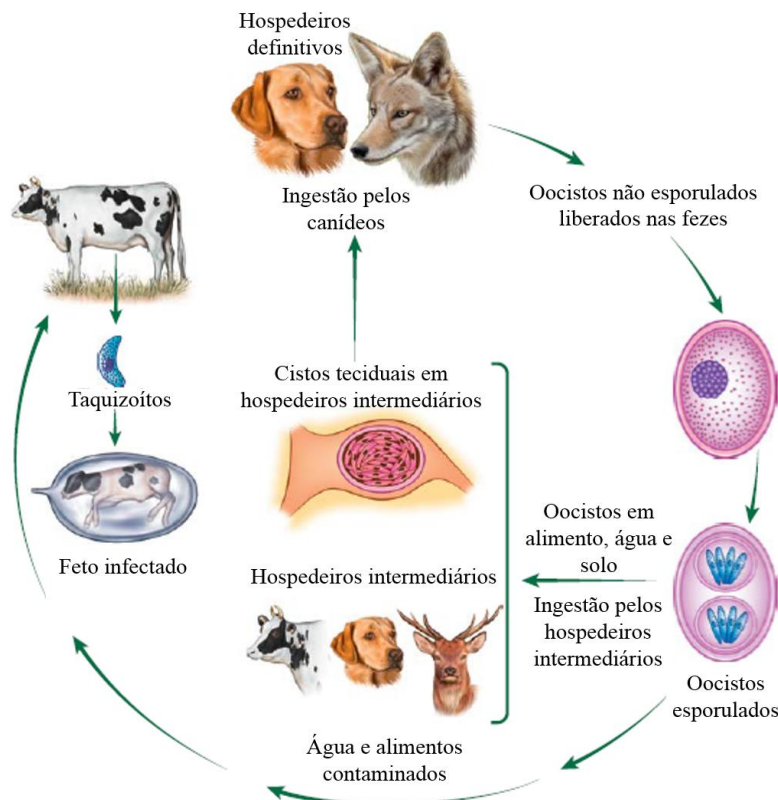


Figura 1: Ciclo de vida do *Neospora caninum*. Adaptado de Dubey (2017).



## 2.2 Importância da doença

Atualmente, a neosporose, é considerada a principal causa de aborto em bovinos em vários países (Dubey, 2003; Dubey e Lindsay, 1996). Em caprinos há poucos relatos de abortos, natimortos ou nascimento de cabritos fracos associados com *N. caninum* (Dubey, 2003; Eleni *et al.*, 2004; Lindsay *et al.*, 1995; Mesquita *et al.*, 2013; Varaschin *et al.*, 2012).

Levantamentos sorológicos, têm sido realizados em várias partes do Brasil. A frequência encontrada nos rebanhos estudados em Minas Gerais foi de 10,7% (Varaschin *et al.*, 2011), sendo esta, maior que os relatados por outros autores que utilizaram a mesma metodologia para *N. caninum*, como 1,05% em Mossoró, RN (Lima *et al.*, 2008), 3,3% em Patos, PB (Faria *et al.* 2007), 6,34% no estado de São Paulo (Figliuolo *et al.*, 2004). No estado da Bahia, valores maiores ao do presente estudo foram obtidos, onde 15% das cabras testadas foram reagentes (RIFI  $\geq$ 1:100) ao *N. caninum* (Uzêda *et al.*, 2007).

Pesquisas indicam que vacas soropositivas possuem 2 a 26 vezes mais chance de abortar em relação às soronegativas (Lopez-Gatius *et al.*, 2004b; Weston *et al.*, 2005). Há um aumento nos títulos de anticorpos quatro a cinco meses antes do parto, sugerindo que ocorre reativação de uma infecção latente. Pouco se conhece sobre esse mecanismo de reativação, embora, ocorra uma parasitemia durante a gestação, levando a infecção fetal (Dubey, 2003). Em caprinos 83,3% dos animais tiveram um aumento significativo nos valores de IgG anti-*N.caninum* a partir da segunda metade gestacional (Mesquita *et al.*, 2013) e a infecção por *N. caninum* foi demonstrada em até cinco gerações de cabras naturalmente infectadas (Oliveira Junior *et al.*, 2020) evidenciando a manutenção do agente nos rebanhos pela transmissão endógena ao longo das gerações de caprinos.

## 2.3 Transmissão

### 2.3.1 Transmissão vertical

A transmissão congênita pode ocorrer quando os taquizoítos presentes em um animal infectado passam para o feto durante a gestação (Dubey; Schares; Ortega-Mora, 2007). Esta é a principal forma de manutenção da infecção no rebanho, sendo que em rebanhos bovinos infectados, 81% a 95% de vacas soropositivas podem transmitir o agente para a prole (Wouda *et al.*, 2007).

Schares *et al.* (1998) analisaram a transmissão em diferentes famílias de bovinos, testando os animais por grupos, onde 93% dos descendentes foram soropositivos. Nesse

mesmo estudo fez-se a árvore genealógica das famílias e em uma delas constatou-se que um ramo apresentou cinco descendentes soropositivos e um segundo ramo de oito animais soronegativos, sugerindo que *N. caninum* pode ser mantido no rebanho com prevalência constante.

Björkman *et al.* (1996) realizaram um estudo com duas famílias de bovinos provenientes de um rebanho com 7% de problemas reprodutivos como natimortalidade, abortos, mumificação fetal e mortes dos bezerros com idade inferior a um mês de vida. Realizaram testes por meio de ELISA e RIFI e observaram que todas as vacas testadas e consideradas soronegativas tiveram filhos soronegativos, enquanto duas vacas soropositivas tinham bezerros soropositivos que nasceram nas gestações sucessivas. Uma das vacas soropositivas teve dois filhos, um soronegativo e um soropositivo, indicando que animais soropositivos podem gerar descendentes soronegativos.

Magalhães *et al.* (2014) utilizando a RIFI para titulação de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos, construiu e analisou 63 árvores genealógicas de duas a quatro gerações por família. Os autores observaram que em 29 (46%) dessas famílias, os animais eram soropositivos para *N. caninum*. Em cinco dessas famílias, todos os animais eram soropositivos, enquanto em 16 famílias, 25% a 90% dos membros eram soropositivos. Nesse estudo não foram comparadas as titulações entre mãe e filho, bem como não avaliaram se houve diminuição ou aumento da titulação, informando somente se em algum momento descendentes de mães soropositivas testavam negativas e concluíram que não ocorreu diferenças entre a soropositividade da progênie em relação ao número de partos, diferindo de autores que demonstraram que as taxas de transmissão pode diminuir com o aumento do número de gestações (Dijkstra *et al.*, 2003; Lopez-Gatius *et al.*, 2004a).

Em caprinos, Oliveira Junior *et al.* (2020) avaliaram seis famílias de caprinos naturalmente infectados. Foram construídas as árvores genealógicas das famílias com três a cinco gerações. Realizaram testes por meio RIFI e verificaram que a infecção por *N. caninum* se manteve ao longo das gerações, e que a taxa de transmissão vertical variou de 71,4% a 100%.

## 2.3.2 Transmissão via lactogênica

### 2.3.2.1 Detecção de DNA de *N. caninum* e *T. gondii* no leite e colostro.

Os primeiros estudos envolvendo leite e colostro como possível forma de transmissão de *N. caninum* ocorreram de forma experimental, onde quantidades pré-determinadas de taquizoítos foram inoculadas nas amostras, porém em animais naturalmente infectados não foi determinada a importância e qual a frequência dessa via de transmissão. Uggla *et al.* (1998) realizaram um estudo experimental com dois bezerros soronegativos, nascidos de mães também soronegativas. Este inoculou de  $3-10 \times 10^7$  taquizoítos de *N. caninum* em um homólogo de colostro, o qual foi fornecido para cada animal em até 6 horas após o nascimento. Após 15 e 19 semanas os bezerros foram eutanasiados. Em ambos os animais foi detectado o DNA de *N. caninum* em cérebro, indicando que a transmissão via lactogênica é possível em bezerros recém-nascidos. Já Davison *et al.* (2001) administrou colostro e leite inoculados com taquizoítos para 4 animais no dia do nascimento e para dois bezerros com uma semana de vida, resultando na soropositividade destes animais para o *N. caninum*.

Descrições sobre a identificação de DNA de *Neospora caninum* no leite e colostro de bovinos são escassos (Gharekhani *et al.*, 2021; Moskwa *et al.*, 2003, 2007). Moskwa *et al.* (2003) em amostras de leite de animais soronegativos e soropositivos com histórico de aborto, identificaram o DNA de *N. caninum* em uma vaca soropositiva, sendo este o primeiro caso detectado em animais naturalmente infectados. Já em 2017, realizaram um estudo em oito vacas oriundas de um rebanho com histórico de aborto. Os animais foram previamente testados, sendo oito soropositivas e cinco soronegativas. Foram coletadas amostras de colostro no dia do parto e de leite no dia seguinte ao parto. As análises das amostras foram feitas pela técnica de ELISA, para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* e pela PCR para detecção do DNA de *N. caninum*. Nesse estudo foi observado que vacas soropositivas apresentaram anticorpos anti-*N. caninum* no colostro e leite, bem como PCR positiva, enquanto as soronegativas permaneceram negativas (Moskwa *et al.*, 2007).

Recentemente foi realizado um estudo para detecção de DNA de *N. caninum*, *T. gondii* e *Brucella* sp. no leite a granel na província de Hamedan, no Irã, onde 55%, 5,4% e 2,7% das amostras foram positivas na PCR para *N. caninum*, *T. gondii* e infecção mista, respectivamente (Gharekhani *et al.*, 2021). Por outro lado, trabalhos descrevendo a detecção de DNA e anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* no colostro e leite de ruminantes, equinos e

camelos (Bezerra *et al.*, 2015; Camossi *et al.*, 2011; Gazzonis *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2021; Sroka *et al.*, 2017), são mais frequentes e serviram de modelo para esse estudo.

Em um estudo feito na Polônia, Sroka *et al.* (2017) avaliaram 60 amostras de leite de cabras por meio da Nested PCR e PCR em tempo real (RT-PCR) com objetivo de identificar o DNA de *T. gondii*. Das 60 amostras, 39 (65%) foram positivas pela RT-PCR e 26 (43%) pela Nested PCR. Das amostras positivas pela PCR, 11 eram provenientes de cabras soronegativas. Os autores discutiram que isso pode ocorrer por estar em fase inicial de infecção e não haver quantidade suficiente de anticorpos específicos no soro sanguíneo para que o animal seja soropositivo.

No Brasil foram analisadas 248 amostras de leite de cabras, das quais o DNA do *T. gondii* foi encontrado em 15 (6,05%). Entretanto, 10 das 15 amostras de leite positivas eram de animais soronegativos (Bezerra *et al.*, 2015). Já Gazzonis *et al.* (2019), avaliaram, na Itália, as 63 amostras de leite de cabras soropositivas. Dessas, em 13 (20,6%) detectou-se o DNA de *T. gondii* pela Nested PCR.

No Brasil, Camossi *et al.* (2011) avaliaram amostras de leite de ovelhas, coletadas quinzenalmente até os dois meses de lactação. Foram detectados *amplicons* de *T. gondii* em sete amostras de leite em 70 ovelhas soropositivas. Todas as amostras positivas vieram de ovelhas com titulação igual a 256. Nas ovelhas soronegativas não foi detectado o DNA de *T. gondii*. Já Ossani *et al.* (2017) avaliaram 108 amostras de leite de 42 ovelhas lactantes soropositivas por meio da RIFI para *T. gondii*. As amostras foram coletadas nos dias 45, 90 e 120 dias de lactação. O DNA do *T. gondii* foi detectado apenas em cinco das 108 amostras (4,63%), sendo todas as amostras positivas coletadas aos 90 dias de lactação. Estes resultados demonstram a necessidade de se saber, se o *N. caninum* em cabras se comporta de uma forma semelhante ao *T. gondii* e se há um período específico da lactação para a transmissão do agente.

## **2.4 Diagnóstico da neosporose**

### **2.4.1 Diagnóstico patológico**

O diagnóstico patológico da neosporose é baseado nas lesões histológicas produzidas nos tecidos dos fetos abortados e na identificação do protozoário pela técnica de imunohistoquímica (Lindsay & Dubey, 1989, Thurmond *et al.*, 1999, Varaschin, 2012).

Lesões macroscópicas associadas à neosporose são raras, sendo descrito em cabras

somente hidrocefalia com hipoplasia de cerebelo (Dubey *et al.*, 1996), e um quadro de porencefalia caracterizada por ausência de substância branca cerebral com consequente dilatação dos ventrículos laterais pela perda de tecido (hidrocefalia ex-vácuo) (Varaschin *et al.*, 2012). As lesões microscópicas são muito utilizadas no diagnóstico do aborto por *N. caninum* e o exame histopatológico deve ser realizado em tecidos de fetos abortados ou bezerros fracos. Os órgãos de eleição para o diagnóstico histopatológico são cérebro, coração, fígado (Dubey & Schares, 2006), músculo esquelético e pulmão, estes dois últimos principalmente nos casos de autólise do encéfalo (Nakagaki *et al.*, 2016; Pescador *et al.*, 2007).

Lesões microscópicas em fetos associadas à neosporose são descritos em caprinos como infiltrado inflamatório mononuclear associado ou não a focos necróticos no parênquima de cérebro, pulmão, rim, coração e músculo esquelético (Al-Shaeli, Ethaeb e Gharban, 2020; Mesquita *et al.*, 2013; Moreno *et al.*, 2012; Nakagaki *et al.*, 2016). No sistema nervoso central foram descritos focos de necrose multifocais circundados por astrócitos, manguitos perivascularres e gliose (Al-Shaeli, Ethaeb e Gharban, 2020; Barr *et al.*, 1990; Costa *et al.*, 2014; Mesquita *et al.*, 2013), além de encefalite granulomatosa associada a cisto tecidual degenerado (Corbellini, Colodel e Driemeier, 2001). Já em placenta foram observadas placentite não supurativa com necrose focal e, por vezes associados com taquizoítos em trofoblastos e calcificação (Al-Shaeli, Ethaeb e Gharban, 2020; Bergeron *et al.*, 2001; Mesquita *et al.*, 2018; Shivaprasad, Ely e Dubey, 1989).

A imunohistoquímica, amplamente utilizada como método de diagnóstico de neosporose em tecidos, pode chegar a mais de 80% de resultados positivos (Corbellini *et al.*, 2000). Esta técnica permite a visualização de taquizoítos ou cistos teciduais de *N. caninum*, associados ou não as áreas de lesão tecidual (Corbellini *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2014; Mesquita *et al.*, 2018; Shibahara *et al.*, 1999; Varaschin *et al.*, 2012).

#### **2.4.2 Detecção de anticorpos em soro sanguíneo, colostro e leite**

Testes sorológicos como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), teste de aglutinação de *Neospora* (TAN) e vários ELISAs, são amplamente utilizados no diagnóstico e em estudos de soroprevalência do *N. caninum* em várias espécies animais (Dubey *et al.*, 2017). A RIFI foi o primeiro teste utilizado para demonstração de anticorpos anti-*N. caninum*, sendo considerado de referência (“gold standard”) quando outros ensaios são comparados (Björkman & Ugglå, 1999).

Alguns estudos descrevem a adaptação dessas técnicas, como a RIFI (Ooi *et al.*, 2000; Camillo *et al.*, 2011) e ELISA para identificação de anticorpos anti-*N. caninum* no colostro e leite de bovinos (Chanlun *et al.*, 2006; González-Warleta *et al.*, 2011; Moskwa *et al.*, 2007). Além disso, verificou-se que há correlação entre a titulação de anticorpos no leite com PCR positiva, quando testados para *N. caninum* e para *T. gondii* em bovinos (Gharekhani *et al.*, 2021) e para *T. gondii* em caprinos e ovinos (Sadek, Abdel-Hameed e Kuraa, 2015).

### 3. REFERÊNCIAS

AHMED, H. A. *et al.* Molecular detection of *Toxoplasma gondii* DNA in milk and risk factors analysis of seroprevalence in pregnant women at Sharkia, Egypt. **Veterinary World**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. 594-600, August 2014.

ALMERIA, S. *et al.* Cytokine gene expression in dams and foetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. **Parasite Immunology**, [s. l.], v. 25, p. 383-392, July 2003.

AL-SHAELI, S. J. J.; ETHAEB, A. M. e GHARBAN, H. A. J. Molecular and histopathological identification of ovine neosporosis (*Neospora caninum*) in aborted ewes in Iraq. **Veterinary World**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 597-603, March 2020.

BARR, B. C. *et al.* Bovine fetal encephalitis and Myocarditis associated with protozoal infections. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 27, p. 354-361, September 1990.

BERGERON, N. *et al.* Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from seropositive dams giving birth to full-term calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, [s. l.], v. 13, p. 173–175, March 2001.

BEZERRA *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of naturally infected goats in the Northeast of Brazil. **Transboundary and Emerging Disease**, [s. l.], v. 62, n. 4, p. 421-424, August 2015.

BJÖRKMAN, C. *et al.* *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [s. l.], v. 9, p. 1441-1444, May 1996.

BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 29, n. 10, p. 1497-507, October 1999.

CAMILLO, G. *et al.* Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras individuais e coletivas de leite de bovinos pela reação de imunofluorescência indireta. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 482-486, Junho 2011.

CAMOSSI, L. G. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the milk of naturally infected ewes. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 177, p. 256–261, May 2011.

CHANLUN, A. *et al.* Application of repeated bulk milk testing for identification of infection dynamics of *Neospora caninum* in Thai dairy herds. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 136, p. 243-250, March 2006.

CORBELLINI, L. G. *et al.* Aborto bovino por *Neospora caninum* no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 5, p. 863-862, 2000.

COLE, R. A. *et al.* Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. **Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 81, p. 730–732, October 1995.

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**, [s. l.], v. 13, p. 416-419, September 2001.

COSTA, R. C. *et al.* Histological and immunohistochemical characterization of the inflammatory and glial cells in the central nervous system of goat fetuses and adult male goats naturally infected with *Neospora caninum*. **BMC Veterinary Research**, [s. l.], v. 10, p. 291, December 2014.

DAVISON, H. C. *et al.* Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 70, p. 163–168, April 2001.

DIJKSTRA, T. H. *et al.* Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 100, p. 161-169, January 2003.

DUBEY, J. P. *et al.* A Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, [s. l.], v. 193, p. 1269- 1283, May 1988.

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

- DUBEY, J. P. *et al.* Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 32, p. 929-946, July 2002.
- DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 41, p. 1-16, March 2003.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Review Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 140, n. 1-2, p. 1–34, August 2006.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 20, p. 323–369, April 2007.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals-The last five years. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 180, p. 90-108, August 2011.
- DUBEY, J. P.; HEMPHILL, A.; SCHARES, G.; CALERO-BERNAL, R. (Eds). **Neosporosis in animals**. Boca Raton: Taylor & Francis, p. 329-336, 2017.
- ELENI, C. *et al.* Detection of *Neospora caninum* in an aborted goat foetus. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 123, p. 271-274, September 2004.
- FARIA, E. B. *et al.* Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goats slaughtered in the public slaughterhouse of Patos City, Paraíba state, Northeast region of Brazil. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 149, p. 126-129, October 2007.
- FIGLIUOLO, L. P. C. *et al.* Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goat from São Paulo State, Brazil. **Small Ruminant Research**, [s. l.], v. 55, p. 29-32, October 2004.
- GHAREKHANI, J. *et al.* Herd-level contamination of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Brucella* in milk of Iranian dairy farms. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 100, 103873, December 2021.
- GAZZONIS, A. L. *et al.* *Toxoplasma gondii* in naturally infected goats: Monitoring of specific IgG levels in serum and milk during lactation and parasitic DNA detection in milk. **Preventive Veterinary Medicine**, [s. l.], v. 170, 104738, October 2019.
- GONDIM, L. F. P. *et al.* Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*.



**International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 34, p. 159-161, February 2004.

GONZÁLEZ-WARLETA, M. *et al.* Anti-*Neospora caninum* antibodies in milk in relation to production losses in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, [s. l.], v. 101, p. 58– 64, August 2011.

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

LIMA, J. T. R. *et al.* Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* em rebanhos caprinos do município de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 81-86, 2008.

LINDSAY, D. S., DUBEY, J. P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **American Journal of Veterinary Research**, [s. l.], v. 50, p. 1981-1983, November 1989.

LINDSAY, D. S. *et al.* Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pigmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. **American Journal of Veterinary Research**, [s. l.], v. 56, p. 1176-1180, September 1995.

LIU, Y. M. *et al.* First detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in domestic goat's serum and milk during lactation in China. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 161, 105268, December 2021.

LOPEZ-GATIUS, F.; PABÓN, M.; ALMERÍA, S. *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. **Theriogenology**, [s. l.], v. 62, p. 606-613, August 2004a.

LOPEZ-GATIUS, F. *et al.* *Neospora*-associated abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in northeast Spain. **Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health.**, [s. l.], v. 51, p. 348–352, September 2004b.

LUPTAKOVA, L. *et al.* DNA detection of *Toxoplasma gondii* in sheep milk and blood samples in relation to phase of infection. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 208, p. 250-253, March 2015.

MACALDOWIE, C. *et al.* Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. **Journal of Comparative Pathology**, [s. l.], v. 131, p. 142-156, August-October 2004.

MAGALHÃES, V. C. S. *et al.* Transmission paths of *Neospora caninum* in a dairy herd of crossbred cattle in the northeast of Brazil. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 202, p. 257-264, May 2014.

MANCIANTI, F. *et al.* Seroprevalence, detection of DNA in blood and milk, and genotyping of *Toxoplasma gondii* in a goat population in Italy. **Biomed Research International**, [s. l.], v. 2013, 905326, September 2013.

MCALLISTER, M. M. *et al.* Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 28, n. 9, p. 1473-1478, September 1998.

MESQUITA, L. P. *et al.* Antibody Kinetics in goats and conceptuses naturally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 196, p. 327-333, September 2013.

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

MINEO, T. W. P. *et al.* Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 98, p. 239-245, July 2001.

MORENO B. *et al.* Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 187, n. 1-2, p. 312-318, June 2012.

MOSKWA, B. *et al.* The suitability of milk in detection of *Neospora caninum* infection in cows. **Acta Parasitologica**, [s. l.], v. 48, p. 138-141, June 2003.

MOSKWA, B. *et al.* The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 100, p. 633-636, February 2007.

NAKAGAKI, K. Y. R. *et al.* Lesions and distribution of *Neospora caninum* in tissues of naturally infected female goats. **Small Ruminant Research**, [s. l.], v. 140, p. 57-62, July 2016.

OLIVEIRA JUNIOR, I. M. *et al.* Endogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* in successive generations of congenitally infected goats. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 284, 109191, August 2020.

OOI, H. K. *et al.* Serological survey and first finding of *Neospora caninum* in Taiwan, and the detection of its antibodies in various body fluids of cattle. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 90, p. 47-55, June 2000.

ORLANDO, D. R. Abortos por *Neospora caninum* em bovinos do sul de Minas Gerais, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 1332-1338, November 2014.

OSSANI, R. A. *et al.* *Toxoplasma gondii* in milk of naturally infected dairy ewes on West mesoregion of Santa Catarina state, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte v. 69, n. 5, p. 1294-1300, September-October 2017.

PESCADOR, C. A. *et al.* Histopathological and immunohistochemical aspects of *Neospora caninum* diagnosis in bovine aborted fetuses. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 150, p. 159-163, November 2007.

REICHEL, M. P. *et al.* What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 133-142, February 2013.

REID, A. J. *et al.* Comparative genomics of the apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: Coccidia differing in host range and transmission strategy. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 8, n. 3, e1002567, March 2012.

ROCHA, D. S. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in naturally infected sheep's milk. **Genetics and Molecular Research**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 8658-8662, July 2015.

ROSBOTTOM, A. *et al.* Upregulation of cytokines is detected in the placentas of cattle infected with *Neospora caninum* and is more marked early in gestation when fetal death is observed. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 76, p. 2352-2361, June 2008.

SAAD, N. M.; HUSSEIN, A. A. A.; EWIDA R. M. Occurrence of *Toxoplasma gondii* in raw goat, sheep, and camel milk in Upper Egypt. **Veterinary World**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. 1262-1265, September 2018.

SADEK, O. A.; ABDEL-HAMEED, Z. M. e KURAA, H. M. Molecular detection of *Toxoplasma gondii* DNA in raw goat and sheep milk with discussion of its public health importance in assiut governorate. **Assiut Veterinary Medical Journal**, [s. l.], v. 61, n. 145, December 2015.

SCHARES, G. *et al.* The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy

cattle analyzed by serological techniques. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 80, p. 87-98, December 1998.

SHIBAHARA, T. *et al.* Pathological and immunological findings of athymic nude and congenic wild type BALB/c mice experimentally infected with *Neospora caninum*, **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 321–327, July 1999

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

SILVA, J. G. *et al.* Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies and parasite DNA in raw milk of sheep and goats of local breeds reared in Northeastern Brazil. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 142, p. 145-148, February 2015.

SROKA, J. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in goats from the south-west region of Poland and the detection of *T. gondii* DNA in goat milk. **Folia Parasitologica (Praha)**, [s. l.], v. 64, p. 2017.023, July 2017.

THURMOND, M. C., HIETALA, S. K., BLANCHARD, P. C. Predictive values of fetal histopathology and immunoperoxidase staining in diagnosing bovine abortion caused by *Neospora caninum* in a dairy herd. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, [s. l.], v. 11, p. 90-94, January 1999.

UGGLA, A. *et al.* Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], n. 28, p. 1467-1472, September 1998.

UZÊDA, R. S. *et al.* Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy goats from Bahia, Brazil. **Small Ruminant Research**, [s. l.], v. 70, p. 257-259, July 2007.

VARASCHIN, M. S. *et al.* Fatores associados a soroprevalência de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em rebanhos caprinos na região sul de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 31, p. 53-58, January 2011.

VARASCHIN, M. S. *et al.* Congenital neosporosis in goats from the state of Minas Gerais, Brazil. **The Korean Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 63-67, March 2012.

WESTON, J. F.; WILLIAMSON, N. B.; POMROY, W. *Eet al.* Associations between pregnancy outcome and serological response to *Neospora caninum* among a group of dairy heifers. **New Zealand Veterinary Journal**, [s. l.], v. 53, p. 142–148, April 2005.

WOUDA, W.; DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. **The Journal of Parasitology**, [*s. l.*], v. 83, p. 545-547, June 2007.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGO**

**DETECÇÃO DE DNA DE *Neospora caninum* EM COLOSTRO, LEITE E GLÂNDULA  
MAMÁRIA DE CABRAS NATURALMENTE INFECTADAS**

**(VERSÃO PRELIMINAR)**

Escrito nas normas da Revista Veterinary Parasitology

Qualis: A1

Fator de impacto (JCR): 2.6

## RESUMO

A via lactogênica é pouco estudada como possível rota de transmissão do *Neospora caninum*, não existindo pesquisas em caprinos e ovinos, assim como, nas várias espécies animais, o leite não foi avaliado em diferentes períodos de lactação quanto a presença do DNA do parasito e a glândula mamária em lactação quanto a presença de lesões ou do agente. Desta forma, o objetivo deste estudo é pesquisar a presença de *N. caninum* por histopatologia, imuno-histoquímica (IHQ) e PCR em glândula mamária, detectar o DNA de *N. caninum* no colostro e leite por meio de PCR e de anticorpos anti-*N. caninum* no soro sanguíneo pela RIFI no parto e ao longo do período de lactação. Foram utilizadas dez cabras naturalmente infectadas confirmadas pela presença de anticorpos anti-*N. caninum* pela RIFI e como controles negativos três cabras soronegativas. Foram coletadas amostras de sangue das cabras no dia do parto (mãe e filhote antes de mamar o colostro) e mensalmente (mãe e filhote) até o dia 120 pós-parto. Também foram coletados 10 mL de colostro e de leite através de ordenha manual no dia do parto (D0), dia 3 (D3), D6, D9, D12, D15, D30, D45, D60, D75, D90, D105 e D120, totalizando 105 amostras de animais positivos e 39 de animais negativos. Duas cabras morreram ao longo do período experimental. As demais cabras foram eutanasiadas sob anestesia profunda ao final dos 120 dias e amostras da glândula mamária foram submetidas à histopatologia, IHQ e PCR. Histologicamente foi observada inflamação linfoplasmocitária leve ou moderada em quatro e três cabras, respectivamente, entretanto não foi visualizado o parasito na glândula mamária. Os resultados da PCR demonstraram o DNA de *N. caninum* em nove (90%) de 10 glândulas mamárias, em 54 (56,25%) das 96 amostras de leite, não havendo correlação com a titulação sanguínea, e em oito (88,89%) das nove amostras de colostro. Dessa forma, verifica-se que a via lactogênica é uma possível rota de transmissão do *N. caninum*, além de chamar a atenção para a necessidade de se testar os bancos de colostro frequentemente utilizados em ruminantes.

**Palavras-chave:** Neosporose, Caprinos, PCR.

## INTRODUÇÃO

*Neospora caninum* é um protozoário do filo Apicomplexa, família Sarcocystidae, parasito intracelular obrigatório, que possui os cães domésticos e canídeos selvagens como hospedeiros definitivos (Dubey & Schares, 2011) e várias espécies como hospedeiros intermediários, entre elas, os caprinos (Dubey et al., 2017). A neosporose é considerada uma importante causa de aborto em bovinos em todo o mundo (Dubey & Schares, 2011), podendo ocorrer também reabsorção embrionária, mumificação fetal, maceração fetal, natimortalidade, nascimento de animais com sinais clínicos ou clinicamente normais, mas permanentemente infectados (Dubey & Schares, 2011). Em caprinos *N. caninum* vem se destacando como importante agente causador de falhas reprodutivas (Mesquita et al., 2013).

Os canídeos liberam oocistos pelas fezes que se tornam infectantes no ambiente e estes são fonte de infecção, por via oral, para outras espécies. Entretanto, a transmissão vertical desse agente é considerada a principal fonte de infecção para os ruminantes (Almeria et al., 2003; Costa et al., 2014; Dubey et al., 2017; Macaldowie et al., 2004; Mesquita et al., 2013; Varaschin et al., 2012).

Os primeiros estudos envolvendo leite como possível forma de transmissão de *N. caninum* ocorreram de forma experimental, onde quantidades pré-determinadas de taquizoítos foram inoculadas nas amostras de leite ou em homólogos (Davison et al., 2001; Ugglá et al., 1998). A identificação de DNA de *Neospora caninum* no leite e colostro de bovinos são escassos (Gharekhani et al., 2021; Moskwa et al., 2003, 2007). Moskwa et al. (2003) em amostras de leite de vacas soronegativas e soropositivas com histórico de aborto, identificaram o DNA de *N. caninum* em uma vaca soropositiva, sendo este o primeiro caso detectado em animais naturalmente infectados.

Dessa forma, este estudo tem por objetivo detectar o DNA de *Neospora caninum* em colostro e leite, de anticorpos anti-*N. caninum* no soro sanguíneo e pesquisar a presença do parasito em glândula mamária de cabras naturalmente infectadas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Manejo dos caprinos e coleta de sangue

Foram utilizadas 10 cabras naturalmente infectadas por *N. caninum*, com idade entre 2 e 10 anos, histórico de abortos e nascimento de filhotes soropositivos (antes de mamar colostro) e três cabras soronegativas, todas testadas previamente pela RIFI para pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum*. O rebanho era mantido pelo Setor de Patologia Veterinária do



Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras há 10 anos.

Todas as cabras foram mantidas em um piquete telado durante o dia e em baias de alvenaria durante o período noturno. Neste ambiente, receberam alimentação (feno/silagem e ração) duas vezes ao dia e água *ad libitum*. Além disso, passaram por exame clínico e exames coproparasitológicos e vermifugação periódica.

As cabras foram emprenhadas através de monta natural. Para confirmação de prenhez realizou-se a ultrassonografia no dia 30 após a monta e periodicamente realizada para monitorar a viabilidade fetal. O sangue da mãe e dos filhotes (pré-colostro) foram coletados no dia do parto e mensalmente até 120 dias pós-parto. Foram coletados 5 mL de sangue, o qual foi centrifugado a 3000rpm durante 10 minutos e o soro armazenado a -20°C até a realização da RIFI, conforme protocolo estipulado por Mesquita et al. (2013).

Todas as cabras foram testadas previamente e eram negativas para *Toxoplasma gondii* (RIFI), *Brucella* spp, *Coxiella burnetti* e *Chlamydia* spp. (PCR).

### **Coleta das amostras de colostro e leite**

Foram coletados 10 mL de colostro e de leite através de ordenha manual. Realizou-se a antisepsia dos tetos com álcool iodado e uso de luvas durante a manipulação. As amostras foram armazenadas individualmente em tubo tipo Falcon® estéril e mantidas sob refrigeração até a chegada ao laboratório, onde foram armazenadas a -20°C. As coletas foram realizadas no dia do parto (D0), dia 3 (D3), D6, D9, D12, D15, D30, D45, D60, D75, D90, D105 e D120.

As amostras foram centrifugadas a 2500rpm durante 15 minutos para separação de três fases do leite: gordura, líquida (intermediária) e precipitado (sólida). A fase líquida foi desprezada e as fases de gordura e sólida foram misturadas e o resultado dessa mistura foi armazenado em microtubos tipo eppendorf® e armazenados a -20°C para posterior extração de DNA e amplificação.

### **Coleta de material para exame histopatológico, imuno-histoquímico e PCR**

Ao final do experimento, as cabras adultas foram eutanasiadas seguindo o código de ética da veterinária, protocolo CEUA/UFLA número 099/22, por meio de sedação (Xilazina)

e anestesia profunda (Tiopental + KCl). Amostras de glândula mamária direita e esquerda (Figura 1) foram coletados em 6 regiões (1-6) em formalina a 10% tamponada para histopatologia e imuno-histoquímica. Estas amostras, também foram coletadas e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

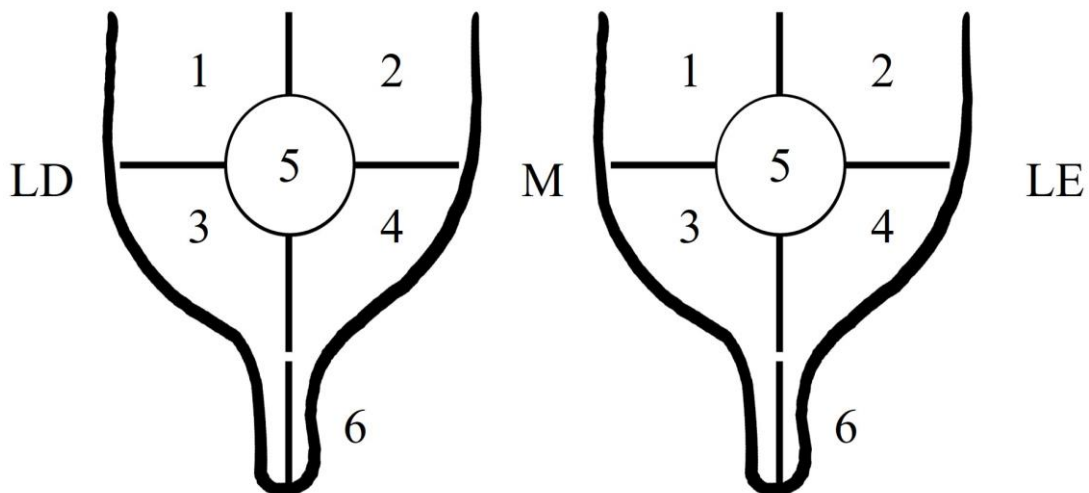


Fig. 2: Locais de coleta de material de glândula mamária de cabras. LD: Lateral direito. LE: Lateral esquerdo. M: medial.

### Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI)

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) foi utilizada para a pesquisa de anticorpos IgG anti- *Neospora caninum* em soro sanguíneo armazenados em microtubos a  $-20^{\circ}\text{C}$ , conforme técnica previamente padronizada (Mesquita et al., 2013, Oliveira Junior et al., 2020). Foram utilizados como antígeno taquizoítos de *N. caninum* (amostra “NC-Beef”) adquiridos comercialmente e como controle positivo e negativo, soro sanguíneo já testados anteriormente por Oliveira Junior et al. (2020).

Os soros foram descongelados em temperatura ambiente e em seguida diluídos a um ponto de corte de 1:50. Os soros foram incubados com antígenos a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos em câmara úmida. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em PBS por duas vezes e, mais duas vezes em água destilada, e secas à temperatura ambiente. Após a secagem das lâminas, foi aplicada imunoglobulina marcada com o conjugado fluoresceína-anti-IgG caprino (conjugado Sigma Chemical), diluído em PBS (1:100).

As lâminas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Em seguida, submetidas ao mesmo processo de lavagem, secas a temperatura ambiente e cobertas com glicerina tamponada 10% e examinadas por meio do microscópio de luz ultravioleta. Em cada lâmina

foram colocados os soros controles positivo e negativo. Os soros positivos foram diluídos em base dois e testados para determinar o título máximo da reação. O título de anticorpos foi obtido pela maior diluição que resultou na completa fluorescência da superfície de taquizoítos de *N. caninum* (Figliuolo et al., 2004).

### **Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em colostro, leite e tecidos**

A extração do DNA de amostras de colostro e leite foi realizada utilizando-se o kit comercial Wizard Genomic Purification System (Promega, Madison, USA), por meio da técnica de lise por proteinase K, segundo as recomendações do fabricante. As concentrações (ng/ $\mu$ l) e qualidade do DNA extraído foram determinadas no espectrofotômetro NanoDrop™ Lite Plus Microvolume Spectrophotometer (Thermo Scientific) e eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Para a detecção de *Neospora caninum* foram sintetizados iniciadores (Sigma-Aldrich) para a amplificação de sequências genéticas do protozoário em questão, tendo como molde seu cromossomo XII. Desta forma, os *primers forward* CTGTTAGAAGGTGCGGCGAA e *reverse* TCTCTTGCTGCGGTGGAAAT amplificam um fragmento de 168pb. Cada reação de cadeia de polimerase foi realizada constituída de 10X de solução tampão de PCR (MBI Fermentas); 50 mM de MgCl<sub>2</sub>; 2 mM de cada dNTP; 100ng da amostra de DNA; 5 U de Taq DNA Polimerase (Phoneutria Biotecnologia e Serviços), 5 mM dos iniciadores *forward* e *reverse*; água tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato) autoclavada para completar um volume final de 20 $\mu$ l. Como controle positivo, foram utilizadas amostras de taquizoítos isolados e cultivo celular e, como controle negativo (um feto sem lesões de neosporose e com diagnóstico negativo na IHQ e PCR) e um controle branco. As reações foram realizadas em termociclador (Touch thermal cycler T960) conforme o seguinte protocolo: desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos e extensão final a 72°C por 7 min. As amostras foram aplicadas em gel de agarose de alta resolução 1,5% com brometo de etídio (0.5 mg/ mL) (Ludwig Biotecnologia Ltda., Brasil), em cuba de eletroforese horizontal a 120 volts contendo tris-borato-EDTA (TBE) (89 mM Tris Base, 89 mM de ácido bórico e 2 mM EDTA; pH 8.0; todos da Sigma Aldrich, USA) como tampão de corrida. Com o auxílio de 5 microlitros de padrão de peso molecular (Ladder da Ludwig® 100pb, Brasil) as bandas foram identificadas. Após a eletroforese, cada gel foi visualizado por luz ultravioleta e fotografado (L-PIX EX, Loccus Biotechnology, Brasil).

As amostras das glândulas mamárias foram submetidas a metodologia semelhante à de colostro e leite. As amostras de DNA foram extraídas de 20 µg de tecido, previamente armazenado a -20°C.

### **Histopatologia e Imuno-histoquímica**

Todas as amostras de glândula mamária foram processadas rotineiramente para histopatologia, desidratados em escala crescente de álcoois, diafanizados em xilol e imersos em parafina. Na sequência foram incluídos em parafina e cortados em seções de 3-5 µm e posicionados em lâminas comuns para histopatologia e silanizadas para realização de imuno-histoquímica. As lesões foram classificadas em discretas, moderadas e acentuadas.

Na imuno-histoquímica foi utilizado o anticorpo primário policlonal anti-*N. caninum*, produzido em cabras (VRMD, Pullman, USA) e um kit comercial (Polímero Histofine Simple Stain Mouse MAX PO (G) anti-goat primary antibody) contendo anticorpo secundário conjugado com biotina e estreptavidina conjugada com peroxidase, segundo técnica imuno-histoquímica utilizada por Varaschin et al. (2012). A reação foi revelada com o 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e avaliada ao microscópio de luz.

## **RESULTADOS**

Duas cabras morreram durante a execução do experimento, sendo coletado apenas o colostro e glândula mamária da cabra 4 que morreu no parto e somente a glândula mamária da cabra 6 que morreu no terço médio de gestação por toxemia da prenhez.

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em soro sanguíneo das cabras do dia do parto (D0), dia 30 pós-parto (D30), D60, D90 e D120 estão demonstrados na Tabela 1 e dos cabritos pré-colostro na Tabela 2. Três cabras abortaram, não sendo possível a coleta do sangue dos filhotes.

Durante os quatro meses de lactação houve discreta oscilação da titulação das cabras. As cabras 2 e 5 apresentaram titulação 1:50 no dia do parto. A cabra 2 apresentou sorologia negativa no D30 e a cabra 5 apresentou sorologia negativa nos dias 60 e 90 pós-parto, porém ambas apresentaram titulação em coletas subsequentes.

Tabela 1. Resultado da Reação de Imunofluorescência Indireta em soro sanguíneo de cabras naturalmente infectadas por *Neospora caninum* do dia do parto até 120 dias de lactação.

<b>Cabra</b>	<b>D0</b>	<b>D30</b>	<b>D60</b>	<b>D90</b>	<b>D120</b>
<b>1***</b>	1:6400	1:3200	1:1600	1:3200	1:3200
<b>2</b>	1:50	<1:50	1:50	1:50	1:50
<b>3</b>	1:6400	1:3200	1:3200	1:1600	1:3200
<b>4*</b>	1:3200	NC	NC	NC	NC
<b>5</b>	1:50	1:50	<1:50	<1:50	1:50
<b>6**</b>	1:800	NC	NC	NC	NC
<b>7***</b>	1:800	1:800	1:400	1:800	1:400
<b>8</b>	1:3200	1:1600	1:6400	1:3200	1:1600
<b>9***</b>	1:1600	1:3200	1:3200	1:1600	1:3200
<b>10</b>	1:400	1:800	1:800	1:400	1:1600
<b>11</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<b>12</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<b>13</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

NC: Não coletou; \*Eutanásia; \*\*Óbito por toxemia da prenhez; \*\*\*Distúrbio reprodutivo.

A sorologia dos filhotes (F) pré-colostro demonstrou que alguns cabritos nascidos de mães com titulações baixas no dia do parto apresentaram titulação menores (F7 e F8) ou não apresentaram anticorpos anti-*N. caninum* ao nascimento (F1, F2, F3 e F4).

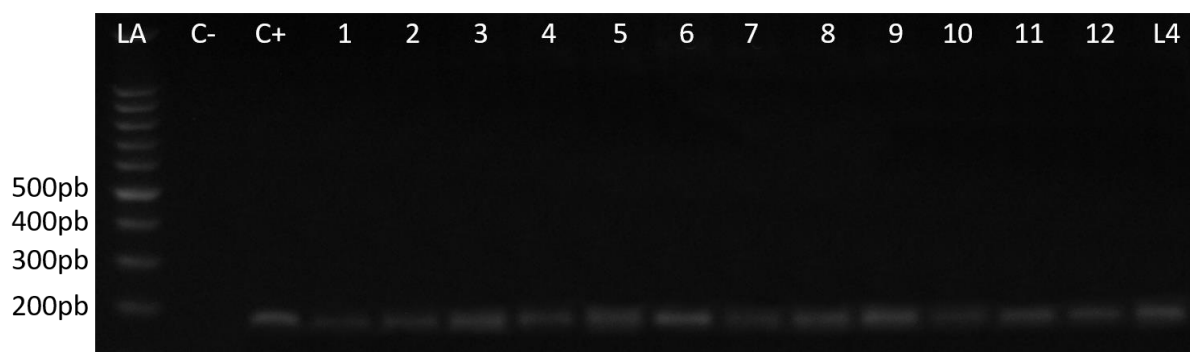
Tabela 2. Titulação por Reação de Imunofluorescência Indireta em soro sanguíneo pré-colostro dos cabritos de cabras naturalmente infectadas por *Neospora caninum*.

<b>Mãe</b>	<b>Cabrito</b>	<b>D0</b>
2	F1	Negativo
	F2	Negativo
3	F5	1:1600
	F6	1:800
5	F3	Negativo
	F4	Negativo
8	F9	1:400
	F10	1:1600
10	F7	1:200
	F8	1:50
11	F11	Negativo
12	F12	Negativo
13	F13	Negativo

Na avaliação histológica das 10 glândulas mamárias foi observada inflamação linfoplasmocitária leve ou moderada em quatro e três cabras, respectivamente. Nessas amostras não foram visualizados cistos ou taquizoítos de *N. caninum* nos tecidos pela coloração de Hematoxilina e Eosina e pela marcação imuno-histoquímica.

Na PCR das glândulas mamárias foi detectado o DNA de *N. caninum* (Figura 2) em nove das 10 cabras, sendo, em cinco delas em todos os fragmentos coletados (100%) (Tabela 3).

Fig. 3. Detecção de DNA de *Neospora caninum* em glândula mamária e colostro de cabras naturalmente infectadas.



LA: Ladder; C-: controle negativo; C+: Controle positivo; Cabra 3 – Glândula mamária direita: (1-6) amostras de 1 a 6. Glândula mamária esquerda: amostras de 7 a 12; Cabra 4 - (L4) colostro.

Tabela 3. Resultado da PCR das glândulas mamárias das cabras naturalmente infectadas por *Neospora caninum*.

Cabra	Glândula mamária direita						Glândula mamária esquerda					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
1	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6**	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
7	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

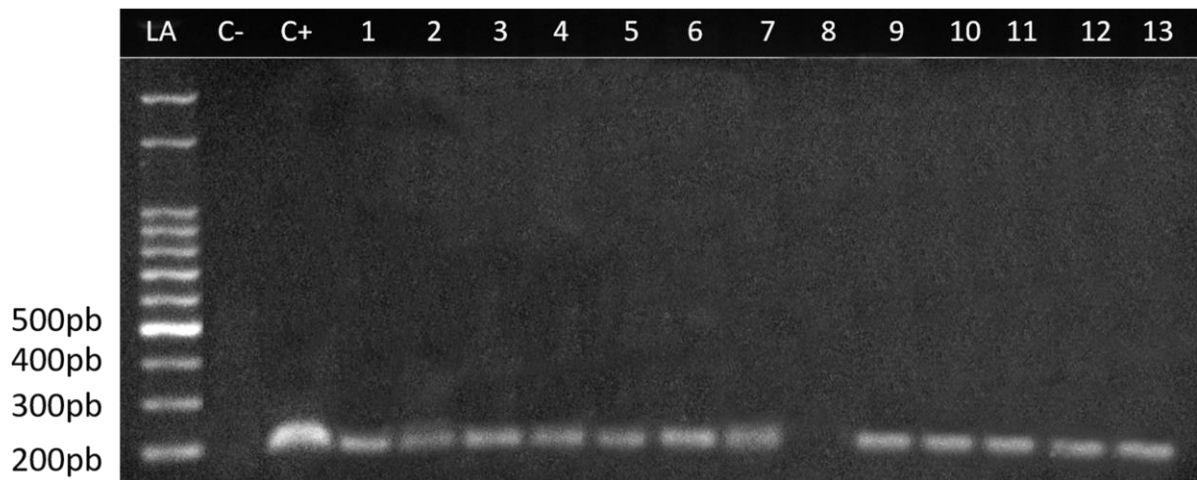
\*Eutanásia; \*\*Óbito por toxemia da prenhez.

Na avaliação pela PCR das 105 amostras, sendo nove de colostro e 96 de leite provenientes de cabras soropositivas, em 62 amostras (59,05%) foram detectados o DNA do *N. caninum* (Tabela 4), com variação nos resultados positivos ao longo do período de lactação (cabras 3, 7 e 9), sendo que duas cabras foram positivas em toda lactação (cabras 5 e 8), enquanto a cabra 1 testou positiva apenas no D0 e a cabra 10 testou negativa em todo o período lactacional.

O colostro foi a amostras com maior positividade, quando comparado aos demais dias de lactação, totalizando oito positivos em nove amostras. Nas demais amostras de leite em todos os dias coletados foi detectado o DNA do *N. caninum*, sendo os dias D3, D6, D9, D30, D60, D75 e D105 com um número maior de cabras positivas (cinco animais).

As cabras negativas (11, 12 e 13) mantiveram negativas nos testes de RIFI e PCR, indicando que não houve transmissão horizontal de *N. caninum* durante a fase experimental.

Fig. 3. Detecção de DNA de *N. caninum* em colostro e leite de cabra naturalmente infectada.



Cabra 3 - LA: Ladder; C-: controle negativo; C+: Controle positivo; 1: Dia 0 (D0); 2: D3; 3: D6; 4: D9; 5: D12; 6: D15; 7: D30; 8: D45; 9: D60; 10: D75; 11: D90; 12: D105; 13: D120.

Tabela 4. Resultado da PCR do colostro e leite de cabras naturalmente infectadas por *N. caninum*.

Cabra	D0	D3	D6	D9	D12	D15	D30	D45	D60	D75	D90	D105	D120
1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
4*	+	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6**	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
7	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

NC: Não coletou; \*Eutanásia; \*\*Óbito por toxemia da prenhez.

## DISCUSSÃO

Neste estudo, a detecção do DNA do *N. caninum* foi mais frequente no colostro, em 88,88% das amostras e, apesar deste ter sido detectado ao longo da lactação, os resultados sugerem que o colostro é uma das principais vias de transmissão no rebanho.

Não há estudos anteriores sobre identificação de DNA de *Neospora caninum* no leite e colostro de caprinos ao longo do período de lactação e poucos relatos em bovinos (Moskwa et al., 2003, 2007; Gharekhani et al., 2021).

Neste rebanho foi verificado que cabras com titulações mais altas geraram filhotes com titulações altas enquanto as cabras com titulação menor geraram filhotes com titulações mais baixas ou negativos comprovado a transmissão transplacentária em alguns animais, semelhante ao relatado por Mesquita et al., (2013), que descreveram o nascimento de filhotes negativos a partir de mães positivas. Entretanto não pode ser descartada uma infecção tardia nos fetos resultando em um estímulo insuficiente para a detecção de anticorpos ao nascimento (PARÉ et al., 1996).

Não foram observados cistos ou taquizoítos de *N. caninum* nas glândulas mamárias das cabras, apesar da alta positividade na PCR (88,88%) e desta forma o processo inflamatório não foi associado ao parasito. Alguns autores evidenciam que os cistos teciduais de *N. caninum* não são observados (Vonlaufen et al., 2004; Goodswen et al., 2013), principalmente em animais naturalmente infectados e adultos (Nakagaki et al., 2016). Em um estudo em cabras adultas que não estavam gestando ou amamentando, o DNA de *N. caninum* foi detectado em 42,85% da musculatura esquelética coletada e em 25% das glândulas mamárias, mas sem a visualização de estruturas parasitárias (Nakagaki et al., 2016). Acredita-se que em animais adultos a ocorrência de lesões e formação de cistos seja dificultada pelo fato de os animais estarem imunologicamente protegidos e serem portadores subclínicos do parasito ou por ser uma infecção crônica (Malaguti et al., 2012).

Neste estudo, em 90% das cabras soropositivas foi detectado o DNA de *N. caninum* em alguma fase da lactação, porém não ocorreu uma correlação com a época da lactação e títulos maiores ou menores de anticorpos no soro. Um achado importante é que nas duas cabras com o menor título, o DNA do parasito foi detectado em todo o período da lactação, estes achados poderiam ser justificados por uma recrudescência mais tardia dos bradizoítos encistados (Dubey et al., 2011) na qual a quantidade de anticorpos não é suficiente para ser detectada no soro, somado a maior sensibilidade do PCR para o diagnóstico da infecção (Dubey e Schares, 2006). Já nas cabras soronegativas não ocorreu detecção do DNA do *N. caninum*. Esses resultados são semelhantes aos achados no leite (Moskwa et al., 2003) e



colostro de uma vaca (Moskwa et al., 2007) onde a identificação do DNA do parasito ocorreu somente em animais soropositivos. Porém quando esses achados são expandidos para outro protozoário, o *T. gondii* o DNA do *T. gondii* foi encontrado em amostras de leite tanto de caprinos soropositivos (Bezerra et al., 2015) como soronegativos (Bezerra et al., 2015, Sroka et al., 2017). Já em ovelhas lactantes soropositivas, o DNA do *T. gondii* foi detectado apenas em 4,63% das amostras, sendo todas as amostras positivas coletadas aos 90 dias de lactação (Ossani et al., 2017).

## CONCLUSÃO

A presença de DNA de *N. caninum* no colostro e leite de cabras soropositivas não confirma a viabilidade do parasito, mas demonstra que a via lactogênica pode ser uma possível via de transmissão do *N. caninum* dentro de um rebanho caprino. Além disso, aponta para a necessidade de se testar os bancos de colostro frequentemente utilizados em ruminantes, antes de serem administrados para os animais.

## REFERÊNCIAS

- Almeria, S., De Marez, T., Dawson, H., Araujo, R., Dubey, J.P., Gasbarre, L.C., 2003. Cytokine gene expression in dams and fetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. *Parasite Immunol.* 25, 383-392.
- Bezerra, M.J., Kim, P.C., Moraes, É.P., Sá, S.G., Albuquerque, P.P., Silva, J.G., Alves, B.H., Mota, R.A., 2015. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of naturally infected goats in the Northeast of Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.* 62, 421-442.
- Bergeron, N., Fecteau, G., Paré, J., Martineau, R., Villeneuve, A., 2000. Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Québec. *Can. Vet. J.* 13, 173–175.
- Björkman, C., Johansson, O., Stenlund, S., Holmdahl, O.J., Uggla, A., 1996. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 9, 1441-1444.
- Costa, R.C., Orlando, D.R., Abreu, C.C., Nakagaki, K.Y., Mesquita, L.P., Nascimento, L.C., Silva, A.C., Maiorka, P.C., Peconick, A.P., Raymundo, D.L., Varaschin, M.S. 2014. Histological and immunohistochemical characterization of the inflammatory and glial cells in the central nervous system of goat fetuses and adult male goats naturally infected with *Neospora caninum*. *BMC Vet. Res.* 10, 291.
- Dubey, J.P., Carpenter, J.L., Speer, C.A., Topper, M.J., Uggla, A., 1988. A newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193, 1269- 1283.
- Dubey, J.P., Scharles, G., 2011. Neosporosis in animals-The last five years. *Vet. Parasitol.* 180, 90-108.

- Dubey, J.P., Schares, G., 2006. Review Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet. Parasitol.* 140, 1–34.
- Dubey, J.P., Hemphill, A., Schares, G., Calero-Bernal, R. (Eds.), 2017. Neosporosis in animals. Boca Raton: Taylor & Francis, pp. 329-336.
- Fioretti D.P., Pasquali, P., Diaferia, M., Mangili, V., Rosignoli, L., 2003. *Neospora caninum* infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public. Health.* 50, 399-404.
- Goodswen, S.J., Kennedy, P.J., Ellis, J.T., 2013. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. *Infect. Genet. Evol.* 13, 133–150.
- González-Warleta, M., Castro-Hermida, J.A., Regidor-Cerrillo, J., Benavides, J., Alvarez-García, G., Fuertes, M., Ortega-Mora, L.M., Mezo, M., 2014. *Neospora caninum* infection as a cause of reproductive failure in a sheep flock. *Vet. Res.* 45, 88.
- Hernandez, J., Risco, C., Donovan, A., 2002. Risk of abortion associated with *Neospora caninum* during different lactations and evidence of congenital transmission in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 221, 1742-1746.
- Hietala, S. K., Thurmond, M. C., 1999. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic response in two dairies. *Int. J. Parasitol.* 29, 1669-1676.
- Magalhães, V.C.S., Oliveira, U.V., Costa, S.C.L., Santos, I.A., Pereira, M.J., Munhoz, A.D., 2014. Transmission paths o *Neospora caninum* in a dairy herd of crossbred cattle in the northeast of Brazil. *Vet. Parasitol.* 202, 257-264.
- Malaguti, J.M.A., Cabral, A.D., Abdalla, R.P., Salgueiro, Y.O., Galleti, N.T.C., Okuda, L.H., Cunha, E.M.S., Pituco, E.M., Del Fava, C., 2012. *Neospora caninum* as causative agent of bovine encephalitis in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21, 48–54.
- Mazuz, M.L., Fish, L., Reznikov, D., Wolkomirsky, R., Leibovitz, B., Savitzky, I., Golenser, J., Shkap, V., 2014. Neosporosis in naturally infected pregnant dairy cattle. *Vet. Parasitol.* 205, 85-91.
- Mesquita, L.P., Nogueira, C.I., Costa, R.C., Orlando, D.R., Bruhn, F.R., Lopes, P.F., Nakagaki, K.Y., Peconick, A.P., Seixas, J.N., Bezerra Jr, P.S., Raymundo, D.L., Varaschin, M.S., 2013. Antibody kinetics in goats and conceptuses naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 196, 327- 333.
- Moskwa, B., Cabaj, W., Pastusiak, K., Bien, J., 2003. The suitability of milk in detection of *Neospora caninum* infection in cows. *Acta Parasitol.* 48, 138–141.
- Moskwa, B., Pastusiak, K., Bien, J., Cabaj, W., 2007. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. *Parasitol. Res.* 100, 633–636.
- Nakagaki, K. Y. R. et al, 2016. Lesions and distribution of *Neospora caninum* in tissues of naturally infected female goats. *Small Ruminant Research.* 140, 57–62.
- Paré, J., Thurmond, M.C., Hietala, S.K., 1996. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calf hood mortality. *Can. J. Vet. Res.* 60, 133-139.
- Pessoa, G. A., Martini, A.P., Trentin, J.M., Dalcin, V.C., Leonardi, C.E., Vogel, F.S., de Sá Filho, M.F., Rubin, M.I., Silva, C.A., 2016. Impact of spontaneous *Neospora caninum*

infection on pregnancy loss and subsequent pregnancy in grazing lactating dairy cows. *Theriogenology*. 85, 519–527.

Schares, G., Peters, M., Wurm, R., Bärwald, A., Conraths, F.J., 1998. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analyzed by serological techniques. *Vet. Parasitol.* 80, 87-98.

Sroka, J., Kusyk, P., Bilska-Zajac, E., Karamon, J., Dutkiewicz, J., Wojcik-Fatla, A., Zajac, V., Stojcki, K., Rozycki, M., Cencek, T., 2017. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in goats from the south-west region of Poland and the detection of *T. gondii* DNA in goat milk. *Folia Parasitol. (Praha)*. 64, 2017.023.

Thurmond, M.C., Hietala, S. K., 1997. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *Am. J. Vet. Res.* 58, 1381-1385.

Varaschin, M.S., Hirsch, C., Wouters, F., Nakagaki, K.Y., Guimarães, A.M., Santos, D.S., Bezerra Jr, P.S., Costa, R.C., Peconick, A.P., Langohr, I.M., 2012. Congenital neosporosis in goats from the state of Minas Gerais, Brazil. *Korean J. Parasitol.* 50, 63-67.

Vonlaufen, N., Guetg, N., Naguleswaran, A., Müller, N., Björkman, C., Schares, G., von Blumroeder, D., Ellis, J., Hemphill, A., 2004. In vitro induction of *Neospora caninum* bradyzoites in vero cells reveals differential antigen expression, localization, and host-cell recognition of tachyzoites and bradyzoites. *Infect. Immun.* 72, 576–583.

Wilson, D.J., Orsel, K., Waddington, J., Rajeev, M., Sweeny, A.R., Joseph, T., Grigg, M.E., Raverty, S.A., 2016. *Neospora caninum* is the leading cause of bovine fetal loss in British Columbia, Canada. *Vet. Parasitol.* 218, 46–51.

Wouda, W., Bartels, C. J. M., Moen, A. R., 1999. Characteristics of *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology*. 52, 233-245.

## ANEXO 1

### Aprovação Comitê de ética



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMISSÕES PERMANENTES  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Cx.P.3037 - Lavras - MG - 37200-000 - (35) 3829-6182 [cba@ufla.br](mailto:cba@ufla.br)

#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada " Detecção de DNA de *Neospora caninum* em colostro, leite e glândula mamária, lesões teciduais e de anticorpos anti-N. caninum em colostro e leite de cabras naturalmente infectadas " protocolo nº 009/22, sob a responsabilidade de Mary Suzan Varaschin, Flademir Wouters, Djeison Lutier Raymundo, Angélica T. Barth Wouters e Ivam Moreira de Oliveira Junior, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de ensino e/ou pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas edificadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFLA, em reunião de 24/03/2022.

Vigência da autorização: de 01/04/2022 a 28/02/2023

Finalidade: ( ) Ensino (x) Pesquisa Científica

Espécie/linhagem/raça: Caprino

Número de animais aprovados: 15

Peso/Idade: 10 a 70kg / 8anos

Sexo: fêmea

Origem dos animais (documento apresentado pelo pesquisador responsável e arquivado pela CEUA)

*Rafael Neodini Remedio*

Prof. Rafael Neodini Remedio  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA