JOSÉ MÁRCIO SBRUZZI CARDOSO

Aspectos epidemiológicos da infecção por
Neospora caninum em bovinos leiteiros
da região do Vale do Paraíba Paulista

São Paulo
2010

JOSÉ MÁRCIO SBRUZZI CARDOSO

**Aspectos epidemiológicos da infecção por *Neospora caninum* em
bovinos leiteiros da região do Vale do Paraíba Paulista**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profª Drª Solange Maria Gennari

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2323
FMVZ

Cardoso, José Márcio Sbruzzi

Aspectos epidemiológicos da infecção por *Neospora caninum* em bovinos leiteiros da região do Vale do Paraíba Paulista / José Márcio Sbruzzi Cardoso. -- 2010.
136 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Solange Maria Gennari.

1. *Neospora caninum*. 2. Epidemiologia. 3. Bovinos. 4. Aspectos Reprodutivos. 5. Vias de Transmissão. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Aspectos epidemiológicos do *Neospora caninum* em bovinos leiteiros infectados naturalmente do Município de Caçapava - SP", Protocolo nº397/2003, utilizando 200 bovinos, sob a responsabilidade da Profª Drª Solange Maria Gennari, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado pela referida Comissão, em sessão do dia 10 de março de 2004.

(We certify that the Research "Epidemiological aspects of *Neospora caninum* epidemiology in cattle naturally infected from the Municipality of Caçapava - SP" protocol number 397/2003, utilizing 200 cattle, under the responsibility of Prof. Dr. Solange Maria Gennari, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 03/10/2004 meeting.

São Paulo, 10 de março de 2004

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Nome: CARDOSO, José Márcio Sbruzzi

Título: Aspectos epidemiológicos da infecção por *Neospora caninum* em bovinos leiteiros da região do Vale do Paraíba Paulista

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

A Deus:

Pela benção da vida

Aos meus pais Mário e Marlice:

Pelo carinho e dedicação

A minha esposa Tatiana:

Pelo incentivo e compreensão

Aos meus filhos Gabriel e Pedro:

Pela razão do meu viver

A G R A D E C I M E N T O S

À Prof^a. Dr^a. Solange Maria Gennari pela confiança no meu trabalho, pela amizade e pelas oportunidades oferecidas.

Aos Fazendeiros Sr. Alexandre Botelho, Sr. Manoel José de Alcântara, Sr. Edmilson Vilela, Sr. José Mancilha de Carvalho pela disponibilidade de suas propriedades. Sem eles, este trabalho não seria possível.

Aos Médicos Veterinários José Cláudio Campos de Carvalho e Arlindo Boing pela ajuda na colheita de material.

Ao Prof. Dr. Marcos Amaku pela realização da análise estatística.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

A Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena, Médica Veterinária, técnica especializada Nível Superior, pelo auxílio neste trabalho.

Ao Sr. Renato Caravieri, técnico do laboratório de Doenças Parasitárias, pelo auxílio neste trabalho e amizade.

Aos amigos Sandra, Luciana, Mikaela e Aline pelo auxílio e convívio.

A todos os funcionários da Biblioteca, estagiários e colegas que direta e indiretamente participaram na realização deste trabalho.

Ao CNPQ pela bolsa de doutorado.

A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro do projeto.

RESUMO

CARDOSO, J. M. S. **Aspectos epidemiológicos da infecção por *Neospora caninum* em bovinos leiteiros da região do Vale do Paraíba Paulista.** [Epidemiological aspects of *Neospora caninum* infection in dairy cattle from the Vale do Paraíba Paulista region]. 2010. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O protozoário intracelular *Neospora caninum* é um parasito importante em bovinos, nos quais pode causar abortamentos e infecção congênita. Os cães e alguns outros canídeos são os hospedeiros definitivos e vários pontos na cadeia epidemiológica ainda são pouco conhecidos. Esta tese tem por objetivos estudar aspectos da epidemiologia do *N. caninum* em bovinos leiteiros de rebanhos do Vale do Paraíba Paulista, São Paulo, Brasil. Para tanto um estudo prospectivo, com duração de dois anos e nove colheitas de sangue de todos os bovinos de três propriedades, foi realizado. Dados sobre: ocorrência de anticorpos anti- *N. caninum*, ocorrência e períodos de abortamentos, intervalo entre partos e número de serviços foram avaliados. Associação entre o status sorológico dos pares mães-filhas, bem como variação dos títulos de anticorpos durante a gestação em vacas positivas foi estudada. Um último estudo avaliou a permanência dos anticorpos anti-*N. caninum*, adquiridos passivamente através do colostro, em bezerros nascidos negativos. Os estudos permitiram concluir que a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* variou entre os rebanhos e dentro de cada rebanho nas diferentes colheitas; resultados sorológicos transitórios, não caracterizando soroconversão, foram observados; altas taxas de transmissão vertical e baixas taxas de transmissão horizontal foram encontradas; risco relativo de abortamentos em vacas soropositivas em relação às negativas foi observado em algumas ocasiões; dentre os índices reprodutivos avaliados somente os abortamentos foram significativos; anticorpos colostrais foram detectados nos bezerros até a 21ª semana pós-nascimento e vacas gestantes apresentaram variação nos títulos de anticorpos, com mais altos níveis no 2º e 3º trimestre de gestação, sem associação com abortamentos. Este foi o primeiro estudo prospectivo sobre aspectos epidemiológicos do *N. caninum* em bovinos no Brasil.

Palavras-chave: *Neospora caninum*. Epidemiologia. Bovinos. Aspectos Reprodutivos. Vias de Transmissão.

ABSTRACT

CARDOSO, J. M. S. **Epidemiological aspects of *Neospora caninum* infection in dairy cattle from the Vale do Paraíba Paulista region.** [Aspectos epidemiológicos da infecção por *Neospora caninum* em bovinos leiteiros da região do Vale do Paraíba Paulista]. 2010. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The intracellular protozoan parasite *Neospora caninum* is an important parasite in cattle, in which can cause miscarriages and congenital infection. Dogs and some other canids are the definitive hosts and various points in the epidemiology of this parasite are still obscure. This thesis aims to study aspects of the epidemiology of *N. caninum* in dairy cattle from herds in the Vale do Paraíba Paulista, São Paulo, Brazil. Therefore, a prospective study lasting two years and nine blood samples of all cattle from three farms was conducted and data from existence of anti-*N. caninum* antibodies in the herds, occurrence and periods of miscarriages, calving interval and number of services were assessed. Association between the serological status of the mother-daughter pairs, and variation in antibody titers during pregnancy in positive cows was studied. A final study evaluated the persistence of anti-*N. caninum* antibodies, passively acquired through colostrum, in calves born negative. The studies showed that the occurrence of anti-*N. caninum* antibodies ranged between herds and within herds in the different groups; transient serological results, not characterizing seroconversion, were observed; high vertical and low horizontal rates of transmission were found; relative risk of abortion in seropositive cows in relation to negative was observed in some occasions; among the reproductive indices evaluated only abortions were analysed as significant; colostral antibodies were detected in calves until weeks 21 post-birth, and pregnant cows showed variation in antibody titers, with highest levels in the 2nd and 3rd trimester of the pregnancy and this found was not associated with miscarriages. This was the first prospective study on epidemiology of *N. caninum* in cattle in Brazil.

Keywords: *Neospora caninum*. Epidemiology. Cattle. Reproductive aspects. Routes of Transmission.

LISTA DE FIGURA

Figura 1 - Ciclo biológico do <i>N.</i> <i>caninum</i>	18
---	----

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 - Estudos sobre a ocorrência de bovinos com anticorpos anti- <i>N.</i> <i>caninum</i> nas diferentes regiões do Brasil.....	19
---	----

LISTA DE TABELAS

EXPERIMENTO 1

Tabela 1 -	Soroprevalência a anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> na Fazenda I nas bezerras (≤ 12 meses); novilhas ($>12 \leq 24$ meses) e vacas (>24 meses) nas diferentes amostragens (março de 2004 a março de 2006).....	57
Tabela 2 -	Soroprevalência a anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> na Fazenda II nas bezerras (≤ 12 meses); novilhas ($>12 \leq 24$ meses) e vacas (>24 meses) nas diferentes amostragens (março de 2004 a março de 2006).....	57
Tabela 3 -	Soroprevalência a anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> na Fazenda III nas bezerras (≤ 12 meses); novilhas ($>12 \leq 24$ meses) e vacas (>24 meses) nas diferentes amostragens (março de 2004 a março de 2006).....	58
Tabela 4 -	Porcentagem de amostras soropositivas a anticorpos anti- <i>N. caninum</i> segundo o número de amostras colhidas para cada um dos animais das Fazendas I, II e III.....	59

EXPERIMENTO 2

Tabela 5 -	Risco Relativo de abortamento de vacas e novilhas soronegativas e soropositivas para anticorpos anti- <i>N. caninum</i> nas diferentes colheitas de sangue na Fazenda I.....	70
Tabela 6 -	Risco Relativo de abortamento de vacas e novilhas soronegativas e soropositivas para anticorpos anti- <i>N. caninum</i> nas diferentes colheitas de sangue na Fazenda II.....	71
Tabela 7 -	Risco Relativo de abortamento de vacas e novilhas soronegativas e soropositivas para anticorpos anti- <i>N. caninum</i> nas diferentes colheitas de sangue na Fazenda III.....	72

EXPERIMENTO 3

Tabela 8 -	Presença de anticorpos anti- <i>N. caninum</i> pela Reação de Imunofluorescência Indireta nas diluições de 1:50, 1:100 e 1:200, em amostras de soros das primeiras 24 semanas de bezerros negativos alimentados com colostro de vacas positivas para <i>Neospora caninum</i>	81
------------	--	----

EXPERIMENTO 4

Tabela 9 -	Título de anticorpos IgG anti- <i>Neospora caninum</i> pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI ≥ 100) em vacas leiteiras, de quatro diferentes Fazendas, durante a gestação.....	86
------------	---	----

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1.1	<i>Histórico.....</i>	16
1.2	<i>Estrutura e Ciclo de Vida.....</i>	17
1.3	<i>Ocorrência.....</i>	18
1.4	<i>Transmissão.....</i>	19
1.4.1	Transmissão Vertical.....	20
1.4.2	Transmissão Horizontal.....	21
1.5	<i>Patogenia.....</i>	28
1.6	<i>Impacto Econômico.....</i>	29
1.7	<i>Diagnóstico Clínico.....</i>	30
1.8	<i>Abortamento.....</i>	31
1.9	<i>Diagnóstico Laboratorial.....</i>	38
1.9.1	Diagnóstico Sorológico.....	38
1.9.2	Diagnóstico Histopatológico.....	41
1.9.3	Diagnóstico Molecular.....	45
1.9.4	Isolamento.....	46
1.10	Tratamento e Controle.....	47
2	OBJETIVOS.....	51
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS EXPERIMENTOS REALIZADOS.....	52
3.1	EXPERIMENTO 1 – Neospora caninum: estudos das diferentes vias de transmissão e da taxa de descarte em bovinos leiteiros.....	53
3.1.1	Introdução.....	53
3.1.2	Material e Métodos.....	54
3.1.2.1	<i>Bovinos e manejo do rebanho.....</i>	54
3.1.2.2	<i>Colheitas das amostras de sangue e sorologia.....</i>	55
3.1.2.3	<i>Análises Estatísticas.....</i>	55
3.1.3	Resultados.....	56
3.1.3.1	<i>Soroprevalência.....</i>	56

3.1.3.2	<i>Transmissão Vertical</i>	60
3.1.3.3	<i>Soroconversões</i>	60
3.1.3.4	<i>Descarte</i>	61
3.1.4	Discussão	61
3.1.5	Conclusão	64
3.2	EXPERIMENTO 2 – Neospora caninum: análise dos índices reprodutivos em rebanhos leiteiros	65
3.2.1	Introdução	65
3.2.2	Material e Métodos	66
3.2.2.1	<i>Bovinos</i>	66
3.2.2.2	<i>Manejo dos rebanhos</i>	66
3.2.2.3	<i>Colheitas das amostras de sangue e sorologia</i>	67
3.2.2.4	<i>Análises Estatísticas</i>	67
3.2.3	Resultados	68
3.2.3.1	<i>Risco relativo de abortamentos</i>	68
3.2.3.2	<i>Idade gestacional no abortamento</i>	73
3.2.3.3	<i>Risco de repetição de abortamento</i>	73
3.2.3.4	<i>Número de Serviços</i>	74
3.2.3.5	<i>Intervalo entre partos</i>	74
3.2.4	Discussão	75
3.2.5	Conclusão	76
3.3	EXPERIMENTO 3 – Perfil sorológico dos anticorpos colostrais para Neospora caninum em bezerros livres de infecção	78
3.3.1	Introdução	78
3.3.2	Material e Métodos	79
3.3.3	Resultados e Discussão	80
3.3.4	Conclusões	82
3.4	EXPERIMENTO 4 – Dinâmica de anticorpos durante a gestação em vacas naturalmente infectadas com Neospora caninum de quatro rebanhos leiteiros no Brasil	84
3.4.1	Introdução	84
3.4.2	Material e Métodos	84
3.4.2.1	<i>Animais</i>	85

3.4.2.2	<i>Colheitas de sangue e sorologia.....</i>	85
3.4.2.3.	<i>Análises Estatísticas.....</i>	85
3.4.3	Resultados e Discussão.....	86
3.4.4	Conclusão.....	87
4	CONCLUSÕES GERAIS.....	89
5	REFERÊNCIAS.....	91
	ANEXOS.....	125

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Histórico

Neospora caninum é um parasito protozoário apicomplexa que infecta uma grande variedade de espécies animais, tanto domésticos como silvestres. Neosporose é uma doença muito importante para bovinos porque pode causar abortamentos e sintomas clínicos em bezerros, ocasionando prejuízos econômicos. A doença foi primeiro observada por Bjerkås et al. (1984) em cães com encefalomielite e miosite na Noruega. Alguns anos mais tarde, Dubey et al. (1988a) descreveram *N. caninum* como um novo gênero e espécie.

O'Toole e Jeffrey (1987) e Parish et al. (1987) foram os primeiros a diagnosticar protozoário tipo *N. caninum* em tecidos de bezerros com sintomas neurológicos ao nascimento. Organismos semelhantes a *N. caninum* foram diagnosticados por Shivaprasad et al. (1989) na placenta de um feto abortado. O diagnóstico definitivo da infecção por *N. caninum* foi somente possível quando Lindsay e Dubey (1989a) desenvolveram um teste imunoistoquímico (IHQ) para identificar *N. caninum* em tecidos. Dubey et al. (1989) re-examinaram as seções histológicas do estudo de Parish et al. (1987) e confirmaram através da IHQ, a infecção por *N. caninum*.

Thilsted e Dubey (1989) foram os primeiros a relatar um surto de abortamento associado a neosporose em um rebanho bovino através da identificação do *N. caninum* pela IHQ no tecido cerebral dos fetos. Anderson et al. (1991) e Barr et al. (1991a) demonstraram, também pela IHQ em tecidos fetais, que *N. caninum* foi a principal causa de abortamentos em rebanhos leiteiros em algumas regiões dos Estados Unidos e o primeiro isolamento do *N. caninum* em fetos bovinos foi realizado naquele país, por Conrad et al. (1993a).

Somente em 1998, McAllister et al. (1998) identificaram os cães (*Canis familiaris*) como hospedeiros definitivos do *N. caninum* quando diagnosticaram oocistos nas fezes dos cães alimentados com tecidos de camundongos contendo cistos teciduais de *N. caninum*.

A transmissão horizontal, dos canídeos para bovinos, foi compreendida quando De Marez et al. (1999) demonstraram que bovinos podem ser infectados oralmente com oocistos de *N. caninum*. Cães também excretaram oocistos quando foram alimentados com placenta de vacas soropositivas para *N. caninum* (DIJKA STRA et al., 2001b) e com tecidos de bezerros infectados naturalmente (GONDIM et al., 2002).

Infecção congênita ou transplacentária foi demonstrada em bovinos (DUBEY et al., 1992b; BARR et al., 1994) e em cães infectados experimentalmente (DUBEY; LINDSAY 1989; DUBEY et al., 1990b; COLE et al., 1995b).

1.2 Estrutura e Ciclo de Vida

O ciclo de vida do *N. caninum* é composto por três estágios infecciosos: taquizoítos; bradizoítos nos cistos teciduais e esporozoítos nos oocistos. Taquizoítos e cistos teciduais são encontrados intracelularmente nos hospedeiros intermediários e definitivos (DUBEY et al., 2002a).

A morfologia dos diferentes estágios do *N. caninum* foi estudada por Dubey et al. (1988a, 2002a); Barr et al. (1991a, b); Dubey e Lindsay (1996); Speer et al. (1999); Lindsay et al. (1999b). Os taquizoítos são ovóides, lunares ou globulares e medem de 3-7 x 1-5µm, dependendo do estágio de divisão. Os taquizoítos penetram na célula do hospedeiro por invasão ativa, formando vacúolo parasitóforo no citoplasma e replicam rapidamente por endodiogenia. Em animais infectados, taquizoítos são encontrados principalmente em células neurais, macrófagos, fibroblastos, endotélio e hepatócitos.

Bradizoítos são os estágios encistados do parasito que replicam vagarosamente. Cistos teciduais são frequentemente circulares ou ovais, com até 107µm, parede lisa com 4µm de espessura, com bradizoítos enclausurados medindo de 6-8 x 1-1,8µm e são encontrados intracelularmente, principalmente em tecidos neurais, como cérebro, coluna espinhal e retina. Os fatores que influenciam a formação do cisto tecidual não são bem conhecidos.

Oocistos não esporulados de *N. caninum*, medindo 11,7 x 11,3µm, são excretados pelas fezes de cães infectados (MCALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999a). Cães excretam oocistos após cinco ou mais dias após a ingestão de tecidos de animais infectados (DUBEY et al., 2007). A esporulação dos oocistos ocorre dentro de 24 horas após a excreção, mas depende das condições de umidade, temperatura e oxigenação do ambiente. Oocistos esporulados são compostos de quatro esporocistos com dois esporozoítos cada e são considerados o estágio infeccioso de maior resistência no ambiente. A infectividade do oocisto esporulado no ambiente não é conhecida. A quantidade de oocistos excretados e o período de excreção dos oocistos bem como o período pré-patente variam enormemente, e encontram-se entre 5 e 30 dias (DUBEY et al., 2007).

Em canídeos e ruminantes, respectivamente, *N. caninum* pode ser adquirido após o nascimento, pela ingestão de tecidos infectados com taquizoítos ou cistos teciduais ou pela ingestão de alimentos ou água contaminados por oocistos esporulados. Outra forma de infecção é a transplacentária, de uma mãe infectada para seu feto durante a gestação. A infecção congênita é considerada a principal via de transmissão e manutenção do *N. caninum* nos rebanhos bovinos. A figura 1 ilustra o ciclo biológico do *N. caninum*.

Figura 1 - Ciclo biológico do *N. caninum*

1.3 Ocorrência

A ocorrência de bovinos infectados por *N. caninum* varia bastante entre os diferentes estudos. No Brasil foram registrados em todas as regiões pesquisadas, com valores que variaram de 0,00 a 91,20%, conforme apresentado no quadro 1.

Referência	Estado	Nº de rebanhos	Nº de animais examinados	Teste Empregado	Ponto de Corte	% Positivos
Aguiar et al. (2006)	RO	86	2109	RIFI	1:25	10,4
Andreotti et al. (2004)	MS	nd	151	ELISA	nd	16,6
Benetti et al. (2009)	MT	24	932	RIFI	1:200	53,5
Corbellini et al. (2002)	RS	5	223	ELISA	1:200	11,2
Corbellini et al. (2006a)	RS	60	1549	RIFI	1:200	17,8
De Melo et al. (2001)	MG	18	584	ELISA	nd	0,0-72,7
De Melo et al. (2004)	MG	18	576	ELISA	nd	12,6-46,0
Gondim et al. (1999a)	BA	14	447	RIFI	1:200	14,1
Guedes et al. (2009)	MG	18	559	RIFI	1:200	91,2
Guimarães Jr et al.(2004)	PR	23	623	RIFI	1:25	14,3
Locatelli-Dittrich et al. (2001)	PR	1	172	ELISA	1:100	34,8
Melo et al. (2006)	GO	21	930	RIFI	1:250	10,3-89,7
Mineo et al. (2006)	MG	2	243	ELISA	1:100	17,2
Minervino et al. (2008)	PA	16	160	RIFI	1:100	19,0
Munhoz et al. (2006)	RJ	56	563	ELISA	nd	23,3
Ogawa et al. (2005)	PR	90	385	RIFI	1:200	12,0
Oshiro et al. (2007)	MS	205	2488	RIFI	1:50	14,9
Santos et al (2006)	PR	nd	21	RIFI	1:200	14,3
Vogel et al. (2006)	RS	55	781	ELISA	nd	11,4

nd = não disponível

Quadro 1. Estudos sobre a ocorrência de bovinos com anticorpos anti-*N. caninum* nas diferentes regiões do Brasil.

1.4 Transmissão

N. caninum pode ser transmitido para bovinos através de duas vias: vertical e horizontal.

1.4.1 Transmissão Vertical

Trees e Williams (2005) sugeriram que, na neosporose, dois tipos de transmissão vertical podem ocorrer em bovinos, denominando-as endógena e exógena. Infecção transplacentária endógena ocorre como resultado da recrudescência de uma infecção fetal persistente durante a gestação e infecção transplacentária exógena resulta da infecção durante a gestação de uma fêmea não infectada.

Em bovinos, diversos estudos demonstraram que a via de transmissão vertical ou congênita do *N. caninum* é considerada a mais importante e pode ocorrer por diversas gerações (BARR et al., 1993; PARÉ et al., 1996, 1997; BJÖRKMAN et al., 1996, 2003; ANDERSON et al., 1997; THURMOND; HIETALA, 1997a; SCHARES et al., 1998; WOUDA et al., 1998, 1999a; DAVISON et al., 1999b,c; JENSEN et al., 1999; WALDNER et al., 1999; ATKINSON et al., 2000; BERGERON et al., 2000; DIJKSTRA et al., 2001a, 2003; LÓPEZ-GATIUS et al., 2004a; HALL et al., 2005; FRÖSLING et al., 2005; CHANLUN et al., 2007; NOGAREDA et al., 2007; GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2008, WOODBINE et al., 2008).

Estudos sorológicos, usando amostras de sangue pré-colostrais, mostraram que 81 a 95% dos bezerros nascidos de vacas soropositivas foram infectados congenitamente e estavam clinicamente normais (BARR et al., 1993; PARÉ et al., 1996, 1997; WOUDA et al., 1998; DAVISON et al., 1999b; HIETALA; THURMOND, 1999; WALDNER et al., 1999, 2001a; DIJKSTRA et al., 2001a). Entretanto, taxa de transmissão vertical menor que 73% foram relatadas em estudos transversais, que não usaram amostras de sangue pré-colostrais (MAINAR-JAIME et al. 1999; DYER et al., 2000; BERGERON et al., 2000; ATKINSON et al., 2000; DIJKSTRA et al., 2003; ROMERO; FRANKENA, 2003; PAN et al., 2004; BARTELS et al., 2007; CHANLUN et al., 2007; DIJKSTRA et al., 2008; MORÉ et al., 2009, 2010). A mais baixa taxa de transmissão vertical nestes estudos pode ser resultado da ocorrência de transmissão horizontal na vaca ou de seu bezerro após o parto ou declínio do título de anticorpos contra *N. caninum* abaixo dos níveis de detecção do teste empregado na data do sorodiagnóstico.

Paré et al. (1996) mostraram que a idade da vaca, número de lactações e histórico de abortamento não afetaram a taxa de infecção congênita. Entretanto, Dijkstra et al. (2003) indicaram que a transmissão vertical em vacas infectadas persistentemente é mais eficiente nas mais jovens do que nas mais velhas, possivelmente devido ao aumento da imunidade nos

animais mais velhos, entretanto maiores taxas de abate dos animais soropositivos podem ter influenciado este resultado.

O mecanismo para reativação da infecção latente e a virulência do *N. caninum* na vaca gestante é ainda desconhecido. Innes et al. (2002) sugeriram que os fatores que podem influenciar a transmissão vertical incluem: tempo, quantidade e duração da parasitemia durante a gestação; a eficácia da resposta imune materna e o desenvolvimento da resposta imune no feto.

Outra hipótese da reativação de cistos teciduais de *N. caninum* em vacas gestantes seria a imunossupressão causada por agentes infecciosos. Forragem contaminada por fungos é considerada um fator de risco para neosporose, pois micotoxinas podem ser produzidas (BARTELS et al., 1999) e causar imunossupressão depois de repetidas ingestões em baixas doses (CORRIER, 1991; SHARMA, 1993).

1.4.2 Transmissão Horizontal

Transmissão vertical é a principal rota de transmissão deste coccídio nos bovinos, mas, há também a transmissão horizontal e, sem esta última via, a infecção por *N. caninum* não seria sustentada, pois a transmissão vertical é menor que 100% (FRENCH et al., 1999). Deste modo, nem todos os bezerros nascidos de vacas soropositivas seriam infectados congenitamente e a prevalência da infecção no rebanho declinaria vagarosamente e eventualmente desapareceria.

Estudos prospectivos demonstraram que a taxa de transmissão horizontal no rebanho é baixa, com menos de 8% dos animais com conversão, isto é, negativos para positivos (PARÉ et al., 1997; WALDNER et al., 1998; DAVISON et al., 1999b; HIETALA; THURMOND, 1999; DIJKSTRA et al., 2003; PAN et al., 2004; BARTELS et al., 2006; CHANLUN et al., 2007). Entretanto, taxas de soroconversão superiores a 22% já foram encontradas (DIJKSTRA et al., 2002b; PFEIFFER et al., 2002; WALDNER et al., 2001a; BJÖRKMAN et al., 2003; MORÉ et al., 2010).

Hietala e Thurmond (1999) demonstraram que 17 dos 284 bezerros diagnosticados como negativos para *N. caninum* soroconverteram e permaneceram positivos nos seis anos de duração do estudo, determinando uma taxa de infecção pós-natal de menos de 1% ao ano. Soroconversão foi detectada em 13 bezerros no período neonatal seguido da ingestão de

colostro. As genitoras de nove bezerros eram soropositivos, uma era soronegativa e três sem diagnóstico. Outras quatro soroconversões foram detectadas aos 13, 20, 21 e 22 meses de idade e três destes animais eram descendentes de vacas soronegativas. Assim, acredita-se que os bezerros que soroconverteram podem ter sido infectados durante os primeiros meses de vida; ou infectados congenitamente, mas não tiveram uma resposta de anticorpos com níveis detectáveis no nascimento; ou a sensibilidade e especificidade do teste empregado podem ter influenciado o diagnóstico da soroconversão no rebanho, como sugerido por Davison et al. (1999b).

Taxas de conversão de animais soropositivos para soronegativos acima de 19% foram relatadas (SAGER et al., 2001; WALDNER et al., 2001a; PAN et al., 2004; CHANLUN et al., 2007; DIJKSTRA et al., 2008; MORÉ et al., 2009). Dijkstra et al. (2003) mostraram que 7,63% dos bovinos soropositivos converteram para negativo, mas aproximadamente 11% destes animais foram considerados falso-positivos, pois, podiam estar sendo medidos anticorpos colostrais que desapareceram alguns meses após o nascimento.

Dijkstra et al. (2008) mostraram uma diminuição dos níveis de anticorpos anti-*N. caninum* depois de três anos de estudo, pois a maioria dos animais com baixo título de anticorpos tornaram-se negativos e alguns animais com altos títulos tiveram uma diminuição deste valor.

Hietala e Thurmond (1999) e Innes et al. (2001) observaram bezerros negativos que soroconverteram após a ingestão de colostro e demonstraram que a resposta de anticorpos anti-*N. caninum* declinou ao redor de 19 e 21 dias após o nascimento, respectivamente, que é consistente com a meia vida de IgG de 18-22 dias em bezerro (TIZARD, 2002). Hietala e Thurmond (1999) mostraram que anticorpos pré-colostrais contra *N. caninum* não eram mais detectados nos testes sorológicos após 120 dias do nascimento.

Hietala e Thurmond (1999) sugeriram que um animal pode responder sorologicamente quando exposto ao *N. caninum*, mas o nível de anticorpos declina se o animal não for estimulado imunologicamente por exposições repetidas ou infecção persistente. Amostras soropositivas isoladas foram encontradas em 18% (51/284) dos animais soronegativos com idade entre 29 a 35 meses, demonstrando que houve uma estimulação de anticorpos específicos seguidos da exposição pós-natal ao *N. caninum*, sem subsequente infecção.

Respostas sorológicas transitórias ou variáveis em bovinos infectados por *N. caninum* foram também encontrados por Dannatt et al. (1998); Hietala e Thurmond (1999); Pereira Bueno et al. (2000); Sager et al. (2001); Pfeiffer et al. (2002); Stenlund et al. (2003); Chanlun et al. (2007); González-Warleta et al. (2008).

Até o momento, nenhum trabalho comprovou a transmissão horizontal do *N. caninum* entre bovinos. Anderson et al. (1997) realizaram um estudo prospectivo usando 25 novilhas soronegativas e 25 novilhas soropositivas que foram estabuladas desde o nascimento até o parto. As novilhas soronegativas permaneceram soronegativas e geraram bezerros não infectados. Novilhas soropositivas permaneceram clinicamente normais e geraram bezerros infectados congenitamente. Sete destes bezerros infectados congenitamente foram necropsiados e todos tinham evidências histopatológicas de infecção por *N. caninum*.

Nenhum estudo demonstrou que as placentas e descargas uterinas de vacas soropositivas que abortaram ou que não abortaram podem transmitir *N. caninum* para outros bovinos. Vacas e bezerras soronegativas que foram alimentadas com placenta de vacas soropositivas para *N. caninum* não foram infectadas (HO et al., 1997; DAVISON et al., 2001).

Não foi comprovado que *N. caninum* seja transmitido por transferência de embrião em bovinos (BAILLARGEON et al., 2001; LANDMANN et al., 2002; MOSKWA et al., 2008). Bielanski et al. (2002) demonstraram que embriões bovinos pré-implantados são resistentes à invasão por *N. caninum*.

A soroprevalência da infecção por *N. caninum* em touros é moderada (CAETANO DA SILVA et al., 2004a) e a possibilidade do touro participar na transmissão horizontal foi sugerida por Moore et al. (2003). Entretanto, Ortega-Mora et al. (2003); Caetano-da-Silva et al. (2004b); Ferre et al. (2005, 2008) e Serrano-Martínez et al. (2007a) mostraram que touros soropositivos excretaram esporadicamente DNA de *N. caninum* no sêmen, mas a frequência da detecção do DNA e a carga do parasito no sêmen foram baixas, sugerindo que o risco de transmissão sexual é baixo com pequena importância epidemiológica.

Osoro et al. (2009) utilizaram novilhas soronegativas para neosporose que foram cobertas com touros infectados experimentalmente com taquizoítos de *N. caninum*, mas não houve nem soroconversão das novilhas nem transmissão vertical para seus descendentes. Canada et al. (2006) demonstraram que vacas inseminadas com sêmen contaminado in vitro por *N. caninum* não foram infectadas, sugerindo que a transmissão através da inseminação artificial é improvável. Diferentemente, Serrano et al. (2006) e Serrano-Martínez et al. (2007b) mostraram que vacas inseminadas com sêmen contendo taquizoítos vivos de *N. caninum* soroconverteram e o desenvolvimento embrionário foi afetado.

Em camundongos evidências sugerem que a transmissão lactogênica de *N. caninum* pode ocorrer (COLE et al., 1995). Anticorpos anti-*N. caninum* foram diagnosticados em bezerros alimentados com colostro inoculado com taquizoítos (UGGLA et al., 1998;

DAVISON et al., 2001). Entretanto, Davison et al. (2001) não demonstraram evidências de infecção por *N. caninum* no cérebro e coração destes bezerros por análises histopatológicas e testes moleculares. Cães alimentados com colostro de bovinos inoculados com taquizoítos de *N. caninum* não soroconverteram e não excretaram oocistos (DIJKSTRA et al., 2001b).

De Yaniz et al. (2007) induziram uma resposta humoral específica após a instilação de taquizoítos de *N. caninum* na conjuntiva ocular de novilhas gestantes, mas os efeitos imunológicos e patológicos não foram estudados.

Desde o primeiro isolamento de oocistos excretados por cães em condições naturais por Basso et al. (2001a), somente raros relatos de cães infectados naturalmente e excretando oocistos foram feitos (SLAPETA et al., 2002b; MCGARRY et al., 2003; SCHARES et al., 2005). Esta baixa observação de cães excretando oocistos pode ser devido ao desenvolvimento da imunidade após infecção primária que previne excreções repetidas de oocistos (DIJKSTRA et al., 2001b; GONDIM et al., 2005) ou pelo baixo número de oocistos excretados sobre condições naturais e experimentais que dificultam a detecção (MCALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999a; BASSO et al., 2001a; DIJKSTRA et al., 2001b; SLAPETA et al., 2002b; MCGARRY et al., 2003; SCHARES et al., 2005; FURUTA et al., 2007).

Até o momento não é bem compreendida a frequência de excreção de oocistos de *N. caninum* pelos canídeos, a resistência dos oocistos no ambiente e se cães podem excretar oocistos em mais de uma ocasião (DUBEY, 2003).

Estudos epidemiológicos em rebanhos bovinos mostraram que a presença de cães é um fator de risco para a infecção por *N. caninum* (PARÉ et al., 1998; SAWADA et al., 1998; BARTELS et al., 1999; MAINAR-JAIME et al., 1999; OULD-AMROUCHE et al., 1999; WOUDA et al., 1999b; BARLING et al., 2000a; BASSO et al., 2001b; de SOUZA et al., 2002; DIJKSTRA et al., 2002a,c; OTRANTO et al., 2003; SÁNCHEZ et al., 2003; GUIMARÃES JR. et al., 2004; KRAMER et al., 2004; HOBSON et al., 2005; RINALDI et al., 2005; CORBELLINI et al., 2006b; BARTELS et al., 2007; GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2008; VANLEEUEWEN et al., 2010).

O encontro de fazendas sem cães e com alta soroprevalência para *N. caninum* pode estar associado a cães invasores (WOUDA et al., 1999b; SÁNCHEZ et al., 2003). Hässig e Gottstein (2002) mostraram que fazendas com casos de abortamentos associados a neosporose estavam mais próximas às cidades e vilas do que aquelas de áreas rurais remotas. Schares et al. (2003) encontraram maior prevalência de bovinos soropositivos nas fazendas próximas a regiões de maior concentração humana.

A prevalência de anticorpos para *N. caninum* é significativamente maior em cães de área rural que em cães de áreas urbanas (SAWADA et al., 1998; WOUDA et al., 1999b; SÁNCHEZ et al., 2003; HADDADZADEH et al., 2007; PARADIES et al., 2007). Kramer et al. (2004) realizaram um estudo em um hospital veterinário e mostraram que o maior risco de infecção por *N. caninum* ocorreu em cães acima de três anos de idade; que tinham contato com bovinos e que eram alimentados com carne bovina crua. Trees e Williams (2000) mostraram que 51% dos 300 cães alimentados com carcaça bovina foram soropositivos eram *N. caninum*.

A alta prevalência da infecção por *N. caninum* em cães de fazenda pode ser devido ao comportamento de carnívoro e de carniceiro, pois estes animais podem ingerir tanto pequenos animais domésticos e silvestres como bovinos mortos, fetos e restos placentários, aumentando as possibilidades de infecção.

Cães alimentados com carcaças de camundongos infectados por *N. caninum* excretaram poucos oocistos (MCALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999a). Deste modo, alguns pesquisadores questionaram se os cães seriam hospedeiros definitivos eficientes de *N. caninum* (LINDSAY et al., 2001). Gondim et al. (2002) comentam que o baixo número de oocistos produzidos nestes experimentos foi devido aos bradizoítos nas carcaças de camundongos infectados estarem em baixo número, imaturos ou atenuados pela passagem em um hospedeiro intermediário não usual para *N. caninum*. Estes pesquisadores mostraram, através de um estudo experimental, que o número de oocistos de *N. caninum* produzidos por cães que ingeriram tecidos de bezerros infectados foi significativamente maior que o número de oocistos produzidos por cães que ingeriram carcaças de camundongos infectados.

O consumo de membranas placentárias pode ser uma fonte de infecção para *N. caninum*, pois o parasito foi encontrado em placenta de vacas que abortaram (SHIVAPRASAD et al., 1989; BARR et al., 1994; ANDRIANARIVO et al., 2000; MALEY et al., 2003; MACALDOWIE et al., 2004; GIBNEY et al., 2007) e que não abortaram (FIORETTI et al., 2000; BERGERON et al., 2001). Cães alimentados com placenta de vacas soropositivas excretaram oocistos de *N. caninum* (DIJKSTRA et al., 2001b).

McAllister et al. (1996a, 2000) sugeriram que a contaminação dos reservatórios de alimentos dos bovinos por oocistos excretados por cães pode ocorrer porque roedores e aves que se alimentam da silagem podem atrair cães e outros canídeos que podem defecar e contaminar este alimento

Dijkstra et al. (2002c) relataram que a infecção pós-natal na maioria dos rebanhos foi mais relacionada ao alojamento dos bovinos, como contaminação do cocho de alimentação,

do que pelo alimento fornecido, pois os bovinos não infectados receberam o mesmo alimento que aqueles infectados. Dijkstra et al. (2002a) demonstraram que cães em fazendas com evidências de infecção pós-natal por *N. caninum* consumiram placentas e descargas uterinas bovinas e defecaram no cocho de alimentação e na silagem mais freqüentemente que em fazendas sem tal evidência.

Bartels et al. (1999); Ould-Amrouche et al. (1999) e Otranto et al. (2003) encontraram uma associação significativa entre a presença de galinhas, patos e gansos e o risco de infecção ou surto de abortamento em bovinos, pois, estes animais podem servir como vetores mecânicos de oocistos e/ou como hospedeiros intermediários.

Recentemente, Furuta et al. (2007) demonstraram que cães excretaram oocistos através das fezes após serem alimentados com ovos embrionados infectados experimentalmente com taquizoítos de *N. caninum*. Costa et al. (2008) encontraram soroprevalência de aves infectadas naturalmente por *N. caninum* em 1,5% das galinhas criadas intensivamente e em 23,5% das galinhas criadas extensivamente, indicando que estas passam a ter um papel importante na epidemiologia no meio rural.

A maioria das pesquisas de transmissão pós-natal em rebanhos bovinos foi realizada em cães, mas é possível o envolvimento de outros carnívoros silvestres. Atualmente, além dos cães, coiotes, raposas e dingos são considerados hospedeiros definitivos do *N. caninum* (GONDIM et al., 2004b; WAPENAAR et al., 2006; KING et al., 2010). Paré et al. (1998) sugeriram que os cães podem estar envolvidos indiretamente na transmissão de *N. caninum* por prover material infectado para um hospedeiro definitivo desconhecido, deslocando fetos abortados e placentas ou restos de animais mortos.

As variações nas taxas de prevalência encontradas em vários estudos podem ser atribuídas às diferenças climatológicas entre as áreas geográficas, proporcionando aumento da esporulação de oocistos e disseminação do *N. caninum* (BARTELS et al., 1999; WOUDA et al., 1999a; SANDERSON et al., 2000; PITEL et al., 2001; SCHARES et al., 2003, 2004; ANDREOTTI et al., 2004; RINALDI et al., 2005; LOPES-GATIUS et al., 2005a).

Scott et al. (2006), no Canadá, mostraram que a soroprevalência do *N. caninum* no rebanho não foi associada com a região agroecológica e com o tipo e pH do solo. Isto é compatível com as características biológicas conhecidas das doenças que incluem hospedeiros intermediários e um ponto de exposição.

Andreotti et al. (2004) mostraram que rebanhos no pantanal brasileiro tiveram maior prevalência de bovinos soropositivos para *N. caninum* que no cerrado, sugerindo que a alta

umidade e a presença de animais silvestres, principalmente canídeos, podem ter um importante papel na transmissão de *N. caninum* nessa região.

Otranto et al. (2003) observaram que bovinos criados em grandes rebanhos e com nenhuma prática de pastejo tiveram maior soroprevalência que aqueles em pequenas e médias fazendas e que pastejavam sazonalmente ou permanentemente. Guedes et al. (2008) mostraram que as propriedades com menos de 100 *ha* tiveram mais chance de apresentar vacas soropositivas que as fazendas com mais de 100 *ha*.

No Brasil, De Melo et al. (2001) estudaram dois grupos diferentes de exploração leiteira, A/B e C, e a frequência de animais soropositivos para *N. caninum* foi maior nos rebanhos leiteiros do tipo A/B, podendo ser reflexo do maior estresse das vacas com alta produção leiteira neste tipo de exploração.

Corbellini et al. (2006b) encontraram quatro variáveis significativamente associadas com a soroprevalência por *N. caninum*: o número de cães na fazenda, área da fazenda, alimentação com pool de colostro e região. Área da fazenda foi associada com a probabilidade de exposição por *N. caninum*, pois bovinos criados em fazendas pequenas tinham maior probabilidade de ser soropositivo. Entretanto, nem o número de vacas no rebanho nem a concentração de bovinos dentro da fazenda foi associado com o aumento do risco de exposição para *N. caninum*. Isto sugere que os cães podem ter maior contato com bovinos ou mais facilmente caminhar ao redor das fazendas menores do que nas fazendas maiores. Baseado nesta teoria os cães podem ter mais fácil acesso a carcaças de bovinos, fêtos abortados, placenta e descargas uterinas nas pequenas propriedades do que nas grandes.

Sanderson et al. (2000) encontraram associação significativa entre a soroprevalência para *N. caninum* no rebanho de corte e a densidade de vacas, sendo que as maiores soroprevalências foram associadas com mais alta densidade nos animais confinados no inverno.

Barling et al. (2000b), realizaram um amplo estudo e mostraram que a alta densidade de bovinos de corte foi um fator de risco de exposição para *N. caninum*. Nessas fazendas é mais provável o uso de suplementos alimentares, que podem aumentar o risco de transmissão horizontal pela contaminação fecal de alimentos e água por um hospedeiro definitivo. No mesmo estudo observaram que bezerros de corte, de fazendas com estação de parição na primavera, tiveram uma maior probabilidade de serem soropositivos do que bezerros de fazendas com estação de parição no outono. Bezerros alimentados com fardos de feno nos pastos tiveram maior prevalência da infecção, provavelmente, pelo aumento da densidade de parição nestes locais e de atração de hospedeiros definitivos em busca de alimento, os quais

podem defecar nestas áreas contaminado-as. Ranchos que permitem acesso de animais selvagens aos cochos de alimentação dos bezerros tiveram maior soroprevalência e o uso de cães trabalhadores nas fazendas foi um fator de prevenção provavelmente porque protegem as fontes de água e alimento da contaminação por outros canídeos.

1.5 Patogenia

Neospora caninum é capaz de produzir lesões necróticas visíveis em alguns dias e causar morte celular pela atividade de replicação dos taquizoítos. Isto pode produzir doença neuromuscular severa em cães e bovinos e, provavelmente, em outros hospedeiros, destruindo grande número de células neurais, incluindo aquelas dos nervos craniais e espinhais, com reflexo na condutividade das células afetadas (MAYHEW et al., 1991; DUBEY; DE LAHUNTA, 1993).

As lesões associadas ao *N. caninum* no cérebro e no coração de fetos abortados podem ser suficientemente severas para matar o feto. Em adição, há evidências de que uma infecção por *N. caninum* também desencadeie a liberação de citocinas pró-inflamatórias e uma resposta imune tipo Th1 na interface materno-fetal, que pode ser prejudicial para a gestação (WILLIAMS et al., 2000; INNES et al., 2005). Danos à placenta materna causados pelos taquizoítos podem matar o feto devido a interrupção do fornecimento de nutrientes e oxigênio (DUBEY et al., 1992b).

Vários autores descreveram a existência da variabilidade intra-específica do *N. caninum*, com diferenças no crescimento *in vitro* e virulência em camundongos observada entre diferentes isolados. A origem do isolado pode influenciar os resultados dos estudos sobre a virulência em camundongos. Isolados obtidos de cães e bovinos sintomáticos, bezerros natimortos ou fetos abortados foram considerados mais virulentos (ATKINSON et al., 1999; SCHOCK et al., 2001; QUINN et al., 2002; PÉREZ-ZABALLOS et al., 2005; COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006a) e isolados obtidos de bezerros saudáveis, mas infectados congenitamente, foram associados com baixa virulência (SHIBAHARA et al., 1999; MILLER et al., 2002; ROJO-MONTEJO et al., 2009). Estas diferenças poderiam influenciar os resultados clínicos da doença e as características epidemiológicas importantes, como o potencial de transmissão.

1.6 Impacto Econômico

Neospora caninum tem grande importância econômica nos rebanhos bovinos, pois causa perda dos fetos, problemas reprodutivos, despesa com o estabelecimento de uma nova gestação, abate prematuro das fêmeas adultas que abortaram, reposição dos animais abatidos, possíveis perdas na produção de leite, aumento dos gastos com profissionais para diagnóstico e tratamento dos animais infectados que sofreram abortamento (THURMOND; HIETALA, 1996, 1997a,b; PARÉ et al., 1997; WALDNER et al., 1998; DUBEY, 1999; PFEIFFER et al., 2002).

Não há dados concretos sobre as perdas econômicas causadas por *N. caninum* para a indústria bovina em qualquer parte do mundo (TREES et al., 1999; ANTONY; WILLIAMS, 2001). Estudos mostram que cerca de 20% de todos os abortamentos bovinos nos EUA e nos Países Baixos e aproximadamente 12,5% dos abortos na Bélgica e no Reino Unido foram causados pela neosporose (DAVISON et al., 1999a, DE MEERSCHMAN et al., 2002). No Texas, perdas na indústria da bovinocultura de corte foram estimadas entre 15 a 24 milhões de dólares (KASARI et al., 1999). Na Austrália e Nova Zelândia, acredita-se que mais de 100 milhões de dólares australianos são perdidos por ano devido a neosporose (REICHEL, 2000).

Em geral, as causas de aborto em bovinos de corte são menos conhecidas que em bovinos leiteiros pela dificuldade de monitoramento quando fetos são expelidos no primeiro trimestre. Embora não haja nenhuma evidência direta da morbidade associada a *N. caninum* em bovinos adultos, calcula-se que haja uma associação entre o soroestatus de bezerros e a redução no ganho de peso com uma perda projetada de 15,62 dólares por bezerro (BARLING et al., 2000a).

Estudos em bezerros de corte sugeriram associação negativa entre infecção por *N. caninum* e ganho de peso após o desmame, eficiência alimentar, característica da carcaça e perfil econômico (KASARI et al., 1999; BARLING et al., 2000a, 2001). Hoar et al. (2007) mostraram que os bezerros leiteiros soropositivos tiveram menor ganho de peso diário e maior taxa de mortalidade que os soronegativos. Entretanto, Paré et al. (1996) demonstraram que os bezerros infectados congenitamente tiveram maior taxa de sobrevivência que bezerros soronegativos. Waldner et al. (2004) não encontraram associação entre a soropositividade para *N. caninum* e o risco do bezerro sofrer um tratamento contra alguma doença, desenvolver uma doença crônica, aumento da taxa de mortalidade, baixo peso do animal no desmame e

menor ganho de peso diário do bezerro. Moré et al. (2010) não detectaram diferenças de ganho de peso nos bezerros soropositivos em relação aos soronegativos.

1.7 Diagnóstico Clínico

Sinais clínicos foram relatados em bovinos mais jovens que dois meses de idade. Bezerros infectados por *N. caninum* apresentaram peso abaixo da média ao nascer, inabilidade de crescimento, membros traseiros e/ou dianteiros flexionados ou hiperextendidos, ataxia, paresia, reflexo patelar diminuído, perda da propriocepção consciente, exoftalmia ou assimetria aparente dos olhos, hidrocefalia e estreitamento da coluna espinhal (O'TOOLE; JEFFREY, 1987; PARISH et al., 1987; DUBEY et al., 1989, 1990a,c, 1992a, 1998a; DUBEY; DE LAHUNTA, 1990; BARR et al., 1991b, 1993; BRYAN et al., 1994; ANDERSON et al., 1997; PETERS et al., 2001; DE MEERSCHMAN et al., 2005).

O principal sintoma clínico associado à neosporose em bovinos adultos é o abortamento. López-Gatius et al. (2004b, 2005b) e Bartels et al. (2006) não encontraram associação significativa entre a infecção por *N. caninum* e outros problemas reprodutivos além dos abortamentos. Alguns estudos demonstraram que vacas infectadas por *N. caninum* tiveram maior risco de retenção de placenta (BARTELS et al., 1999; HOBSON et al., 2005).

Björkman et al. (1996); Jensen et al. (1999); López-Gatius et al. (2005b) e Romero et al. (2005) mostraram que a infecção por *N. caninum* não afeta o número de serviços. Santolaria et al. (2009) indicaram que vacas infectadas por *N. caninum* que sofreram aborto foram 6,22 vezes mais prováveis de tornarem-se gestantes na primeira inseminação depois do aborto que as vacas soronegativas que também abortaram. Diferentemente, Munoz-Zanzi et al. (2004); Hobson et al. (2005) e Hall et al. (2005) mostraram que vacas soropositivas tiveram maior número de serviços que vacas soronegativas, indicando que este aspecto clínico-epidemiológico pode ser bastante variável.

Estudos em rebanhos leiteiros demonstraram que vacas soropositivas para *N. caninum* tiveram menor risco de infecção intramamária que vacas soronegativas (OULD-AMROUCHE et al., 1999; PEREGRINE et al., 2004). Hobson et al. (2005) não encontraram nenhuma diferença na ocorrência de mastite entre os animais soropositivos e soronegativos. Entretanto, Hässig e Gottstein (2002) observaram maior ocorrência de mastite em fazendas com casos de abortamentos associados à neosporose do que em fazendas sem abortamentos.

Neospora caninum pode afetar a produção leiteira com vacas soropositivas produzindo menos leite que as vacas soronegativas (THURMOND; HIETALA, 1997b; HERNANDEZ et al., 2001; KASHIWAZAKI et al., 2004; ROMERO et al., 2005; TIWARI et al., 2007). Entretanto, outros autores não encontraram associação entre soropositividade para *N. caninum* e produção leiteira (HALL et al., 2005; OGAWA et al., 2005; BARTELS et al., 2006). Hobson et al. (2002) demonstraram que os abortamentos e não a soropositividade afetaram a produção leiteira, pois vacas soropositivas e soronegativas produziram a mesma quantidade de leite. Pfeiffer et al. (2002) e García-Ispuerto et al. (2009) relataram aumento na produção leiteira nas vacas soropositivas para *N. caninum*.

Thurmond e Hietala (1996); Waldner et al. (1998); Hobson et al. (2005) e Bartels et al. (2006) encontraram um maior risco de descarte nos bovinos soropositivos para *N. caninum* do que nos soronegativos. Por outro lado, Pfeiffer et al. (2002); Cramer et al. (2002) e Tiwari et al. (2005) não encontraram diferenças significativas no abate de animais soropositivos quando comparados aos soronegativos, entretanto vacas soropositivas com problemas reprodutivos tiveram maiores risco de serem descartadas do que as soronegativas (THURMOND; HIETALA, 1996; WALDNER et al., 1998; TIWARI et al., 2005).

Os resultados contraditórios dos índices zootécnicos entre os animais soropositivos e negativos infectados por *N. caninum* podem ser devido às diferenças da patogenicidade/virulência da cepa; características geográficas e de manejo das propriedades; metodologia das colheitas e das técnicas de diagnóstico e da forma de análise dos resultados.

1.8. Abortamento

Abortamento é definido como término da gestação por observação da expulsão do feto entre os dias 42 e 260 após a inseminação; ou pela assumida perda fetal num intervalo maior que 120 dias entre duas inseminações (WOUDA et al., 1998). Os abortamentos podem ser definidos como endêmico, esporádico e epidêmico. Entretanto, há divergências quanto à classificação dos mesmos.

Davison et al. (1999c) mostraram que abortamentos associados à neosporose em rebanhos bovinos podem ser: esporádicos, quando um ou mais abortamentos ocorrem em intervalos irregulares com uma taxa inferior a 3% em um ano; endêmicos, em 3% dos animais

em risco em um ano e epidêmicos, abortamentos em mais de 3% dos bovinos em risco dentro de um período de três meses.

Wouda et al. (1999a) e Dijkstra et al. (2001a) definiram abortamento epidêmico se 12,5% dos animais em risco abortarem no período de dois meses. Schares et al. (2002) definiram abortamento epidêmico quando mais que 10% dos animais em risco abortaram no período de 42 dias.

Abortamentos associados a *N. caninum* foram descritos por toda a gestação, com maior ocorrência entre o quarto e o sétimo mês da gestação (THILSTED; DUBEY, 1989; BARR et al. 1991a; ANDERSON et al., 1991, 1995; THORNTON et al., 1994; YAEGER et al., 1994; HATTEL et al., 1998; MOEN et al., 1998; WOUDA et al., 1999a; MORALES et al., 2001; SAGER et al., 2001; SÖNDGEN et al., 2001; MEDINA et al., 2006). Fetos infectados por *N. caninum* podem morrer no útero e serem reabsorvidos ou abortados, expelidos mumificados ou autolizados. Infecção por *N. caninum* pode também causar natimortalidade, morte neonatal ou nascimento de bezerros vivos com sinais clínicos ou clinicamente normais, mas infectados.

Abortamento por neosporose pode ocorrer por todo o ano (ANDERSON et al., 1991; THURMOND et al., 1995; WOUDA et al., 1998), embora Wouda et al. (1999a), na Holanda, mostraram que surtos de aborto ocorreram mais frequentemente durante o verão e no começo do outono e Thurmond et al. (1995), nos Estados Unidos, relataram abortos mais frequentes durante o inverno.

A maioria dos abortamentos endêmicos causados por *N. caninum* foram associados à reativação e recrudesência da infecção latente (BJORKMAN et al., 1996; THURMOND et al., 1997; SCHARES et al., 1998; WOUDA et al., 1998; DIJKSTRA et al., 2001a; PFEIFFER et al., 2002; SCHARES et al., 2002).

Abortamentos epidêmicos associados à infecção por *N. caninum* descreveram um padrão de ocorrência consistente com exposição para um ponto de infecção, provavelmente ingestão de oocistos (THILSTED; DUBEY, 1989; THORNTON et al., 1991, 1994; NIETFELD et al., 1992; YAEGER et al., 1994; BOULTON et al., 1995; MCALLISTER et al., 1996a, 2000; THURMOND et al., 1997; MOEN et al., 1998; WALDNER et al., 1999; PATITUCCI et al., 1999; SCHARES et al., 1999a,b, 2002; WOUDA et al., 1999a; JENKINS et al., 2000; DIJKSTRA et al., 2001a; CRAWSHAW; BROCKLEHURST, 2003). Entretanto, abortamentos epidêmicos associados ao *N. caninum* podem ocorrer em rebanhos sem evidências de transmissão horizontal (DAVISON et al., 1999a; WOUDA et al., 1999a).

Diversos estudos demonstraram que vacas soropositivas para *N. caninum* foram mais prováveis de ter histórico de abortamento que vacas soronegativas (THURMOND et al., 1997; MAINAR-JAIME et al., 1999; DAVISON et al., 1999c; JENSEN et al., 1999; ATKINSON et al., 2000; PEREIRA BUENO et al., 2000; THOMPSON et al., 2001; CORBELLINI et al., 2002, 2006a; HERNANDEZ et al., 2002; MOORE et al., 2003, 2009; VÁCLAVEK et al., 2003; LÓPEZ-GATIUS et al., 2004a,b, 2005a,b, 2007; QUINN et al., 2004; KASHIWAZAKI et al., 2004; HOBSON et al., 2005; GARCIA-VAZQUEZ et al., 2005; KOIWAI et al., 2005; WALDNER, 2005; BARTELS et al., 2006; STÅHL et al., 2006; PABÓN et al., 2007; OSHIRO et al., 2007; GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2008). Waldner et al. (1998, 1999, 2001a,b) mostraram que vacas de corte soropositivas para *N. caninum* foram mais prováveis de não estarem gestantes em relação às soronegativas.

Estudos sorológicos prospectivos observaram que vacas positivas para a infecção por *N. caninum* tiveram um aumento do risco de abortamento de 2 a 7,4 vezes quando comparadas as vacas soronegativas (PARÉ, et al., 1997; THURMOND; HIETALA, 1997a; WOUDA et al., 1998; PFEIFFER et al., 2002; WESTON et al., 2005; LÓPEZ-GATIUS et al., 2007).

Thurmond e Hietala (1997a), em um estudo prospectivo, descreveram que o risco de abortamentos em novilhas infectadas congenitamente foi 7,4 vezes maior que em novilhas soronegativas durante a primeira gestação, diminuindo na segunda e terceira gestação para 1,7 e 1,0 vez, respectivamente. É possível que o número de vacas na segunda e terceira gestação tenha sido inadequado para avaliar o risco de abortamento, podendo estar relacionado com o descarte preferencial das vacas que abortaram ou que diminuíram a produção leiteira como resultado da infecção por *N. caninum*. López-Gatius et al. (2007) não encontraram associação entre o número de lactações e a ocorrência de abortamento em animais soropositivos para *N. caninum*.

Abortamentos repetidos foram relatados em bovinos infectados persistentemente, porém sua ocorrência foi menor que 4% (BARR et al. 1993; OBENDORF et al. 1995; ANDERSON et al., 1995; DANNATT et al., 1995; MOEN et al., 1998; THURMOND; HIETALA, 1997a; PEREIRA BUENO et al., 2000; CORBELINI et al., 2006a; PABÓN et al., 2007). Estes estudos demonstraram que a imunidade ou resistência que é adquirida pela vaca infectada persistentemente por *N. caninum* é, em alguns casos, insuficiente para prevenir a infecção fetal e o abortamento.

Dubey et al. (1997) mostraram que os altos níveis de anticorpos durante infecção aguda não protegeram as vacas de abortamentos por *N. caninum*, sugerindo que estes altos

níveis podem ser reflexos da dose infectante a qual a vaca foi exposta no ambiente ou do pouco controle de crescimento do *N. caninum* no tecido fetal, fazendo com que vacas, sustentando fetos com maiores cargas de parasito, podem ter estimulação antigênica persistente e montar maiores níveis de anticorpos.

Diversos autores mostraram que vacas com altos títulos de anticorpos anti-*N. caninum* tiveram maior risco de abortamento que vacas soronegativas e soropositivas com baixos títulos (MCALLISTER et al., 1996a; DUBEY et al., 1997; JENKINS et al., 1997; STENLUND et al., 1999; PEREIRA-BUENO et al., 2000; KASHIWAZAKI et al., 2004; ALMERÍA et al., 2009b). Entretanto, Paré et al. (1997) observaram que vacas com altos títulos aos 180 e 210 dias de gestação tiveram um menor risco de aborto que vacas com baixos títulos.

Paré et al. (1997); Guy et al. (2001); Williams et al. (2003); Gondim et al. (2004a) e Moré et al. (2009) mostraram que vacas com altos títulos de anticorpos durante a gestação foram mais prováveis de ter um bezerro soropositivo do que vacas com baixos títulos. Entretanto, Nogareda et al. (2007) estudaram vacas infectadas naturalmente por *N. caninum* durante a gestação e 49% das vacas que não abortaram tinham valores de anticorpos anti-*N. caninum* maiores durante a segunda metade da gestação e as vacas restantes mostraram valores de anticorpos constantes durante a gestação. Nas vacas que abortaram, títulos de anticorpos atingiram níveis mais elevados antes e no abortamento em 52% das vacas, enquanto, nos animais restantes valores similares antes e no aborto foram observados.

Infecções adquiridas no início da gestação, antes do desenvolvimento do sistema imune fetal, comumente causam morte fetal, como demonstrado em vacas infectadas experimentalmente com taquizoítos de *N. caninum* (DUBEY et al., 1992b, 1996; BARR et al., 1994; WILLIAMS et al., 2000, 2003, 2007; MACALDOWIE et al., 2004; GIBNEY et al., 2007; ROJO-MONTEJO et al., 2009). Infecções no segundo terço da gestação podem resultar em abortamentos (DUBEY et al., 1992b, 1996; GONDIM et al., 2004a; ALMERÍA et al., 2010) ou nascimentos de bezerros infectados ou não (CONRAD et al., 1993b; BARR et al., 1994; DUBEY et al., 1996; WILLIAMS et al., 2000; INNES et al., 2001). No último terço da gestação, quando o feto é imunocompetente, vacas usualmente chegam a termo e o bezerro geralmente está congenitamente infectado (WILLIAMS et al., 2000; GIBNEY et al., 2007).

Poucos trabalhos foram realizados em bovinos infectados experimentalmente com oocistos de *N. caninum*. O primeiro foi realizado por Trees et al. (2002) que infectaram vacas soronegativas com 600 oocistos de *N. caninum* aos 70 dias de gestação e nenhuma destas abortou e todos os bezerros nasceram soronegativos.

McCann et al. (2007) infectaram vacas soronegativas com 40.000 oocistos de *N. caninum* aos 70, 120 e 210 dias de gestação. Somente uma das seis vacas desafiadas aos 120 dias sofreu abortamento que foi associado a neosporose. Nenhuma infecção transplacentária foi detectada nos bezerros nascidos das vacas desafiadas aos 70 e 120 dias de gestação. Em contraste, quatro dos cinco bezerros das vacas desafiadas aos 210 dias de gestação foram infectadas verticalmente. Na segunda gestação destas vacas que infectaram verticalmente seus bezerros, infecção transplacentária não ocorreu em nenhum dos bezerros nascidos. Os autores sugeriram que a infecção com oocistos pós-natal pode causar transmissão transplacentária exógena, mas não transmissão transplacentária endógena durante a gestação seguinte à infecção e os bezerros infectados através da via transplacentária exógena podem carregar uma infecção persistente e induzir infecção transplacentária endógena. Entretanto, Dijkstra et al. (2008) mostraram em um rebanho leiteiro que vacas inseminadas após a infecção pós-natal geraram descendentes soropositivos, isto é, infecção transplacentária endógena após infecção primária horizontal.

Gondim et al. (2004a) realizaram um estudo em que as vacas foram infectadas experimentalmente com diferentes quantidades de oocistos de *N. caninum* em diversas fases de gestação. A taxa de transmissão vertical foi mais alta em vacas infectadas após 160 dias de gestação (3/4, 75%) e nas vacas que receberam mais de 41.000 oocistos (5/10, 50%). Transmissão transplacentária também ocorreu em uma das duas vacas que receberam a menor dose de oocistos (1.500) depois de 160 dias de gestação. O único aborto ocorreu aos 44 dias depois da infecção na vaca que recebeu 41.000 oocistos aos 120 dias de gestação.

Andrianarivo et al. (2001) infectaram vacas com taquizoítos de *N. caninum* entre 159 e 169 dias de gestação e os fetos removidos destes animais aos 219-231 dias de gestação mostraram uma forte resposta humoral anti-*N. caninum* com predomínio da resposta IgG1, mas a resposta imune mediada por células foi variável, sugerindo que o desenvolvimento completo da resposta imune mediada por células no feto bovino pode ocorrer em períodos mais variáveis da gestação que a resposta humoral.

Regulação da produção de citocinas na resposta imune celular e humoral tem um importante papel no controle da infecção por *N. caninum*, sugerindo que a produção apropriada das citocinas tipo Th1 e Th2, respectivamente Interferon-gama e Interleucina-4, são essenciais para o controle da carga parasitária no hospedeiro (INNES et al., 1995; KHAN et al., 1997; BASZLER et al., 1999b; LONG; BASZLER, 2000; NISHIKAWA et al., 2001b,c, 2003; TANAKA et al., 2000; YAMANE et al., 2000; RITTER et al., 2002; QUINN et al., 2004).

Quinn et al. (2002) demonstraram que a resposta imune mediada por Th1 detectada em camundongos infectados por *N. caninum* protegeu a mãe, mas prejudicou o feto. Os autores sugerem que a infecção por *N. caninum* adquirida pela vaca no primeiro trimestre pode induzir a resposta de citocinas Th1, levando a geração de Interleucina-12, IFN γ e Fator de Necrose Tumoral-alfa e, subseqüentemente, produção de radicais livres de oxigênio tais como óxido nítrico, que podem ser fatais para o parasito, mas podem matar o feto. Com o progresso da gestação, citocinas Th1 podem ser trocadas para respostas tipo Th2. Se a infecção parasitária é adquirida no terceiro trimestre, citocinas tais como Interleucina-4 e Interleucina-5 são geradas, que não eliminariam eficientemente o parasito, mas não acarretaria risco a gestação, porém a infecção congênita seria favorecida.

Gondim et al. (2004a) sugeriram que a infecção adquirida pela ingestão de oocistos provavelmente se dissemine mais vagarosamente que infecções induzidas pela inoculação de taquizoítos pela via intravenosa ou subcutânea, e isto permite que a vaca desenvolva uma resposta imune efetiva que previne ou reduz a passagem transplacentária de organismos, especialmente no início da gestação. No início da gestação as fêmeas geram uma resposta Th1 frente à infecção protozoária, que é mais eficaz contra protozoários intracelulares, mas uma infecção mais tardia durante a gestação tende a produzir uma resposta Th2, que é menos eficaz contra a infecção. Deste modo, a exposição no primeiro trimestre da gestação é menos provável causar infecção fetal e a exposição no último trimestre é mais provável resultar em infecção fetal. Inversamente, se ocorrer infecção fetal no início da gestação, morte fetal e abortamento são mais prováveis de ocorrer pela imaturidade do sistema imune fetal, enquanto que infecção transplacentária no final da gestação diminui a probabilidade de abortamentos.

Willians et al. (2000) mostraram que bovinos infectados por taquizoítos de *N. caninum* na 10ª semana de gestação, quando existe produção de níveis substanciais de IFN γ , podem ter efeitos patogênicos no feto. Entretanto, altos níveis de IFN γ foram também observados depois da infecção na 30ª semana de gestação, mas nenhuma morte fetal ocorreu. Foi sugerido que o tempo da resposta Th1 durante a gestação é crítico para a sobrevivência fetal e assim a resposta IFN γ , induzida pela infecção com *N. caninum* no final da gestação, pode ter ocorrido tarde demais para afetar uma resposta Th2 bem estabelecida na interface materno-fetal.

Rosbottom et al. (2008) observaram um aumento na quantidade de citocinas na interfase feto-materna nos bovinos em que os fetos morreram depois de uma infecção experimental com taquizoítos de *N. caninum* no início da gestação. Em contraste, níveis de citocinas tiveram um pequeno aumento nos bovinos infectados no final da gestação nos quais os fetos sobreviveram. As citocinas que estavam aumentadas incluem aquelas implicadas

como potencial causador de aborto, tal como IFN γ . Entretanto, os níveis de Th2 e citocinas regulatórias, incluindo IL-4, IL-10 e TGF-1, também aumentaram na placenta depois da infecção. O balanço de citocinas, como indicado pela razão IFN γ /IL-4, foi similar depois da infecção no início e final da gestação, mas a magnitude da expressão das citocinas foi muito diferente, com forte expressão de citocinas ocorrendo nos placentomas de bovinos cujos fetos foram mortos como resultado da infecção. Houve necrose disseminada e inflamação da placenta nos animais infectados no dia 70 de gestação que foi ausente nos animais infectados no dia 210.

López-Gatius et al. (2007) observaram que a produção de IFN γ em vacas soropositivas levou a uma redução da taxa de abortamento, que foram similares às taxas observadas em vacas soronegativas. Estes resultados sugerem que uma resposta imune celular, relacionada à produção de IFN γ , pode ser importante no mecanismo envolvido na proteção contra abortamentos associados ao *N. caninum* em vacas cronicamente infectadas. Produção de IFN γ foi relacionado a menores títulos de anticorpos, sugerindo que cooperação Th1-Th2 durante a gestação, pelo menos nas vacas infectadas, é muito mais provável do que o fenômeno Th2. Provavelmente, altos títulos de anticorpos podem refletir replicação maior de parasitos e uma diminuição da resposta imune mediada por células.

Almería et al. (2009b) investigaram uma possível relação entre níveis plasmáticos de anticorpos IgG1 e IgG2 anti-*N. caninum* e produção de IFN γ durante a gestação de 31 vacas leiteiras infectadas naturalmente com *N. caninum*. Dez gestações terminaram em aborto. Uma das 11 vacas que produziram IFN γ sofreu abortamento (9.1% das vacas que produziram IFN γ). As vacas que não abortaram e produziram IFN γ (n = 10) mostraram um significativo aumento na taxa de anticorpos IgG2/IgG1 no período da gestação que as vacas que não produziram IFN γ (n = 11). Um efeito negativo da produção de IFN γ nos anticorpos IgG1 foi observado, enquanto produção de IFN γ não afetou os níveis de anticorpos IgG2. Em contraste, altos níveis de anticorpos IgG2 comparados aos anticorpos IgG1 foram observados durante a gestação dos animais que abortaram, nos animais que não produziram IFN γ e na vaca que abortou e produziu IFN γ . Estes achados indicam que uma resposta imune Th1, em que prevalece os anticorpos IgG2, poderia proteger contra aborto por *N. caninum*, mas somente na presença de produção de IFN γ . Elevados títulos de anticorpos IgG2 parecem ser insuficientes para proteger os animais infectados cronicamente com *N. caninum* contra o abortamento.

Estudos de níveis de progesterona no plasma de vacas gestantes mostraram que os níveis aumentaram constantemente do início ao meio da gestação, declinando significante nas

últimas semanas (POPE et al., 1969). Innes et al. (2001) observaram que os níveis de progesterona estão correlacionados com o padrão de mudanças da imunidade mediada por células com o pico da resposta celular contra o parasito, ocorrendo no início e fim da gestação quando os níveis de progesterona estão baixos. Esta modulação da resposta do IFN γ durante a gestação pode influenciar a recrudescência de uma infecção persistente, resultando em parasitemia, como também sugerido por Szekeres-Bartho et al. (2001) e Bech-Sàbat et al. (2007). García-Ispuerto et al. (2010) observaram durante a gestação de vacas soropositivas para *N. caninum* um maior nível de progesterona plasmático que nas vacas soronegativas, mas nenhum abortamento ocorreu.

1.9 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial baseia-se em diagnóstico sorológico, histopatológico, molecular e isolamento.

1.9.1 Diagnóstico Sorológico

Testes sorológicos são ferramentas importantes para estudar a epidemiologia da neosporose bovina, pois podem ser aplicados antemortem e prover informações sobre a infecção no rebanho.

Diversos testes sorológicos podem ser usados para detectar anticorpos anti-*N. caninum*, incluindo Ensaio de Imunoabsorção por Ligação Enzimática (ELISA); Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI); Teste de Aglutinação (NAT) e Immunoblots. Entretanto, diferenças na validade dos testes e metodologia empregada nos laboratórios podem influenciar o diagnóstico (DUBEY; SCHARES, 2006; DUBEY et al., 2007).

Maley et al. (2001), através de um estudo prospectivo usando bezerros infectados experimentalmente, demonstraram pela RIFI que os níveis de anticorpos específicos permaneceram altos, com pouca flutuação, por quase um ano. Em contraste, através do ELISA, alguns animais apresentaram uma flutuação da resposta de anticorpos que caíram para baixos títulos. Estes achados mostram a dificuldade de interpretar resultados dos testes que

detectam anticorpos para *N. caninum* e mesmo resultados de baixos títulos ou negativos não significam necessariamente que o animal não esteja infectado.

Testes sorológicos podem ser utilizados para determinar as vias de transmissão do *N. caninum* em um rebanho. Evidências de transmissão horizontal foram determinadas através da falta de associação entre o status sorológico dos pares vaca-bezerro e das diferenças na ocorrência da infecção nas diferentes faixas etárias e nos lotes de separação (THURMOND et al., 1997; WALDNER et al., 1998; WOUDA et al., 1998, 1999a; PATITUCCI et al., 1999; SCHARES et al., 1999a,b, 2002; ATKINSON et al., 2000; DYER et al., 2000; BERGERON et al., 2000; DIJKSTRA et al., 2001a, 2002a; SAGER et al., 2001; BJÖRKMAN et al., 2003; ROMERO; FRANKENA, 2003; STENLUND et al., 2003; KASHIWAZAKI et al., 2004; HALL et al., 2005; FRÖSSLING et al., 2005; BARTELS et al., 2007; WOODBINE et al., 2008).

Estudos soroepidemiológicos utilizando ELISA avidez, que demonstra a especificidade da ligação entre o anticorpo ao antígeno, podem indicar se a infecção ou abortamento por *N. caninum* ocorreu em animais com infecção aguda ou crônica (BJÖRKMAN et al., 1999, 2003, 2005; JENKINS et al., 2000; MCALLISTER et al., 2000; MALEY et al., 2001; DIJKSTRA et al., 2002a; SCHARES et al., 2002; STENLUND et al., 2003; AGUADO-MARTINEZ et al., 2005; FRÖSSLING et al., 2005).

A sorologia positiva da infecção por *N. caninum* em uma vaca que abortou e no feto não permite um diagnóstico definitivo da neosporose como causa do abortamento porque somente uma baixa proporção de vacas infectadas sofre abortamento e a maioria dos bezerros nasce infectada e saudável (BARR et al., 1993; PARÉ et al., 1996, 1997; WOUDA et al., 1998; DAVISON et al., 1999b; HIETALA; THURMOND, 1999; WALDNER et al., 1999, 2001a; DIJKSTRA et al., 2001a).

O diagnóstico pressuntivo da neosporose como causa do abortamento utilizando métodos sorológicos deverá ser realizado através da análise estatística. Hietala e Thurmond (1995) sugeriram um método soroepidemiológico onde a razão é determinar se o risco de abortamento em vacas gestantes soropositivas para *N. caninum* é mais alta que em vacas gestantes soronegativas em um determinado período de tempo.

Testes sorológicos podem ser usados para examinar a infecção de um feto abortado porque sangue fetal, fluido sorosanguinolento na pleura ou cavidade peritoneal e o conteúdo abomasal podem conter anticorpos específicos contra *N. caninum*. Há diversos relatos indicando uma baixa sensibilidade quando sorologia fetal é feita pela RIFI ou ELISA (BARR et al., 1995; REICHEL; DRAKE, 1996; WOUDA et al., 1997a; GOTTSTEIN et al., 1998;

SLOTVED et al., 1999; SCHOCK et al., 2000; SÖNDGEN et al., 2001; ÁLVARES-GARCIA et al., 2003).

Wouda et al. (1997a) mostraram que a baixa sensibilidade da sorologia fetal pode ser devido a falta de imunocompetência fetal, especialmente em fetos mais jovens que seis meses e no tempo entre infecção e morte fetal. Em adição, autólise pode causar degradação das imunoglobulinas fetais. Assim, o resultado sorológico negativo em um feto abortado não exclui infecção por *N. caninum*.

Flutuações dos níveis de anticorpos para *N. caninum* durante a gestação foram observadas, mas as dinâmicas destas flutuações foram diferentes entre os estudos. Alguns trabalhos relataram aumento dos títulos de anticorpos contra *N. caninum* no meio da gestação e uma diminuição em direção ao termo da gestação (PARÉ et al., 1997; DANNATT et al., 1998; STENLUND et al., 1999; PEREIRA-BUENO et al., 2000; GUY et al., 2001; WILLIAMS et al., 2003; ANDRIANARIVO et al., 2005; WESTON et al., 2005).

Elevação dos níveis de anticorpos no terceiro trimestre de gestação e no parto também já foram encontradas (CONRAD et al., 1993b; FIORETTI et al., 2003; GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2008). Entretanto, em alguns estudos observaram-se diminuição dos títulos de anticorpos no parto (DUBEY et al., 1996; ANDERSON et al., 1997; WILLIAMS et al., 2000; KYAN et al., 2005). Willians et al. (2000) sugeriram que a transferência da imunoglobulina sérico para o colostro antes da parição pode diminuir os níveis de anticorpos no parto.

Conrad et al. (1993b); McAllister et al. (1996a); Dubey et al. (1997); Cox et al. (1998) e Weston et al. (2005) demonstraram declínio dos títulos de anticorpos após o abortamento associado à neosporose. Porém, Willians et al. (2000) não encontraram diminuição dos títulos no grupo dos animais que foram infectados experimentalmente e abortaram.

Jenkins et al. (1997) descreveram variações na dinâmica dos anticorpos para *N. caninum* em vacas gestantes infectadas naturalmente: um aumento do título de anticorpos no início da gestação seguido por um segundo aumento no final da gestação; também observaram aumento lento dos títulos de anticorpos no final da gestação e variações dos títulos de anticorpos durante a gestação sem um pico evidente. Entretanto, Häsler et al. (2006a) não encontraram diferenças nos níveis de anticorpos durante a gestação de vacas infectadas naturalmente.

Soronegatividade em algum ponto durante a gestação em vacas infectadas por *N. caninum* já foi observada (PEREIRA BUENO et al., 2000; SAGER et al., 2001; KYAN et al., 2005; WESTON et al., 2005; HÄSLER et al., 2006a; GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2008;

NOGAREDA et al., 2007). Vacas soronegativas podem abortar e permanecer soronegativas, mesmo que *N. caninum* seja diagnosticado no seu feto, mostrando que a vaca estava aparentemente abrigando e transmitindo o parasito sem anticorpos detectáveis no soro. A razão da persistente soronegatividade não está clara, mas foi sugerido que estes animais não são capazes de sintetizar anticorpos contra o parasito devido à imunotolerância (DAVISON et al., 1999a; PITEL et al., 2001; SAGER et al., 2001; HÄSLER et al., 2006a).

Weston et al. (2005) descreveram que categorizar as vacas simplesmente como soropositivas ou soronegativas pode ser um erro, pois os níveis de anticorpos contra *N. caninum* podem variar na vida do animal, com alguns animais apresentando altos níveis por toda a vida, outros com níveis detectados por somente um curto período e alguns alternando entre resultados sorológicos negativos e positivos.

A grande variabilidade nos títulos de anticorpos anti-*N. caninum* nos animais infectados mostra a dificuldade de dar como causa do abortamento um diagnóstico de neosporose. Se a perda do feto é detectada alguns meses depois do abortamento, diagnóstico sorológico para *N. caninum* na vaca será de pouco valor, pois um título positivo somente indica infecção e um resultado negativo não exclui *N. caninum* como a causa.

1.9.2 Diagnóstico Histopatológico

Poucos bezerros infectados congenitamente têm sinais clínicos e é difícil encontrar *N. caninum* histologicamente mesmo em bezerros com doença clínica. De Meerschman et al. (2005) identificaram *N. caninum* em seções histológicas de somente um dos sete bezerros que nasceram com sinais neurológicos e que tinham anticorpos anti-*N. caninum*.

Neospora caninum ainda não foi identificado em seções histológicas coradas de tecidos de bovinos com mais de 3 meses de idade. Somente, Sawada et al. (2000) isolaram *N. caninum* através de bioensaios em camundongos inoculados com homogenato de cérebro de uma vaca infectada naturalmente e que tinha abortado dois fetos infectados por *N. caninum*. Áreas multifocais com leucócitos perivascular e gliose foram observados no cérebro e mesencéfalo da vaca, mas *N. caninum* não foi identificado nas seções histológicas. Okeoma et al. (2004) isolaram taquizoítos de *N. caninum* em cultura de células de cérebro de uma vaca, mas nada foi encontrado nos exames histopatológicos.

Lesões macroscópicas em fetos abortados são raras, mas podem estar presentes no coração, músculo esquelético e cérebro. Focos branco-pálidos podem estar presentes nos músculos esqueléticos e no coração. Focos pálidos a escuro de necrose no cérebro e hidrocéfalo podem ocorrer (DUBEY et al., 1998a). Frequentemente os fetos estão autolizados e mumificados. Áreas focais de descoloração podem estar presentes nos cotilédones placentários (FIORETTI et al., 2003).

O critério do diagnóstico para abortamento associado ao *N. caninum* não pode ser baseado somente na demonstração de infecção fetal, mas, deve ser avaliada a extensão e severidade das lesões no feto (JENKINS et al., 2002).

Abortamentos em bovinos causados por protozoários apicomplexas são provisoriamente diagnosticados através das lesões microscópicas características no feto como encefalite necrosante multifocal não-supurativa; miocardite não-supurativa e, menos frequentemente, inflamação não-supurativa focal em outros órgãos, tais como músculo esquelético, fígado, pulmão e placenta (THILSTED; DUBEY, 1989; BARR et al., 1990, 1991a; DUBEY et al., 1990c; THORNTON et al., 1991; ANDERSON et al., 1991, 1995; NIETFELD et al., 1992; OGINO et al., 1992; DUBEY; LINDSAY, 1993; LINDSAY et al., 1993, YAEGER et al., 1994; BOULTON et al., 1995; MCALLISTER et al., 1996a; WOUDE et al., 1997b; HATTEL et al., 1998; HELMAN et al., 1998; MOEN et al., 1998; FIORETTI et al., 2000; MORALES et al., 2001; CORBELLINI et al., 2002; KIM et al., 2002; MOORE et al., 2002; BOGER; HATTEL, 2003; MALEY et al., 2003; PEREIRA-BUENO et al., 2003; COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006b; GIBNEY et al., 2007; LÓPEZ-GATIUS et al., 2007; PESCADOR et al., 2007; REITT et al., 2007; REGIDOR-CERRILLO et al., 2008).

A quantidade de *N. caninum* encontrado em tecidos bovinos é baixa, mesmo em fetos bem preservados é difícil reconhecer taquizoítos em seções teciduais coradas pela Hematoxilina e Eosina. A resposta iniciada pelo parasito que mata as células do hospedeiro também mata o parasito e, portanto, é raro encontrar taquizoítos intactos e bem preservados em fetos mortos (DUBEY; LINDSAY, 1996; DUBEY et al., 2006). Em seções de Hematoxilina e Eosina os taquizoítos estão frequentemente circulares e levemente alongados e é importante observar o núcleo vesicular para distinguir das células do hospedeiro em degeneração. Raramente os taquizoítos são cortados longitudinalmente para serem vistos em forma crescente (DUBEY et al., 2006). Bradizoítos em cistos teciduais têm um núcleo terminal e são corados em vermelho com coloração PAS positiva, ácido periódico de Schiff (PAS) (DUBEY et al., 2002a).

Confirmação de diagnóstico de abortamento por neosporose requer detecção do protozoário em tecido fetal que reage positivamente pela imunoistoquímica com anti-soro específico (LINDSAY; DUBEY, 1989a; ANDERSON et al., 1991; BARR et al., 1991a; NIETFELD et al., 1992; DUBEY et al., 1992b; DUBEY; LINDSAY, 1993; YAEGER et al., 1994; WOUDA et al., 1997b; HATTEL et al., 1998; HELMAN et al., 1998; CORBELLINI et al., 2000, 2002, 2006b; MORALES et al., 2001, 2002; SAGER et al., 2001; MOORE et al., 2002; BOGER; HATTEL, 2003; PEREIRA-BUENO et al., 2003; PESCADOR et al., 2007; REITT et al., 2007; MOORE et al., 2008; SÁNCHEZ et al., 2009).

Grupos de taquizoítos não podem ser distinguidos de cistos teciduais baseado na imunoistoquímica ao menos que anticorpos específicos para bradizoítos sejam usados (MCALLISTER et al., 1996b).

Fetos com lesões histopatológicas sugestivos para *N. caninum*, mas negativos no teste de imunoistoquímica pode ser devido às limitações de amostragem de tecidos, do grau de autólise, da apresentação de antígenos e eliminação do organismo pela resposta inflamatória fetal (OTTER et al., 1995; HATTEL et al., 1998; GIBNEY et al., 2007; LÓPEZ-GATIUS et al., 2007).

A identificação do antígeno parasitário pela imunoistoquímica depende do número de seções feitas nos tecidos e o tempo gasto no exame microscópico (WOUDA et al., 1997b). Thornton et al. (1991) comentaram que as lesões cerebrais resultaram de uma infecção protozoária consistente de um foco necrótico pequeno e que o exame de dois cortes cerebrais pode falhar na detecção do parasito. Reitt et al. (2007) demonstraram que a sensibilidade da imunoistoquímica para *N. caninum* foi melhorada pelo exame de seis locais do cérebro fetal.

É difícil determinar a causa do abortamento, pois nas infecções por *N. caninum* não está claro se a morte fetal ocorre pelas lesões cerebrais ou miocardite causadas pelo parasito no feto ou se são causados por danos a placenta materna que corta o suprimento de nutriente ao feto ou ambas as situações. Dubey et al. (1992b) examinaram fetos abortados de vacas infectadas experimentalmente e encontraram lesões na matéria branca do cérebro sem células inflamatórias, que sugerem hipoxia fetal devido a danos da placenta (BUXTON et al., 1982; SCHOCK et al., 2000; REES et al., 1997).

Infiltrado de células inflamatórias e necrose na placenta foi descrito em animais infectados naturalmente (BARR et al., 1990) e em vacas infectadas experimentalmente no início da gestação (MACALDOWIE et al., 2004; MALEY et al., 2006; GIBNEY et al., 2007).

Gibney et al. (2007) demonstraram uma maior carga parasitária na placenta de vacas infectadas experimentalmente aos 70 dias que naquelas infectadas aos 210 dias de gestação,

sugerindo que os parasitos podem multiplicar nos tecidos fetais, que são imunologicamente incompetentes, e então reinvadir a placenta, levando a extensa parasitemia da placenta, particularmente nos cotilédones.

Nos estudos sorológicos a maioria dos fetos soropositivos tinha seis meses ou mais de idade gestacional (YAEGER et al., 1994; BARR et al., 1995; WOUDA et al., 1997a; GONZÁLEZ et al., 1999; SÖNDGEN et al., 2001; ÁLVAREZ-GÁRCIA et al., 2002; PEREIRA-BUENO et al., 2003; SADREBAZZAZ et al., 2007). González et al. (1999) demonstraram que os fetos soropositivos sem lesões detectáveis eram mais velhos (média 7,5 meses) que aqueles com lesões cerebrais (média 5,7 meses) e tinham mais altos títulos de anticorpos. IgM foram mais prevalentes nos fetos jovens e IgG nos mais velhos. Estes resultados sugerem que a infecção de fetos jovens com *N. caninum* pode levar a uma maior multiplicação e maiores danos teciduais, mas pouca ou nenhuma produção de anticorpos; enquanto a infecção de fetos mais velhos com o sistema imune mais desenvolvido pode produzir danos teciduais menos severos porque a infecção é mais controlada, mas maiores títulos de anticorpos são encontrados.

Wouda et al. (1997a) e Pereira-Bueno et al. (2003) sugeriram que as razões possíveis das discrepâncias entre os resultados sorológicos e os achados histológicos podem ser devido a imaturidade fetal; autólise nos fluídos ou tecidos fetais; morte do feto durante a fase aguda da infecção, ponto de corte selecionado, a fonte dos fluidos examinados, detecção de somente IgG ao invés de IgG e IgM e falha em detectar pequenas lesões focais do *N. caninum*.

Barr et al. (1991a) sugeriram que a variabilidade nas manifestações clínicas dos fetos expostos no útero ou dos bezerros infectados congenitamente pode ser devido ao resultado de múltiplos fatores, incluindo a idade do feto, o estágio do desenvolvimento do sistema imune no tempo da exposição ao *N. caninum*, a distribuição e severidade das lesões no SNC. Observa-se uma marcada redução na porcentagem de fetos com cistos teciduais além de quatro meses de gestação que pode ser devido a maturação do mecanismo de defesa fetal com o avanço da idade gestacional. Houve uma notável redução na severidade da inflamação tecidual em fetos mais jovens nos quais cistos teciduais predominaram, sugerindo que uma redução da resposta inflamatória fetal está associada com a formação de cisto tecidual. Assim, a formação de cistos teciduais e a redução da inflamação podem indicar que a infecção fetal subaguda e crônica é mais prevalente em fetos mais jovens com sistema imune subdesenvolvido. Similarmente, o predomínio de formas não císticas, com mais necrose tecidual em fetos mais desenvolvidos, pode ser resultado da mais avançada resposta inflamatória aos parasitos. O pequeno número e a reduzida porcentagem de fetos positivos

para protozoários além de seis meses de gestação também corresponde a idade gestacional no qual o sistema imune fetal funcional é primeiro reconhecido. Ogino et al. (1992) sugeriram que as lesões associadas a *N. caninum* em fetos com menos de cinco meses de gestação foram relacionados com a destruição de tecidos causados pela multiplicação ativa dos taquizoítas.

1.9.3 Diagnóstico Molecular

Oocistos de *N. caninum* são morfológicamente similares aos oocistos de *Toxoplasma gondii* e de *Hammondia hammondi*, em fezes de gato, e de *H. heydorni* em fezes de cão (DUBEY et al., 2002b). Métodos moleculares foram desenvolvidos para distinguir oocistos de *N. caninum* de oocistos de *H. heydorni* (HILL et al., 2001; SLAPETA et al., 2002a).

Há uma ampla evidência de que métodos moleculares podem aumentar a detecção e a identificação do parasito ou DNA-parasitário nas amostras teciduais, como cérebro ou placenta (KAUFMANN et al., 1996; LALLY et al., 1996; MÜLLER et al., 1996; PAYNE; ELLIS, 1996; YAMAGE et al., 1996; ELLIS et al., 1998, 1999; GOTTSTEIN et al., 1998; BASZLER et al., 1999; PITEL et al., 2001; SAGER et al., 2001; KIM et al., 2002; PEREIRA-BUENO et al., 2003; COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2002, 2006a; MEDINA et al., 2006; GIBNEY et al., 2007; LÓPEZ-GATIUS et al., 2007; REITT et al., 2007; SADREBAZZAZ et al., 2007; MOORE et al., 2008; REGIDOR-CERRILLO et al., 2008; SÁNCHEZ et al., 2009; YAO et al., 2009).

Baszler et al. (1999); Sager et al. (2001) e Pereira-Bueno et al. (2003) sugeriram que a histopatologia poderia aumentar a sensibilidade da PCR pela seleção de áreas com danos teciduais a serem examinadas.

Medina et al. (2006) e López-Gatius et al. (2007) comprovaram a maior sensibilidade da PCR em relação a histopatologia na análise de amostras cerebrais de fetos abortados já autolizadas.

Gottstein et al. (1998); Ellis (1998); Baszler et al. (1999); Sager et al. (2001); Collantes-Fernandez et al. (2002); Pereira-Bueno et al. (2003); López-Gatius et al. (2007) e Razmi et al. (2010) mostraram uma fraca concordância entre PCR e imunoistoquímica, pois o DNA de *N. caninum* foi detectado em diversas amostras cerebrais sem identificação do parasito.

Reitt et al. (2007) mostraram que cistos e taquizoítos foram raramente identificados em cérebros fetais pela imunoistoquímica e foram vistos somente em fetos examinados logo após o aborto. Comumente, os tecidos examinados estavam autolizados, o que pode ter degradado os epítomos e dificultando a identificação do parasito. Todos os fetos mumificados foram negativos, embora o DNA de *N. caninum* tenha sido detectado através da PCR em diversos casos. Placentas examinadas estavam menos autolizadas e grupos de taquizoítos puderam ser detectados pela PCR e imunoistoquímica. Ao contrário da proteína, DNA é mais resistente à lise, o que contribui para a alta sensibilidade dos testes de PCR em tecidos fetais com lesões histológicas. O tempo de preservação e o modo de preservação das amostras (formalina ou parafina) não influenciaram no resultado da PCR.

A falha na detecção da infecção por *N. caninum* pela PCR pode ser resultado da distribuição focal do parasito, baixo número de parasitos e metodologia de amostragem (GOTTSTEIN et al., 1998; BASZLER et al., 1999; PEREIRA-BUENO et al., 2003; COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006a,b). Baszler et al. (1999) sugeriram que pelo menos 20 a 40 taquizoítos em 20mg de tecido são necessários para que o PCR possa detectar o parasito nas amostras clínicas de *N. caninum*.

1.9.4 Isolamento

Cultura de células e inoculação em cobaias pode ser usada para recuperar *N. caninum* de tecidos animais (DUBEY et al., 1988b). Entretanto, a taxa de sucesso é muito baixa porque a maioria dos parasitos morre no tecido fetal quando este sucumbe à infecção (CONRAD et al., 1993a). É mais fácil isolar *N. caninum* de tecidos neurais de bezerros nascidos e infectados congenitamente porque cistos teciduais são mais prováveis de estarem presentes e são mais resistentes às autólices que os taquizoítos (DUBEY, 2003).

Numerosas linhagens de células de mamíferos são usadas para crescimento de *N. caninum* em cultura de células (DUBEY; LINDSAY, 1996). O parasito foi inicialmente cultivado *in vitro* em monócitos de bovinos e células endoteliais da artéria cardio-vascular de bovinos (LINDSAY; DUBEY, 1989c). Somente taquizoítos são identificados em células cultivadas, e estes organismos são infectantes para os animais. Embora a maioria dos estudos utilizasse células VERO no cultivo, *N. caninum* parece não ter preferência por um tipo de

célula (LEI et al., 2005). As culturas de células devem ser examinadas por dois meses, pois *N. caninum* tem crescimento lento e taquizoítos podem não ser visíveis microscopicamente.

A inoculação de camundongos imunossuprimidos é mais eficiente que a inoculação direta de tecidos infectados em cultura de células para o isolamento de *N. caninum*. Camundongos imunocomprometidos quimicamente, atímicos ou IFN γ *knockout* são usados para isolar *N. caninum* (LINDSAY; DUBEY, 1989b; LINDSAY et al., 1995a; LONG; BASZLER, 1996; LONG et al., 1998; DUBEY et al., 1998b; YAMANE et al., 1998; SHIBAHARA et al., 1999; PIERGILI FIORETTI et al., 2000; MILLER et al., 2002; CANADA et al., 2004). Inoculação em camundongos também pode ser usada para caracterizar a virulência dos isolados de *N. caninum* (ATKINSON et al., 1999; QUINN et al., 2002).

Gerbilos (*Meriones unguiculatus*) foram demonstrados como alternativa para isolar *N. caninum* (DUBEY; LINDSAY, 2000; DUBEY et al., 2004; RAMAMOORTHY et al., 2005; KANG et al., 2009) bem como para determinar a eficácia de vacinas (CHO et al. 2005). Gerbilos são altamente suscetíveis à neosporose seguido da inoculação por de oocistos (DUBEY; LINDSAY, 2000), taquizoítos (CUDDON et al., 1992; GONDIM et al., 1999b, 2001) e cistos teciduais (DUBEY et al., 2004). Outra espécie de gerbilo, *Meriones tristrami*, e o rato de areia, *Psammomys ulesus*, também são considerados suscetíveis à infecção com taquizoítos de *N. caninum* (PIPANO et al., 2002).

1.10 Tratamento e Controle

Programas de controle devem incorporar um cálculo de custo-benefício comparando as despesas com a realização de testes diagnósticos e das medidas de controle com o benefício da redução das perdas econômicas devidas à infecção ou abortamentos associados ao *N. caninum* (BARTELS et al., 2006; HÄSLER et al., 2006b,c; LARSON et al., 2004; REICHEL; ELLIS, 2006). Como neosporose não é considerada uma zoonose, nenhuma medida é recomendada do ponto de vista de saúde pública.

Como *N. caninum* é eficientemente transmitido verticalmente em bovinos, algumas vezes por diversas gerações, o abate seletivo dos animais soropositivos pode ser um modo apropriado para controlar a perpetuação da infecção no rebanho (THURMON; HIETALA, 1995, 1996; FRENCH et al., 1999). Entretanto, o abate de bovinos soropositivos pode ser

economicamente inviável, pois a ocorrência de animais soropositivos no rebanho pode estar elevada e a maioria dos animais soropositivos não sofre abortamento, não causando prejuízo econômico.

Outra prática seria impedir a entrada de animais infectados por *N. caninum* no rebanho através de uma triagem sorológica dos bovinos a serem comprados. Triagem das novilhas de reposição do rebanho pode ser feita para descartar os animais soropositivos com o intuito de diminuir a taxa de abortamento e da transmissão vertical.

Manejos reprodutivos foram propostos para reduzir as chances e o impacto econômico da transmissão transplacentária endógenos no rebanho. A transferência de embriões poderia ser utilizada em vacas infectadas por *N. caninum* para receptoras não infectadas que gerariam bezerros livres da infecção (BAILLARGEON et al., 2001; LANDAMNN et al., 2002; MOSKWA et al., 2008)

Uso de raças bovinas mais resistentes a infecção ou com menor risco de abortamento por *N. caninum* foram sugeridos como alternativa para serem usadas na inseminação das vacas soropositivas com problemas de abortamento. López-Gatius et al. (2005b,c) e Almería et al. (2009a) demonstraram que o uso de sêmen de touros de corte reduz o risco de abortamento em vacas leiteiras soropositivas para *N. caninum* quando comparado ao sêmen de touros leiteiros. Almería et al. (2009a) relataram que o uso de sêmen de touros da raça Limousin em vacas infectadas por *N. caninum* levou a um menor risco de abortamento. Entretanto, Pan et al. (2004) sugeriram que a redução da incidência da infecção por *N. caninum* deveria ter mais ênfase nas práticas de manejo do que na seleção genética.

Diminuição do número de abortamentos por neosporose nas vacas infectadas persistentemente por *N. caninum* pode ser alcançada através da redução do estresse pela adoção de manejo nutricional, sanitário, reprodutivo e de condições ambientais adequados à criação destes animais.

Medida preventiva para evitar a infecção dos bovinos com oocistos esporulados de *N. caninum* seria impedir a presença de canídeos, domésticos e silvestres, nas propriedades. Deve ser impedido o acesso dos cães no ambiente de criação dos bovinos, para evitar a contaminação de cochos de alimentação, bebedouros, pastagens e dos alimentos estocados. Carcaças de animais mortos, fetos e placentas devem ser enterrados ou incinerados para evitar que sejam ingeridos pelos canídeos. Cães não devem ser alimentados com carne crua de bovinos ou de outros animais, que poderiam ser hospedeiros intermediários do *N. caninum*.

Atualmente, não existe tratamento quimioterápico eficaz e seguro contra *N. caninum*. Toltrazuril exibe uma atividade contra coccídios formadores e não-formadores de cistos

(HABERKORN, 1996). O efeito do toltrazuril na sobrevivência do parasito, após um longo tempo de tratamento em cultura de células, revelou uma atividade parasiticida iniciando após 14 dias de tratamento contínuo (STROHBUSCH et al., 2008). Em camundongos infectados experimentalmente com *N. caninum*, tratamento com toltrazuril preveniu sinais clínicos severos e formação de lesões cerebrais (GOTTSTEIN et al., 2001; DARIUS et al., 2004a,b; STROHBUSCH et al., 2009). Toltrazuril foi eficaz no bloqueio da transmissão transplacentária em camundongos (GOTTSTEIN et al., 2005). Haerdi et al. (2006) trataram bezerros infectados congenitamente com toltrazuril dentro do período de sete dias após o nascimento e demonstraram uma eficácia do tratamento pela forte resposta humoral desenvolvida pelos bezerros tratados entre o 4º e 6º mês de idade.

Imunidade em vacas naturalmente infectadas é, na maioria dos casos, insuficiente para prevenir infecção fetal durante uma gestação. Isto sugere que o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra *N. caninum* para prevenir uma infecção congênita pode ser difícil de ser atingida. Atualmente, não há vacina disponível que impeça a transmissão vertical e o abortamento causado por *N. caninum* em bovinos.

Modelos experimentais, usando camundongos para estudo de desenvolvimento de vacinas contra neosporose, oferecem um sistema econômico e convincente. Taquizoítos atenuados (BARTLEY et al., 2007), doses subletais de taquizoítos vivos (LUNDÉN et al., 2002) e taquizoítos vivos irradiados (RAMAMOORTHY et al., 2006) induziram proteção contra sinais clínicos severos em camundongos desafiados com *N. caninum*.

Estudos usando antígenos recombinantes expressos em *Escherichia coli* (CANNAS et al. 2003a,b; ALAEDDINE et al., 2005; PINITKIATISAKUL et al., 2005, 2007; DEBACHE et al., 2009, 2010) e em vírus-vetor (NISHIKAWA et al., 2001a,b; JENKINS et al., 2004) também induziram proteção em camundongos desafiados com *N. caninum*. Entretanto, Baszler et al. (2000) demonstraram uma exacerbação da doença neurológica em camundongos imunizados com antígenos solúveis de taquizoítos de *N. caninum* e que foram desafiados com o parasito.

Vacinação de camundongos antes da gestação com taquizoítos de *N. caninum* mortos (LIDDELL et al., 1999); vivos (MILER et al., 2005) ou antígenos recombinantes (NISHIKAWA et al., 2001a,b; LIDDELL et al., 2003; JENKINS et al., 2004; HALDORSON et al., 2005; DEBACHE et al., 2009) bloquearam a transferência transplacentária quando desafiados durante a gestação.

Expressão de antígenos de *N. caninum* na cepa vacinal RB51 de *Brucella abortus* e subsequente imunização de camundongos resultou na proteção contra doença aguda induzida

experimentalmente (RAMAMOORTHY et al., 2007a; VEMULAPALI et al., 2007) e contra a transmissão vertical (RAMAMOORTHY et al., 2007b).

Choromanski e Block (2000) investigaram a segurança e uma potencial resposta imune de uma vacina experimental com antígenos de *N. caninum* inativados em novilhas e mostraram um aumento do título de anticorpos após 14 dias da vacinação. Andrianarivo et al. (2000) mostraram que vacas gestantes vacinadas com taquizoítos mortos de *N. caninum* misturados com o adjuvante polygen e mais tarde desafiadas com taquizoítos vivos de *N. caninum* não preveniram abortamentos ou transmissão congênita do parasito.

Romero et al. (2004) realizaram um estudo com a vacina contra neosporose disponível comercialmente sobre condições de campo e demonstraram uma redução na taxa de aborto nos bovinos vacinados, embora a causa dos abortamentos e os efeitos dos adjuvantes presentes na composição da vacina não foram determinados.

O’Handley et al. (2003) obtiveram estímulo da resposta imune e proteção parcial contra a transmissão vertical em ovinos vacinados com taquizoítos mortos de *N. caninum*. Ovinos vacinados com taquizoítos mortos de *N. caninum* apresentaram proteção contra perda fetal, mas nenhum efeito na transmissão fetal (JENKINS et al., 2004).

2 OBJETIVOS

O objetivo desta tese foi estudar aspectos da epidemiologia do *N. caninum* em bovinos leiteiros de três rebanhos da região do Vale do Paraíba Paulista. Para tanto se realizou um estudo longitudinal prospectivo que visou determinar:

- As taxas de transmissão vertical e horizontal da infecção por *N. caninum*, através da análise do status sorológico dos pares mães-filhas e das soroconversões respectivamente (Experimento 1);
- O risco relativo de abortamento e de descarte de vacas soropositivas para *N. caninum* em relação aos negativos (Experimento 2);
- Avaliar a idade gestacional média na data do abortamento, repetição de abortamento, número de serviços por gestação e intervalo entre partos nas vacas soropositivas e negativas para *N. caninum* (Experimento 2);
- Avaliar o perfil sorológico dos anticorpos anti-*N. caninum*, adquiridos passivamente pela ingestão de colostro, em bezerros (Experimento 3);
- Avaliar a dinâmica de anticorpos anti-*N. caninum* durante a gestação em vacas soropositivas (Experimento 4).

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS EXPERIMENTOS REALIZADOS

Para alcançar os objetivos propostos, esta tese foi dividida em quatro experimentos, que serão apresentados separadamente, como:

- . Experimento 1 - “*Neospora caninum*: estudos das diferentes vias de transmissão e da taxa de descarte em bovinos leiteiros”
- . Experimento 2 - “*Neospora caninum*: análise dos índices reprodutivos em rebanhos leiteiros”
- . Experimento 3 - “Perfil sorológico dos anticorpos colostrais para *Neospora caninum* em bezerros livres da infecção”
- . Experimento 4 - “Dinâmica de anticorpos durante a gestação em vacas naturalmente infectadas com *Neospora caninum* de quatro rebanhos leiteiros no Brasil”

Os experimentos 1 e 2 ainda não foram publicados. O experimento 3 e 4 serão apresentados conforme publicados no Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. Os trabalhos originais, conforme publicados encontram-se nos anexos A e B.

3.1 EXPERIMENTO 1 - *Neospora caninum*: estudos das diferentes vias de transmissão e da taxa de descarte em bovinos leiteiros

3.1.1 Introdução

Neospora caninum é um parasito protozoário apicomplexa que causa doença neuromuscular em cães e é uma das mais importantes causas de abortamentos em bovinos leiteiros e de corte em diferentes países (DUBEY; LINDSAY, 1996; DUBEY et al., 2007).

Transmissão transplacentária é considerada a mais importante via de infecção de *N. caninum* em bovinos. Estudos sorológicos, usando amostras de sangue pré-colostral, mostraram que 81 a 95% das vacas positivas a *N. caninum* transmitem o parasito para seus descendentes, podendo este fato ser observado em consecutivas gestações (BARR et al., 1993; PARÉ et al., 1996, 1997; WOUDA et al., 1998; DAVISON et al., 1999b; HIETALA; THURMOND, 1999; WALDNER et al., 1999, 2001a; DIJKSTRA et al., 2001a).

Cães, coiotes, raposas e dingos já foram confirmados como hospedeiros definitivos e intermediários do *N. caninum* (MCALLISTER et al., 1998; GONDIM et al., 2004b; WAPENAAR et al., 2006; KING et al., 2010). Bovinos são os mais importantes hospedeiros intermediários e, para esta espécie, uma das formas de infecção é pela ingestão de oocistos, que são eliminados pelos hospedeiros definitivos.

Presença de cães em fazendas mostrou ser um fator de risco para a ocorrência da transmissão horizontal do *N. caninum* em bovinos (PARÉ et al., 1998; SAWADA et al., 1998; WOUDA et al., 1999b; DE SOUZA et al., 2002; DIJKSTRA et al., 2002a,c; GUIMARÃES JR. et al., 2004; CORBELLINI et al., 2006b). Apesar da ampla ocorrência de canídeos, domésticos e silvestres na maioria dos rebanhos, um baixo nível de infecção pós-natal, menor que 8,5%, foi relatado em bovinos (PARÉ et al., 1997; WALDNER et al., 1998; DAVISON et al., 1999b; HIETALA; THURMOND, 1999; DIJKSTRA et al., 2003).

Associação entre o risco de descarte de um animal soroposito para *N. caninum* em relação aos soronegativos foram relatados por Thurmond e Hietala (1996); Waldner et al. (1998); Hobson et al. (2005) e Bartels et al. (2006). Entretanto, esta associação não foi encontrada nos estudos de Pfeiffer et al. (2002); Cramer et al. (2002) e Tiwari et al. (2005).

Os objetivos deste estudo foram determinar a prevalência, a taxa de transmissão vertical e horizontal e o risco de descarte de bovinos soropositivos para *N. caninum* em três rebanhos leiteiros.

3.1.2 Material e métodos

3.1.2.1 Bovinos e manejo do rebanho

Um estudo longitudinal prospectivo foi conduzido em três rebanhos leiteiros, designados, neste estudo como: Fazenda I, Fazenda II e Fazenda III, localizados, respectivamente, nos municípios de Caçapava, Pindamonhangaba e Lagoinha, Vale do Paraíba Paulista. Os rebanhos foram selecionados e incluídos no estudo por apresentarem pelo menos um bovino soropositivo a anticorpos anti-*N. caninum* na primeira amostragem e por possuírem um sistema de registro de dados zootécnicos de cada animal da propriedade.

As Fazendas I, II e III possuem 600 ha, 360 ha e 120 ha de área territorial, respectivamente e produção leiteira como atividade principal. Todas as fazendas selecionadas para este estudo tinham um sistema de produção e manejo similares. Os bovinos eram da raça holandesa e criados em sistema semi-intensivo. Os bezerros recém-nascidos receberam colostro de suas respectivas mães dentro de poucas horas após o parto e a separação mãe-cria ocorreu após 12 horas do nascimento. Todos os bezerros recém-nascidos machos eram descartados do rebanho um dia após o nascimento. As bezerras eram mantidas em baias individuais até o desmame, que ocorreu ao redor de dois meses de idade. Bezerras mais jovens que quatro meses eram mantidas em baias coletivas e as com mais de quatro meses, além das novilhas e das vacas secas e lactantes, eram mantidas à pasto.

Concentrado e suplemento mineral foram oferecidos de acordo com o lote animal e produção leiteira. Na estação chuvosa, capim, produzido nas próprias fazendas, foi colhido, picado e oferecido no cocho de alimentação. Na estação seca, os bovinos foram alimentados com silagem de milho, também produzida e estocada nas fazendas. Todas as vacas foram inseminadas artificialmente. Diagnósticos de gestação foram realizados no dia 40 após a inseminação por palpação retal. As vacas e novilhas pariram por todo o ano e eram ordenhadas duas vezes ao dia. Todas as vacas estavam livres de tuberculose e brucelose e

vacinadas contras as principais doenças de bovinos. Pássaros, galinhas, roedores, cães, gatos e animais silvestres, quando presentes, tinham livre acesso aos estábulos e pastagens.

3.1.2.2 Colheitas das amostras de sangue e sorologia

As colheitas das amostras de sangue foram realizadas trimestralmente no período de dois anos, totalizando nove colheitas por fazenda. Amostras de sangue, para a obtenção de soro, foram colhidas através da veia coccígena ou jugular de todos os bovinos presentes no rebanho, em cada uma das visitas. Não foi possível colher amostras de sangue pré-colostral dos bezerros recém-nascidos.

Os soros foram testados para a presença de anticorpos contra *N. caninum* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) usando taquizoítos íntegros de cultura de células (cepa NC-1) como antígeno e diluídos em solução tampão 1:100 (DUBEY et al., 1988b). Em todas as lâminas, controles positivos e negativos foram selecionados e considerou-se amostra positiva aquela que apresentou fluorescência total dos taquizoítos.

3.1.2.3 Análises Estatísticas

A prevalência da infecção por *N. caninum* nos rebanhos foi definida como o número de animais soropositivos divididos pelo total de animais testados em cada uma das colheitas. Para minimizar o impacto dos resultados falso-positivos e falso-negativos, os animais foram classificados como soropositivos se as duas primeiras amostras de sangue eram positivas e foram considerados soronegativos se as duas primeiras amostras de sangue eram negativas. Bezerras nascidas durante o estudo foram definidas como soropositivas quando a mãe era *N. caninum*-soropositiva e as duas primeiras amostras de sangue eram positivas e consideradas negativas quando a mãe era *N. caninum*-soronegativa e as duas primeiras amostras de sangue eram negativas.

Todas as relações mãe-filhas foram registradas. A eficiência da transmissão vertical foi estimada como a proporção de filhas soropositivas nascidas de vacas soropositivas

(bezerro soropositivo / vaca soropositiva x 100). A associação entre o status sorológico da vaca e de seus descendentes foi medida e comparada usando tabelas 2 x 2 e teste χ^2 .

Designou-se como soroconversão quando um animal classificado como soronegativo ou soropositivo para *N. caninum* tiveram, respectivamente, duas amostragens consecutivas soropositivas ou soronegativas. Taxa de soroconversão e descarte foi expressa por 100 vacas ano em risco (THRUSFELD, 1997). Diferenças na taxa de soroconversão de negativo para positivo e/ou positivo para negativo e de descarte foram avaliadas pela comparação de duas proporções independentes. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $P < 0,05$. Análise estatística foi realizada usando o programa EPIDAT (Organización Panamericana de la Salud, USA).

3.1.3 Resultados

3.1.3.1 Soroprevalência

Um total de 2.750 amostras de sangue de 466 animais foram incluídas na análise da Fazenda I e a porcentagem de amostras *N. caninum*-positivas em cada período de amostragem variou de 3,32 à 11,71% (Tabela 1). Um total de 1.291 amostras de sangue de 213 fêmeas foram incluídas na análise da Fazenda II com porcentagem de amostras soropositivas em cada amostragem variando de 3,90 à 22,06% (Tabela 2). Na Fazenda III, um total de 2.154 amostras de sangue de 348 fêmeas foi incluído na análise e a porcentagem variou de 28,57 a 37,10% (Tabela 3).

Tabela 1 - Soroprevalência a anticorpos anti-*Neospora caninum* na Fazenda I nas bezerras (≤ 12 meses); novilhas ($>12 \leq 24$ meses) e vacas (>24 meses) nas diferentes amostragens (março de 2004 a março de 2006)

Amostragem	Nº. de positivos / Nº. de amostrados (%)			
	Bezerra	Novilha	Vaca	Total
1	6/61 (9,84)	11/58 (18,97)	18/180 (10,00)	35/299 (11,71)
2	9/72 (12,50)	10/51 (19,61)	13/188 (6,91)	32/311 (10,29)
3	3/80 (3,75)	4/59 (6,78)	11/179 (6,15)	18/318 (5,66)
4	4/82 (4,88)	4/61 (6,56)	13/165 (7,88)	21/308 (6,82)
5	2/63 (3,17)	2/65 (3,08)	6/161 (3,73)	10/289 (3,46)
6	3/70 (4,29)	2/68 (2,94)	9/165 (5,45)	14/303 (4,62)
7	2/64 (3,13)	4/67 (5,97)	9/175 (5,14)	15/306 (4,90)
8	3/81 (3,70)	2/63 (3,17)	7/171 (4,09)	12/315 (3,81)
9	1/63 (1,59)	2/60 (3,33)	7/178 (3,93)	10/301 (3,32)

Tabela 2 - Soroprevalência a anticorpos anti-*Neospora caninum* na Fazenda II nas bezerras (≤ 12 meses); novilhas ($>12 \leq 24$ meses) e vacas (>24 meses) nas diferentes amostragens (março de 2004 a março de 2006)

Amostragem	Nº. de positivos / Nº. de amostrados (%)			
	Bezerra	Novilha	Vaca	Total
1	1/24 (4,17)	0/34 (0,00)	5/96 (5,21)	6/154 (3,90)
2	8/31 (25,81)	1/33 (3,03)	19/96 (19,79)	28/160 (17,50)
3	5/31 (16,13)	0/19 (0,00)	10/95 (10,53)	15/145 (10,34)
4	7/30 (23,33)	2/18 (11,11)	20/94 (21,28)	29/142 (20,42)
5	2/28 (7,14)	4/20 (20,00)	18/95 (18,95)	24/143 (16,78)
6	5/29 (17,24)	7/23 (30,43)	16/89 (17,98)	28/141 (19,86)
7	6/26 (23,08)	6/26 (23,08)	18/84 (21,43)	30/136 (22,06)
8	5/23 (21,74)	6/25 (24,00)	13/88 (14,77)	24/136 (17,65)
9	5/23 (21,74)	2/23 (8,70)	16/88 (18,18)	23/134 (17,16)

Tabela 3 - Soroprevalência a anticorpos anti-*Neospora caninum* na Fazenda III nas bezerras (≤ 12 meses); novilhas ($>12 \leq 24$ meses) e vacas (>24 meses) nas diferentes amostragens (março de 2004 a março de 2006)

Amostragem	Nº. de positivos / Nº. de amostrados (%)			
	Bezerra	Novilha	Vaca	Total
1	16/42 (38,10)	12/29 (41,38)	54/150 (36,00)	82/221 (37,10)
2	10/41 (24,39)	12/38 (31,58)	48/144 (33,33)	70/223 (32,95)
3	15/53 (28,30)	8/35 (22,86)	50/150 (33,33)	73/238 (32,25)
4	16/66 (24,24)	9/37 (24,32)	41/146 (28,08)	66/249 (28,57)
5	12/63 (19,05)	13/38 (34,21)	49/155 (31,61)	74/256 (32,32)
6	9/54 (16,67)	9/43 (20,93)	56/163 (34,36)	74/260 (31,95)
7	13/40 (32,50)	12/37 (32,43)	54/159 (33,96)	79/236 (35,29)
8	18/50 (36,00)	13/42 (30,95)	54/156 (34,62)	85/248 (35,77)
9	13/47 (27,66)	9/36 (25,00)	52/140 (37,14)	74/223 (34,67)

O número de reações sorológicas positivas para o mesmo animal variou em relação ao número de amostragens desse animal conforme apresentado na tabela 4. Na Fazenda I, II e III encontrou-se 87,44%, 75,12% e 59,77% de animais soronegativos em todas as colheitas, respectivamente. Em relação aos soropositivos, em todas as colheitas, os valores foram de 3,22%, 4,23% e 23,85%, respectivamente. Em todas as propriedades, alguns animais apresentaram resultados sorológicos variáveis durante as nove colheitas.

Table 4 - Porcentagem de amostras soropositivas a anticorpos anti-*N. caninum* segundo o número de amostras colhidas para cada um dos animais das Fazendas I, II e III

Nº. de amostras colhidas por animal	Fazenda I												Fazenda II												Fazenda III																		
	N	% de animais positivos											N	% de animais positivos											N	% de animais positivos																	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0		1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1		2	3	4	5	6	7	8	9										
1	33	100	0									12	83	17									30	57	43																		
2	55	89	4	7								30	87	3	10								37	70	8	22																	
3	52	94	4	0	2							20	80	15	5	0							30	43	7	7	43																
4	32	91	0	0	0	9						14	57	7	22	14	0						10	50	10	10	0	30															
5	33	97	0	0	0	3	0					14	71	22	0	0	0	7					22	68	5	4	0	9	14														
6	23	87	13	0	0	0	0	0				14	100	0	0	0	0	0	0				24	54	0	13	8	0	0	25													
7	44	91	5	0	4	0	0	0	0			10	70	10	0	0	0	10	0	10			22	68	0	0	0	5	4	9	14												
8	34	76	9	6	6	0	0	0	0	3		12	67	9	8	0	0	0	8	0	8		43	63	3	2	7	2	2	0	5	16											
9	160	81	9	2	0	2	0	1	1	0	4	87	70	4	5	1	1	1	1	9	7	1	130	59	3	2	1	2	2	2	2	2	6	21									

N = Número de animais amostrados

3.1.3.2 Transmissão Vertical

Em todos os rebanhos houve associação ($P<0,05$) entre o status sorológico dos pares mãe e filha. A transmissão vertical na Fazenda I foi de 50% (3/6), na Fazenda II foi de 83,33% (5/6) e na Fazenda III foi de 83,33% (20/24). Em relação às fêmeas negativas que tiveram filhas negativas a porcentagem foi de 100% (111/111); 96,77% (30/31) e 95,89% (70/73), respectivamente nas Fazendas I, II e III. Não foram encontradas associação entre idade e taxa de infecção congênita ($P<0,05$).

3.1.3.3 Soroconversões

A taxa de soroconversão foi estimada em 0,37% (95% IC: 0.01-2.05%); 3,00% (95% IC: 0.83-7.52%) e 6,94% (95% IC: 2.86-11.01%) por 100 vacas ano nas Fazendas I, II e III, respectivamente. A idade média de soroconversão foi de 2,67 anos, variando de 1,75 a 4,38 anos na Fazenda II e de 2,27 anos, variando de 1,09 a 5,66 anos na Fazenda III. Somente um animal soroconverteu na Fazenda I e tinha 4,98 anos. Todos os bovinos que soroconverteram permaneceram positivos por todo o período de estudo.

Em relação aos animais positivos que se tornaram negativos a taxa estimada foi de 31,58% (95% IC: 12,58-56,56%) e 11,11% (95% IC: 2,56-19,67%) por 100 vacas ano na Fazenda I e III, respectivamente. Nenhum animal positivo tornou-se negativo na Fazenda II. A idade média de conversão de soropositivo para negativo foi de 2,61 anos (variando de 1,37 a 4,54 anos) e 4,25 anos (variando de 0,59 a 10,92 anos) nas Fazendas I e III, respectivamente. Entretanto, três dos sete animais que se tornaram negativos na Fazenda III retornaram a condição de positivo. Dois destes três animais tiveram resultados soronegativos por seis meses e o terceiro manteve-se soronegativo por nove meses. Dois destes três animais estavam gestantes durante o período de mudança da situação sorológica.

3.1.3.4 Descarte

A decisão de descarte das vacas foi feita pelos proprietários sem conhecimento do estatus sorológico para infecção por *N. caninum*. Os animais foram descartados por uma variedade de razões que incluíram: venda por motivos financeiros, idade avançada, problemas estruturais (laminite e queda de úbere), problemas reprodutivos e baixo desempenho produtivo.

A proporção de descarte dos bovinos *N. caninum*-soropositivos e soronegativos por 100 vacas ano foram, respectivamente, 22,22% e 23,60% na Fazenda I; 11,77% e 15,24% na Fazenda II; 32,97% e 23,21% na Fazenda III. A idade média no descarte dos animais soropositivos e soronegativos foram, respectivamente, 4,69 anos (variação de 3,29 a 9,14 anos) e 4,83 anos (variação de 0,57 to 9,87 anos) na Fazenda I; 4,68 anos (variação de 0,67 a 9,75 anos) e 4,29 anos (variação de 0,71 a 11,66 anos) na Fazenda II; 5,17 anos (variação de 0,69 a 10,68 anos) e 5,58 anos (variação de 0,66 a 15,39 anos) na Fazenda III. Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) na taxa de descarte dos bovinos soropositivos em relação aos soronegativos em nenhum dos rebanhos.

3.1.4 Discussão

Houve uma grande variação da prevalência da infecção por *N. caninum* nos rebanhos analisados. Aumento ou diminuição da prevalência dentro de cada um dos rebanhos foi observado durante o estudo nas diferentes classes de bovinos. Estes resultados foram similares aos trabalhos anteriormente publicados no Brasil, nos quais a prevalência nos rebanhos bovinos variou de 0,00 a 91,20% (GONDIM et al., 1999a; CORBELLINI et al., 2002, 2006a; DE MELO et al., 2001, 2004; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2001; ANDREOTTI et al., 2004; GUIMARÃES JR et al., 2004; OGAWA et al., 2005; AGUIAR et al., 2006; MELO et al., 2006; MINEO et al., 2006; MINERVINO et al., 2008; MUNHOZ et al., 2006; SANTOS et al., 2006; VOGEL et al., 2006; OSHIRO et al., 2007; BENETTI et al., 2009; GUEDES et al., 2009).

As altas taxas de transmissão vertical de *N. caninum* nas Fazendas II e III, ambas de 83,33%, são similares as taxas encontradas por outros autores (BARR et al., 1993; PARÉ et

al., 1996, 1997; WOUDA et al., 1998; DAVISON et al., 1999b; HIETALA; THURMOND, 1999; WALDNER et al., 1999, 2001a; DIJKSTRA et al., 2001a), confirmando a importância dessa via de transmissão.

A taxa de transmissão vertical de 50% na Fazenda II é considerada baixa e valores baixos já foram observados em outros estudos (MAINAR-JAIME et al. 1999; DYER et al., 2000; BERGERON et al., 2000; ATKINSON et al., 2000; DIJKSTRA et al., 2003; ROMERO; FRANKENA, 2003; PAN et al., 2004; BARTELS et al., 2007; CHANLUN et al., 2007; DIJKSTRA et al., 2008; MOREÉ et al., 2009, 2010). Parte destas diferenças do soroestatus dos pares mãe-filha pode ser devido a infecção pós-natal da filha ou da mãe após o parto ou consequência de resultados falso-positivos ou negativos dos testes empregados.

Alguns autores sugeriram que vacas soronegativas que tiveram bezerras soropositivas podem ser imunotolerantes à infecção por *N. caninum*, isto é, estas vacas abrigariam e transmitiriam o parasito sem produzir anticorpos (DAVISON et al., 1999a; PITEL et al., 2001; SAGER et al., 2001; HÄSLER et al., 2006).

Bergeron et al. (2000) e Chanlun et al., (2007) sugeriram que diferenças entre as taxas de transmissão vertical podem ser explicadas pela variação da prevalência de animais soropositivos no rebanho. A alta correlação entre a taxa de transmissão vertical e a prevalência de animais soropositivos nas Fazendas II e III, confirma que em rebanhos com alta prevalência os níveis de transmissão vertical também são elevados. Uma alta soroprevalência num rebanho pode refletir uma infecção por um isolado mais ativo, aumentando assim a taxa de transmissão vertical.

A sensibilidade e especificidade do teste empregado juntamente com a ocorrência da infecção no rebanho podem influenciar o número de falso-positivos e negativos, devendo ser considerados na interpretação das análises de rebanhos. Em rebanhos de baixa prevalência, como na Fazenda I, o valor preditivo positivo, isto é, número de animais positivos que realmente são positivos, é baixo e o aparecimento de animais falso-positivo é maior, podendo gerar diferenças no soroestatus dos pares mãe-filha. Assim sendo, a taxa de transmissão vertical em rebanhos de alta prevalência são mais confiáveis que naqueles de baixa prevalência.

As diferenças nas taxas de transmissão vertical de *N. caninum* neste estudo podem também terem sido influenciadas pelos diferentes tipos de manejo e por fatores ambientais distintos em cada uma das fazendas, tais como: área da propriedade, tamanho do rebanho, clima e nível de produção, que podem acarretar recrudescência da infecção latente, afetando a taxa de transmissão vertical do coccídio devido a fatores estressantes, como observado em

outros estudos (BARTELS et al., 1999; WOUDA et al., 1999a; BARLING et al., 2000b; SANDERSON et al., 2000; DE MELO et al., 2001; PITEL et al., 2001; SCHARES et al., 2003, 2004; OTRANTO et al., 2003; SCHARES et al., 2003, 2004; ANDREOTTI et al., 2004; RINALDI et al., 2005; LOPES-GATIUS et al., 2005a; CORBELLINI et al., 2006b; GUEDES et al., 2008).

Neste estudo, associação entre idade e taxa de infecção congênita não foi observada, como relatado por Paré et al. (1996). Entretanto, Dijkstra et al. (2003) sugeriram que a proporção de infecção congênita diminui com o aumento do número de partos possivelmente devido ao aumento da imunidade com a idade.

Pfeiffer et al. (2002) mostraram que o número de reações positivas aumentou com o número de amostras analisadas do mesmo animal em tempos diferentes. No presente estudo, o número de reações sorológicas positivas não apresentou associação com o número de amostras colhidas do mesmo animal. Um grande número de animais teve até nove colheitas realizadas e analisadas. Destas, uma proporção apresentou resultados transitórios, isto é, positivos ou negativos em uma ou mais amostras não consecutivas, não caracterizando mudança no estatus sorológico. Estes achados, também já descritos em outros estudos (DANNATT et al., 1998; HIETALA; THURMOND, 1999; PEREIRA BUENO et al., 2000; SAGER et al., 2001; PFEIFFER et al., 2002; STENLUND et al., 2003; CHANLUN et al., 2007; DIJKSTRA et al., 2008; GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2008), apontam o cuidado que se deve ter ao analisar amostras isoladas de um único animal.

As baixas taxas de soroconversão encontradas neste estudo são consistentes com outros estudos longitudinais, onde taxas menores que 8% foram observadas (PARÉ et al., 1997; WALDNER et al., 1998; DAVISON et al., 1999b; HIETALA; THURMOND, 1999; DIJKSTRA et al., 2003; PAN et al., 2004; BARTELS et al., 2006; CHANLUN et al., 2007).

Taxas de conversão soronegativa nas Fazendas I e III são similares a valores mostrados em outros estudos (DIJKSTRA et al., 2002b; PFEIFFER et al., 2002; WALDNER et al., 2001a; BJÖRKMAN et al., 2003; MORÉ et al., 2010). Estes autores sugeriram que a maioria das conversões negativas pode ter ocorrido devido aos falso-negativos do teste empregado ou da diminuição dos anticorpos colostrais anti-*N. caninum* adquiridos pelos bezerros não infectados congenitamente.

Estudos em bovinos infectados experimentalmente e naturalmente mostraram que os níveis de anticorpos podem flutuar, especialmente durante a gestação e, algumas vezes, ficarem abaixo do ponto de corte do teste sorológico utilizado (STENLUND et al., 1999; GUY et al., 2001; SAGER et al., 2001; MALEY et al., 2001; TREES et al., 2002). Esta

hipótese pode explicar a mudança da condição de soropositivo para negativo em dois dos três animais da Fazenda III durante o período de gestação. Um destes três animais soropositivos que tiveram um período de resultados negativos tinha aproximadamente um ano de idade e não estando gestante. Entretanto tal fato, apesar de raro, também já foi observado por Hietala e Thurmond (1999).

Apesar de vários estudos (THURMOND; HIETALA, 1996; WALDNER et al., 1998; HOBSON et al., 2005; BARTELS et al., 2006) mostrarem que bovinos *N. caninum*-soropositivos foram mais prováveis de serem descartados que os soronegativos, no presente estudo diferença significativa na taxa de descarte de bovinos *N. caninum*-soropositivos e soronegativos não foram encontrados, como observado por Pfeiffer et al. (2002); Cramer et al. (2002) e Tiwari et al. (2005).

3.1.5 Conclusão

Este é o primeiro estudo prospectivo longitudinal da infecção por *Neospora caninum* em rebanhos leiteiros brasileiros. Resultados deste estudo confirmam a importância da via vertical na transmissão e manutenção da infecção por *N. caninum* nos rebanhos bovinos. Embora transmissão horizontal tenha sido identificada nesses rebanhos, esta não se mostrou uma via importante de infecção. Altas taxas de conversão negativa foram encontradas em todas as fazendas. As taxas de descarte não foram associadas com a infecção por *N. caninum* em nenhum dos rebanhos estudados

3.2 EXPERIMENTO 2 - *Neospora caninum*: análise dos índices reprodutivos em rebanhos leiteiros

3.2.1. Introdução

Neospora caninum é um parasito apicomplexa que infecta uma grande variedade de animais domésticos e silvestres. A neosporose é uma doença muito importante para a pecuária leiteira e de corte, pois é considerada uma das principais causas de abortamentos em bovinos em todo o mundo (DUBEY et al., 2007).

Somente cães, coiotes, raposas e dingos foram confirmados como hospedeiros definitivos para *N. caninum*, podendo eliminar oocistos pelas fezes (MCALLISTER et al., 1998; GONDIM et al., 2004b; WAPENAAR et al. 2006; KING et al., 2010).

Diversos estudos demonstraram que a transmissão transplacentária é a maior via de infecção e manutenção de *N. caninum* em bovinos, pois acima de 80% das vacas soropositivas transmitem o parasito para os seus bezerros (BARR et al., 1993; PARÉ et al., 1997; HIETALA; THURMOND, 1999), entretanto grande parte destes bezerros nasce saudável. Mesmo assim, abortamentos associados a *N. caninum* em bovinos foram amplamente descritos e observados por toda a gestação, com maior ocorrência entre o quarto e o sétimo mês de gestação (BARR et al., 1991a; THILSTED; DUBEY, 1989; ANDERSON et al., 1991; WOUDA et al., 1999a).

Estudos sorológicos prospectivos observaram que vacas positivas para a infecção por *N. caninum* tiveram um aumento do risco de abortamento de 2 a 7,4 vezes quando comparadas as vacas soronegativas (PARÉ, et al., 1997; THURMOND; HIETALA, 1997a; WOUDA et al., 1998; PFEIFFER et al., 2002; WESTON et al., 2005; LÓPEZ-GATIUS et al., 2007).

Abortamento é o principal sintoma clínico causado pela neosporose em bovinos adultos. López-Gatius et al. (2004b, 2005b) e Bartels et al. (2006) observaram que a infecção por *N. caninum* não foi associada com problemas reprodutivos além dos abortamentos. Associação entre a soropositividade para *N. caninum* e o aumento do número de serviços foram relatados (MUNOZ-ZANZI et al., 2004; HOBSON et al., 2005; HALL et al., 2005), mas outros estudos não observaram esta associação (BJÖRKMAN et al., 1996; JENSEN et al., 1999; LÓPEZ-GATIUS et al., 2005b; ROMERO et al., 2005).

O objetivo deste estudo foi determinar a influência do *N. caninum* nos índices reprodutivos de três rebanhos leiteiros através da análise do risco de abortamento, idade gestacional no abortamento, número de serviços e intervalo entre partos.

3.2.2 Material e métodos

3.2.2.1 Bovinos

Um estudo longitudinal prospectivo foi conduzido em três rebanhos leiteiros, designados, neste estudo como: Fazenda I, Fazenda II e Fazenda III, localizados nos municípios de Caçapava, Pindamonhangaba e Lagoinha, Vale do Paraíba Paulista. Os rebanhos foram selecionados e incluídos no estudo por apresentarem pelo menos um bovino soropositivo a anticorpos anti-*N. caninum* na primeira amostragem e por possuírem um sistema de registro de dados zootécnicos de cada animal da propriedade. A ocorrência de animais soropositivos nestas três fazendas foi observada em um estudo anterior e a soroprevalência variou de 3,32 a 11,71% na Fazenda I; 3,90 a 22,06% na Fazenda II e de 28,57 a 37,10% na Fazenda III, conforme a data da colheita.

3.3.2.2 Manejo dos rebanhos

Todas as fazendas selecionadas para este estudo tinham um sistema de criação e produção similares. A maioria dos bovinos era da raça holandesa e criados em sistema semi-intensivo. Os bezerros recém-nascidos receberam colostro de suas respectivas mães dentro de poucas horas após o parto e a separação mãe-cria ocorreu após 12 horas do nascimento. Todos os bezerros recém-nascidos machos eram descartados do rebanho um dia após o nascimento. As bezerras foram mantidas em baias individuais até o desmame, que ocorreu ao redor de dois meses de idade. Bezerras mais jovens que quatro meses foram mantidas em baias coletivas e as com mais de quatro meses, além das novilhas e das vacas secas e lactantes foram mantidas a pasto.

Concentrado e suplemento mineral foram oferecidos de acordo com o lote animal e produção leiteira. Na estação chuvosa, capim, produzido nas próprias fazendas, foi colhido, picado e oferecido no cocho de alimentação. Na estação seca, os bovinos foram alimentados com silagem de milho, também produzida e estocada nas fazendas. Todas as vacas foram inseminadas artificialmente. Diagnósticos de gestação foram realizados no dia 40 após a inseminação por palpação retal. As vacas e novilhas pariram por todo o ano e eram ordenhadas duas vezes ao dia. Todas as vacas estavam livres de tuberculose e brucelose e vacinadas contras as principais doenças de bovinos. Pássaros, galinhas, roedores, cães, gatos e animais silvestres, quando presentes nas propriedades, tinham livre acesso aos estábulos e pastagens.

3.2.2.3 Colheitas das amostras de sangue e sorologia

As colheitas das amostras de sangue foram realizadas trimestralmente no período de dois anos, totalizando nove colheitas por fazenda. Amostras de sangue, para a obtenção de soro, foram colhidas através da veia coccígena ou jugular de todos os bovinos presentes no rebanho na respectiva visita. Nenhum tipo de amostra de sangue e/ou tecidos foi colhido dos fetos abortados ou das placentas das vacas que sofreram abortamento.

Os soros foram testados para a presença de anticorpos contra *N. caninum* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) usando taquizoítos íntegros de cultura de células (cepa NC-1) como antígeno e diluídos em solução tampão 1:100 (DUBEY et al., 1988b).

3.2.2.4. Análises Estatísticas

Para minimizar o impacto dos resultados falso-positivos e falso-negativos, os animais foram classificados como soropositivos se as duas primeiras amostras de sangue eram positivas e foram considerados soronegativos se as duas primeiras amostras de sangue eram negativas. Na ocorrência de soroconversão, os animais foram classificados como soronegativos ou soropositivos para *N. caninum* quando tiveram, respectivamente, duas amostragens consecutivas soropositivas ou soronegativas.

Abortamento foi definido como término da gestação por observação da expulsão do feto acima de 42 dias após a inseminação; ou pela assumida perda fetal, ocorrendo dentro de um intervalo igual ou maior que 55 dias entre duas inseminações.

Risco de abortamento foi calculado como o número de abortamentos dividido pelo número de vacas em risco no período de três meses. Vacas em risco foram definidas como número de vacas e novilhas diagnosticadas como gestante no período de análise. Os dados dos animais soroconvertidos não foram analisados, devido ao baixo número de animais que soroconverteram nas três fazendas.

Idade gestacional no abortamento, risco relativo de abortamentos consecutivos, número de serviços por gestação e intervalo entre partos foram analisados entre os animais soropositivos e negativos pela análise de variância.

Risco de abortamento das vacas soropositivas e soronegativas foi comparado usando tabelas 2x2 e teste χ^2 . Risco relativo e seus intervalos de confiança de 95% foram usados para quantificar a associação entre risco de abortamento, soropositividade e risco categórico. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $P < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas usando o programa EPIDAT (Organización Panamericana de la Salud, USA).

3.2.3 Resultados

3.2.3.1 Risco relativo de abortamento

Um total de 2.280 amostras de sangue de 308 vacas gestantes foi colhido entre março de 2004 a março de 2006 na Fazenda I. O risco relativo (RR) de abortamento entre as vacas positivas para anticorpos anti-*N. caninum* comparado com as vacas soronegativas variaram em relação ao intervalo entre as colheitas de sangue (Tabela 5), mas o risco de abortamento dos animais soropositivos em relação aos negativos não foi estatisticamente significativo ($P > 0,05$).

Um total de 985 amostras de sangue de 128 vacas gestantes foi incluído na análise da Fazenda II entre setembro de 2004 a setembro de 2006. Os valores do RR de abortamento nas vacas soropositivas para *N. caninum* comparado com as vacas soronegativas foram diferentes

de acordo com o intervalo das colheitas (Tabela 6), mas não foram estatisticamente significativos ($P>0,05$).

Na Fazenda III, um total de 1.828 amostras de sangue de 231 vacas gestantes foi colhido entre outubro de 2005 a novembro de 2007. O RR de abortamento nas vacas positivas para anticorpos anti-*N. caninum* comparado com as vacas soronegativas variaram em relação ao intervalo de análise, como apresentado na tabela 7. Nas colheitas quatro, sete e oito, o RR foi, respectivamente, de 3,73 (IC 95% = 1,11-12,50); 6,67 (IC95% = 1,45-30,68) e 14,50 (IC 95% = 1,87-112,50), e estatisticamente significativos ($P<0,05$). Nas outras cinco colheitas, os RR de abortamentos não foram estatisticamente significativos ($P>0,05$).

Tabela 5 - Risco Relativo de abortamento de vacas e novilhas soronegativas e soropositivas para anticorpos anti-*N. caninum* nas diferentes colheitas de sangue na Fazenda I

Colheitas	Soro Diagnóstico	Total de Gestantes	Abortamento			Risco relativo (IC 95%)
			Sim	Não	Risco (%)	
1	Positivo	10	1	9	10,00	2,32 (0,31-17,42)
	Negativo	139	6	133	4,32	
2	Positivo	11	0	11	0,00	nd
	Negativo	148	8	140	5,41	
3	Positivo	11	0	11	0,00	nd
	Negativo	146	4	142	2,74	
4	Positivo	0	0	0	nd	nd
	Negativo	128	7	121	5,47	
5	Positivo	7	1	6	14,29	2,84 (0,40-20,00)
	Negativo	139	7	132	5,04	
6	Positivo	7	2	5	28,57	4,29 (1,15-15,97)
	Negativo	150	10	140	6,67	
7	Positivo	5	0	5	0,00	nd
	Negativo	143	3	140	2,10	
8	Positivo	4	0	4	0,00	nd
	Negativo	137	7	130	5,11	

nd = não determinado

Tabela 6 - Risco Relativo de abortamento de vacas e novilhas soronegativas e soropositivas para anticorpos anti-*N. caninum* nas diferentes colheitas de sangue na Fazenda II

Colheitas	Soro Diagnóstico	Total de Gestantes	Abortamento			Risco relativo (IC 95%)
			Sim	Não	Risco (%)	
1	Positivo	2	0	2	0,00	nd
	Negativo	57	3	54	5,26	
2	Positivo	8	1	7	12,50	3,00 (0,31-29,35)
	Negativo	48	2	46	4,17	
3	Positivo	8	1	7	12,50	2,13 (0,25-18,01)
	Negativo	51	3	48	5,88	
4	Positivo	10	2	8	20,00	8,60 (0,86-85,75)
	Negativo	43	1	42	2,33	
5	Positivo	8	1	7	12,50	2,94 (0,30-28,73)
	Negativo	47	2	45	4,26	
6	Positivo	10	1	9	10,00	1,60 (0,18-13,85)
	Negativo	48	3	45	6,25	
7	Positivo	12	0	12	0,00	nd
	Negativo	48	2	46	4,17	
8	Positivo	11	1	10	9,09	3,82 (0,26-56,31)
	Negativo	42	1	41	2,38	

nd = não determinado

Tabela 7 - Risco Relativo de abortamento de vacas e novilhas soronegativas e soropositivas para anticorpos anti-*N. caninum* nas diferentes colheitas de sangue na Fazenda III

Intervalo das Colheitas	Soro Diagnóstico	Total de Gestantes	Abortamento			Risco relativo (IC 95%)
			Sim	Não	Risco (%)	
1	Positivo	44	5	39	11,36	1,89 (0,58-6,17)
	Negativo	83	5	78	6,02	
2	Positivo	44	5	39	11,36	3,33 (0,83-13,31)
	Negativo	88	3	85	3,41	
3	Positivo	38	4	34	10,53	2,34 (0,62-8,88)
	Negativo	89	4	85	4,49	
4	Positivo	39	6	33	15,38	3,73 (1,11-12,50)*
	Negativo	97	4	93	4,12	
5	Positivo	33	2	31	6,06	1,84 (0,32-10,52)
	Negativo	91	3	88	3,30	
6	Positivo	38	3	35	7,89	nd
	Negativo	76	0	76	0,00	
7	Positivo	42	7	35	16,67	6,67 (1,45-30,68)*
	Negativo	80	2	78	2,50	
8	Positivo	48	8	40	16,67	14,50 (1,87-112,50)*
	Negativo	87	1	86	1,15	

nd = não determinado

* $P < 0,05$

3.2.3.2 Idade gestacional no abortamento

Não foi encontrada diferença significativa entre idade gestacional média no abortamento entre as vacas soropositivas e soronegativas ($P>0,05$) em nenhuma das Fazendas estudadas. No período de dois anos do estudo da Fazenda I, três vacas gestantes positivas para anticorpos anti-*N. caninum* e 45 vacas soronegativas abortaram. A idade gestacional no dia do abortamento das vacas soropositivas variou de 104 a 281 dias (média = 211,75 dias, desvio padrão = 83,36) e nas vacas soronegativas variou de 55 a 294 (média = 192,52 dias, desvio padrão = 83,21).

Na Fazenda II, seis vacas gestantes positivas para anticorpos anti-*N. caninum* e 14 vacas soronegativas abortaram. A idade gestacional no dia do abortamento das vacas soropositivas variou de 97 a 242 dias (média = 167,71 dias, desvio padrão = 53,44) e nas vacas soronegativas variou de 69 a 280 dias (média = 204,88 dias, desvio padrão = 167,71).

Na Fazenda III, 31 vacas gestantes positivas para anticorpos anti-*N. caninum* e 20 vacas soronegativas abortaram. A idade gestacional no dia do abortamento das vacas soropositivas variou de 97 a 242 dias (média = 162,23 dias, desvio padrão = 48,61) e nas vacas soronegativas variou de 60 a 306 dias (média = 140,59 dias, desvio padrão = 77,08).

3.2.3.3 Risco de repetição de abortamento

Na Fazenda I, abortamentos repetidos ocorreram em uma (33,33%) das três vacas *N. caninum* soropositivas e em seis (13,33%) das 45 vacas soronegativas que sofreram abortamento no período de estudo. O risco relativo de uma vaca soropositiva sofrer abortamentos repetidos foi de 2,50 (IC 95% = 0,43-14,61) vezes maior do que as vacas soronegativas. Mas, este risco não foi estatisticamente significativo ($P>0,05$).

Na Fazenda II, durante todo o período de estudo, abortamentos repetidos ocorreram em uma (16,67%) das seis vacas *N. caninum* soropositivas e em três (21,43%) das 14 vacas soronegativas. O risco relativo de uma vaca soropositiva sofrer abortamentos repetidos foi 0,78 (IC 95% = 0,10-6,05) vezes maior do que as vacas soronegativas, não sendo estatisticamente significativo ($P>0,05$).

Na Fazenda III, abortamentos repetidos ocorreram em oito (25,81%) das 31 vacas soropositivas e em dois (10,00%) das 20 vacas soronegativas. O risco relativo de uma vaca soropositiva sofrer abortamentos repetidos foi 2,58 (IC 95% = 0,61-10,93) vezes maior do que as vacas soronegativas, não sendo estatisticamente significativo ($P>0,05$).

3.2.3.4 Número de Serviços

Não foi encontrada diferença significativa entre idade gestacional média no abortamento entre as vacas soropositivas e soronegativas ($P>0,05$) em nenhuma das Fazendas estudadas. Na Fazenda I, 25 vacas soropositivas para *N. caninum* e 439 vacas negativas foram inseminadas e a média do número de serviços foi de 1,96 vezes (Desvio padrão = 1,02) nas soropositivas e 1,87 vezes (Desvio Padrão = 1,33) nas negativas.

Na Fazenda II, 21 vacas soropositivas para *N. caninum* e 116 negativas foram inseminadas e as médias do número de serviços foram, respectivamente, 2,10 vezes (Desvio padrão = 1,18) e 2,42 vezes (Desvio Padrão = 1,67).

Na Fazenda III, 110 vacas soropositivas para *N. caninum* e 203 negativas foram inseminadas e as médias do número de serviços foram, respectivamente, de 2,49 vezes (Desvio padrão = 2,22) e 2,24 vezes (Desvio Padrão = 1,99).

3.2.3.5 Intervalo entre partos

Em nenhuma das três Fazendas estudadas houve diferença significativa entre o intervalo entre partos e a soropositividade para *N. caninum* ($P>0,05$). Na Fazenda I, 11 vacas soropositivas para *N. caninum* e 188 vacas negativas pariram no período do estudo. O intervalo entre partos das vacas soropositivas e negativas foram, respectivamente, 393,27 dias (Desvio padrão = 47,68) e 420,77 dias (Desvio Padrão = 98,46).

Na Fazenda II, 11 vacas soropositivas para *N. caninum* e 76 vacas negativas pariram no período do estudo. O intervalo entre partos das vacas soropositivas e negativas foram, respectivamente, 529,36 dias (Desvio padrão = 129,08) e 464,13 dias (Desvio Padrão = 99,94).

Na Fazenda III, 52 vacas soropositivas para *N. caninum* e 136 vacas negativas pariram no período do estudo. O intervalo entre partos das vacas soropositivas e negativas foram, respectivamente, 407,25 dias (Desvio padrão = 113,69) e 412,29 dias (Desvio Padrão = 142,21).

3.2.4 Discussão

Testes sorológicos para a pesquisa de anticorpos são ferramentas importantes para estudar a epidemiologia da neosporose bovina, mas resultados positivos em vacas que abortaram e nos fetos não permitem um diagnóstico definitivo da causa do abortamento. Isto porque os testes sorológicos são indiretos, identificando somente a resposta de anticorpos do hospedeiro contra o parasito e somente uma minoria das vacas positivas sofre abortamento pelo *N. caninum*, além do fato de que, mesmo sendo soropositivo a este coccídio, o causador do abortamento pode ser outro agente. Hietala e Thurmond (1995) sugeriram um método soroepidemiológico de análise estatística do rebanho, no qual a razão é determinar se o risco de abortamento em vacas gestantes soropositivas para *N. caninum* é mais alto que em vacas gestantes soronegativas em um determinado período de tempo.

O presente estudo mostrou que em todas as fazendas ocorreram perdas fetais nas vacas soropositivas e soronegativas e, quando o RR foi analisado na Fazenda I e II, não houve associação entre soropositividade e o risco de abortamento.

Na Fazenda III, em três dos oito intervalos de colheitas de sangue, as vacas soropositivas tiveram maiores risco de sofrer abortamento que as vacas negativas, demonstrando que a neosporose foi a causa provável destes abortamentos. O risco relativo de abortamento de uma vaca *N. caninum*-soropositiva na Fazenda III são similares aos resultados de outros estudos, que observaram em vacas soropositivas um risco de abortamento de 2 a 7,4 vezes quando comparadas as vacas soronegativas (PARÉ, et al., 1997; THURMOND; HIETALA, 1997a; WOUDA et al., 1998; PFEIFFER et al., 2002; WESTON et al., 2005; LÓPEZ-GATIUS et al., 2007).

Este estudo não encontrou diferenças significativas na idade gestacional do abortamento entre os animais soropositivos e soronegativos. Abortamentos em vacas soropositivas para *N. caninum* foram descritos por toda a gestação, com média de idade gestacional variando de 162,23 dias a 211,75 dias, sendo similares aos resultados relatados

por outros trabalhos (THILSTED; DUBEY, 1989; BARR et al. 1991a; ANDERSON et al., 1991, 1995; THORNTON et al., 1994; YAEGER et al., 1994; HATTEL et al., 1998; MOEN et al., 1998; WOUDA et al., 1999a; MORALES et al., 2001; SAGER et al., 2001; SÖNDGEN et al., 2001; MEDINA et al., 2006).

Abortamentos repetidos foram mostrados em bovinos infectados persistentemente (ANDERSON et al., 1995; WOUDA et al., 1995; THURMOND; HIETALA, 1997a; PEREIRA BUENO et al., 2000; CORBELINI et al., 2006a; PABÓN et al., 2007). Entretanto, o presente estudo não encontrou diferenças significativas no risco de abortamentos repetidos dos animais soropositivos quando comparados aos soronegativos.

O principal sintoma clínico associado à neosporose em bovinos adultos é o abortamento. O presente estudo, como nos achados de López-Gatius et al. (2004b, 2005b) e Bartels et al. (2006), a infecção por *N. caninum* não foi associado a outros problemas reprodutivos além dos abortamentos.

As diferenças dos riscos de abortamento dos animais soropositivos e negativos para *N. caninum* e entre as fazendas estudadas e do período de colheita das amostras de sangue podem ser devido às diferenças da patogenicidade/virulência da cepa do parasito e das características geográficas, climáticas e de manejo de cada propriedade estudada. Vários desses fatores podem causar aumento do estresse do animal, promovendo a recrudescência da infecção e aumento da parasitemia. A elevação da incidência de animais infectados pelo aumento do risco de ingestão de oocistos esporulados no ambiente também não pode ser descartada.

O presente estudo não mostrou associação entre a soropositividade para *N. caninum* e o número de serviços, como também relatado por Björkman et al. (1996); Jensen et al. (1999); López-Gatius et al. (2005b) e Romero et al. (2005). Diferentemente, Munoz-Zanzi et al. (2004); Hobson et al. (2005) e Hall et al. (2005) mostraram que vacas soropositivas tiveram maior número de serviços que vacas soronegativas.

3.2.5. Conclusão

O presente estudo mostrou que o risco de abortamento das vacas soropositivas e soronegativas para anticorpos anti-*N. caninum* variou entre as fazendas estudadas e não se mostrou constante durante todo o período de observação. Também demonstrou que a maioria dos riscos de abortamento não foi associada com a soropositividade dos animais ao *N.*

caninum. Desde modo, exames sorológicos devem ser realizados juntamente com a análise dos índices reprodutivos do rebanho e, nos casos de abortamentos, determinar estatisticamente a associação da neosporose como a possível causa. Entretanto, o custo-benefício da realização dos exames sorológicos para *N. caninum* deve ser avaliado, juntamente com a disponibilidade de dados reprodutivos atualizados do rebanho para uma correta avaliação estatística dos abortamentos.

As diferenças dos riscos de abortamento dos animais soropositivos e negativos para *N. caninum* e entre as fazendas estudadas e do período de colheita das amostras de sangue podem ser devido às diferenças da patogenicidade/virulência da cepa do parasito e das características geográficas, climáticas e de manejo de cada propriedade estudada. Vários desses fatores podem causar aumento do estresse do animal, promovendo a recrudescência da infecção e aumento da parasitemia. A elevação da incidência de animais infectados pelo aumento do risco de ingestão de oocistos esporulados no ambiente também não pode ser descartada.

Não houve associação entre o risco de abortamentos repetidos e soropositividade para *N. caninum*. Também não houve diferença da idade gestacional no dia do abortamento, o número de serviços e do intervalo entre partos entre os animais soropositivos para *N. caninum* e os negativos. Deste modo, o principal problema clínico e econômico nos rebanhos com animais soropositivos para neosporose seria o caso de abortamento, pois o parasito não foi associado com outros distúrbios reprodutivos.

3.3 EXPERIMENTO 3 - Perfil sorológico dos anticorpos colostrais para *Neospora caninum* em bezerros livres da infecção

3.3.1 Introdução

Desde seu primeiro reconhecimento em 1984 em cães na Noruega (BJERKAS et al., 1984) e da descrição de um novo gênero e espécie, *Neospora caninum* (DUBEY et al., 1988a) tem emergido como um sério problema mundial em cães e bovinos (DUBEY, 2003). Estudos demonstraram que cães (MCALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999a, b) e coiotes (GONDIM et al., 2004b) são hospedeiros definitivos do *N. caninum*.

Em bovinos, transmissão vertical ou congênita do *N. caninum* é considerada a via de transmissão mais importante, com até 95% dos bezerros, nascidos de vacas soropositivas, infectados congenitamente e encontrando-se clinicamente normais (PARÉ et al., 1996; BJÖRKAMAN et al., 1996; ANDERSON et al., 1997; PARÉ et al., 1997; THURMOND; HIETALA, 1997a; SCHARES et al., 1998; WOUDA et al., 1998, 1999a; DAVISON et al., 1999b,c; JENSEN et al., 1999; WALDNER et al., 1999; ATKINSON et al., 2000; BERGERON et al., 2000; DIJKSTRA et al., 2001b).

Estudos sorológicos têm demonstrado evidências de transmissão horizontal através da falta de associação entre o status sorológico dos pares mães-filhas, da diferença da soroprevalência entre grupos de diferentes faixas etárias ou de lotes de separação, soroconversões, respostas sorológicas transitórias, curva epidêmica durante um surto de aborto associado ao *N. caninum* e infecção aguda baseada no ELISA avidéz (MCALLISTER et al., 1996a; THURMOND; HIETALA, 1997a; COX et al., 1998; WALDNER et al., 1998; WOUDA et al., 1998, 1999a; BJORKMAN et al., 1999; DAVISON et al., 1999b; HIETALA; THURMOND, 1999; PATITUCCI et al., 1999; SCHARES et al., 1999; ATKINSON et al., 2000; BERGERON et al., 2000; DIJKSTRA et al., 2001b; DYER et al., 2000; JENKINS et al., 2000; MCALLISTER et al., 2000; DIJKSTRA et al., 2001b, 2002a; SCHARES et al., 2002; STENLUND et al., 2003; KASHIWAZAKI et al., 2004).

Em camundongos, evidências sugerem que a transmissão lactogênica de *N. caninum* pode ocorrer, como demonstrado por Cole et al. (1995) em camundongos lactentes. Transmissão lactogênica de *N. caninum* foi demonstrada experimentalmente em bezerros recém-nascidos alimentados com colostro ou leite inoculados com taquizoítas (UGGLA et al.,

1998; DAVISON et al., 2001), mas não há evidências, de que ocorra transmissão em infecções naturais (DAVISON et al., 2001).

A alimentação de bovinos recém-nascidos com *pool* de colostro e leite é uma prática bastante utilizada em propriedades leiteiras em algumas regiões do Brasil e do mundo e o conhecimento do perfil dos anticorpos contra *N. caninum* em bezerros leiteiros é de grande importância para a interpretação de dados sorológicos obtidos em bovinos jovens. Assim o objetivo deste estudo foi determinar, em neonatos bovinos soronegativos para *N. caninum*, o perfil dos anticorpos anti-*N. caninum* adquiridos passivamente pelo colostro.

3.3.2 Material e Métodos

O estudo foi conduzido no *Campus* Administrativo da Universidade de São Paulo, no município de Pirassununga, SP. Foram empregados oito bezerros machos, holandeses, recém-nascidos, filhos de vacas soronegativas para *N. caninum* pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com título ≤ 25 . As vacas doadoras de colostro (cinco animais) eram soropositivas para *N. caninum* (RIFI >100). O colostro desses animais foi colhido, identificado, acondicionado em frascos apropriados e armazenado à -20°C até a sua utilização.

Os bezerros recém nascidos não foram alimentados com leite ou colostro materno ou de outro animal, recebendo, em até duas horas após o nascimento, oralmente, através de mamadeiras, dois litros do colostro previamente obtido para este estudo.

Antes da administração do colostro, uma amostra de sangue foi colhida dos bezerros para confirmar que anticorpos anti-*N. caninum* não estavam presentes. Estes animais foram mantidos em baias coletivas com quatro bezerros por baia e receberam leite em pó comercial até o desmame, aos 60 dias de idade. Ração comercial e feno foram fornecidos em quantidades adequadas à idade e água *ad libitum*. Estes procedimentos tiveram por finalidade impedir possíveis infecções pelo *N. caninum* após o nascimento.

Amostras de sangue foram colhidas um dia após a ingestão do colostro e depois uma vez por semana de todos os animais para acompanhamento dos níveis de anticorpos séricos anti-*N. caninum*. A técnica utilizada foi a RIFI segundo metodologia descrita por Dubey et al (1988b). Todas as amostras foram processadas em três diluições: 1:50, 1:100 e 1:200 e soros bovinos controles positivos e negativos foram analisados. Amostras de sangue foram colhidas

até que todos os animais apresentassem resultados negativos, em todas as diluições, por três semanas consecutivas, quando os animais foram considerados negativos.

3.3.3 Resultados e Discussão

Todas as cinco vacas doadoras de colostro apresentaram anticorpos anti-*N. caninum* com título de 100. Os bezerros usados no estudo e suas respectivas mães eram negativos pela RIFI com título ≤ 25 , quando do nascimento.

A Tabela 8 apresenta os resultados da sorologia dos bezerros durante as 24 semanas de observação. Os bezerros número 2, 3 e 4 receberam colostro da vaca 5729; os bezerros 1 e 5 das vacas 3287 e 5807, respectivamente. Três bezerros não soroconverteram, dos quais dois haviam sido alimentados com colostro da mesma vaca 4060 e o outro com colostro da vaca 3118. Estes três bezerros que não soroconverteram nas quatro primeiras amostragens foram retirados do estudo.

Após sete dias da administração do colostro cinco bezerros tinham anticorpos anti-*N. caninum* pela RIFI nas três diluições estudadas. Com exceção do bezerro número 5, que se tornou negativo da diluição 1:200 na segunda semana pós-colostro, os outros bezerros apresentavam títulos nas três diluições até a sétima semana. Algumas oscilações foram observadas, em especial na diluição 1:200, com animais com resultados negativos por uma ou duas semanas, positivando novamente na terceira. Entretanto os animais só foram considerados negativos, para cada um dos títulos, quando se apresentavam negativos por três semanas consecutivas. Na diluição 1:50, o bezerro 4 manteve-se positivo por 21 semanas; os bezerros 1 e 2 por 20 semanas e os outros dois por 13 semanas. Na diluição 1:100, o bezerro 1 manteve-se positivo por 15 semanas e os outros quatro por 13 semanas. Na diluição 1:200, o bezerro 5 apresentou títulos de anticorpos por uma semana e os bezerros 1, 2, 3 e 4 por 7, 12, 12 e 13 semanas, respectivamente

Tabela 8 – Presença de anticorpos anti-*N. caninum* pela Reação de Imunofluorescência Indireta nas diluições de 1:50, 1:100 e 1:200, em amostras de soros das primeiras 24 semanas de bezerros negativos alimentados com colostro de vacas positivas para *Neospora caninum*

Semana	Número do Bezerro														
	1			2			3			4			5		
	1:50	1:100	1:200	1:50	1:100	1:200	1:50	1:100	1:200	1:50	1:100	1:200	1:50	1:100	1:200
1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
4	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
5	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
6	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
7	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
8	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
9	P	P	N	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P	N	N
10	P	P	N	P	P	N	P	P	N	P	P	P	P	N	N
11	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
12	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
13	P	P	N	P	P	N	P	P	N	P	P	P	P	P	N
14	P	P	N	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
15	P	P	N	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
16	P	N	N	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
17	P	N	N	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
18	P	N	N	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
19	P	N	N	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
20	P	N	N	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
21	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
22	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
23	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
24	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

(P – Positivo; N – negativo)

Segundo Tizard (2002) a falha da transferência de anticorpos maternos através do colostro pode ocorrer por produção de colostro insuficiente ou de má qualidade pela mãe; falha de ingestão por parte do animal recém-nascido e/ou falha de absorção dos anticorpos através do epitélio intestinal, fatos que podem ter ocorrido neste estudo nos bezerros que não soroconverteram.

Em ruminantes, a placenta não permite a transferência de imunoglobulina materna para a circulação fetal, por isso qualquer anticorpo no soro pré-colostral é derivado do feto, o que indica uma resposta imune ativa contra a invasão do parasito. Durante as primeiras 24-36 horas de vida o bezerro é hábil para absorver imunoglobulinas do leite da mãe através do intestino e, conseqüentemente, os anticorpos têm especificidade idêntica à da mãe (STOTT et al., 1979). Hietala e Thurmond (1999) e Innes et al. (2001), usando bezerros soronegativos nascidos de vacas soropositivas, observaram soroconversão após a ingestão de colostro, entretanto os níveis de anticorpos anti-*N. caninum* apresentaram um declínio ao redor de 19,6 dias e 21 dias após o nascimento, respectivamente.

Hietala e Thurmond (1999) relataram que bezerros nascidos negativos e que receberam colostro de vacas *N. caninum* positivas, tornaram-se soropositivos e os anticorpos colostrais declinaram aos 128 dias após o nascimento, isto é ao redor da 18ª semana após o nascimento. Estes resultados foram semelhantes aos do presente estudo, no qual na 21ª semana após o nascimento foi observado o desaparecimento dos anticorpos colostrais em todos os bezerros na menor diluição utilizada na RIFI.

No trabalho realizado por Hietala e Thurmond (1999), 17 dos 284 bezerros classificados como negativos para *N. caninum* soroconverteram e 13 destas soroconversões ocorreram no período neonatal seguido da ingestão de colostro, no qual as mães de nove bezerros eram soropositivas, uma soronegativa e três não tinham o diagnóstico. Assim, foi sugerido que os bezerros que soroconverteram podem ter sido infectados durante os primeiros meses de vida; infectados congenitamente, mas não tiveram uma resposta de anticorpos detectáveis no nascimento ou a sensibilidade e especificidade do teste empregado pode ter influenciado no diagnóstico da soroconversão, como também mostrado por Davison et al. (1999b).

3.3.4 Conclusões

Estes resultados mostram que bezerros recém-nascidos soronegativos pré-colostrais quando alimentados com um pool de colostro de vacas *N. caninum* positivas podem apresentar resultados sorológicos positivos para *N. caninum* devido à absorção de anticorpos colostrais. Este encontro em bezerros com até quatro meses de idade deve ser sempre interpretado com grande cautela, em especial em animais alimentados com *pool* de colostro,

nos quais não se pode identificar com exatidão as vacas doadoras. Exames pareados bezerros e suas mães são importantes para melhor avaliação dos resultados da sorologia, entretanto nas propriedades que utilizam pool de colostro, a avaliação sorológica dos bezerros só deve ser realizada em animais com idade mínima de quatro meses.

3.4 EXPERIMENTO 4 - Dinâmica de anticorpos durante a gestação em vacas naturalmente infectadas com *Neospora caninum* de quatro rebanhos leiteiros no Brasil

3.4.1 Introdução

Neospora caninum é um parasito apicomplexa que foi primeiro reconhecido em cães por cientistas Noruegueses (BJERKAS et al., 1984) e isolado, caracterizado e nomeado em 1988 nos Estados Unidos (DUBEY et al., 1988a). *N. caninum* tem sido descrito como uma das causas mais importantes de abortamento em bovinos por todo o mundo (ANDERSON et al., 1991, 1995; WOUDA et al., 1999a).

Apesar da descoberta que cães e coiotes podem servir como hospedeiros definitivos para *N. caninum* (MCALLISTER et al., 1998; GONDIM et al., 2004b), infecção congênita é geralmente aceita como a principal via de transmissão e manutenção de *N. caninum* em bovinos e pode ocorrer por diversas gestações (PARÉ et al., 1996; ANDERSON et al., 1997; THURMOND; HIETALA, 1997a; SCHARES et al., 1998; DAVISON et al., 1999b; GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2008; PEREIRA-BUENO et al., 2000; PABÓN et al., 2007). Embora algumas infecções fetais levem ao abortamento, nascimento de bezerros infectados congenitamente é mais frequentemente observado.

Neosporose bovina ocorre ou como resultado de uma infecção maternal durante a gestação ou como consequência de uma recrudesência de uma infecção persistente da vaca durante a gestação, denominadas infecção transplacentária exógena ou endógena, respectivamente (TREES; WILLIAMS, 2005). O estudo da dinâmica de anticorpos permite melhor interpretação das análises sorológicas. É geralmente aceito que este aumento da resposta imune, mostrado pelas vacas gestantes infectadas por *N. caninum*, reflete reativação do parasito e sua transmissão transplacentária para o feto (INNES et al., 2002).

O objetivo do presente estudo foi caracterizar a dinâmica de anticorpos durante a gestação em vacas leiteiras naturalmente infectadas com *N. caninum*.

3.4.2 Material e Métodos

3.4.2.1. Animais

Este estudo foi conduzido em quatro rebanhos leiteiros, três no estado de São Paulo e um no Paraná, Brasil. Os bovinos eram cruzamentos da raça holandesa e foram criados em um sistema semi-intensivo. Os rebanhos tiveram anteriormente casos de infecção por *N. caninum* em estudos prospectivos quando analisados por meio de testes sorológicos. Doze vacas gestantes naturalmente infectadas com *N. caninum* foram selecionadas. Todas as vacas foram inseminadas artificialmente e a gestação foi diagnosticada por palpação retal no dia 40 após inseminação. As gestações não estavam coordenadas em tempo, mas distribuídas por todo o ano. Todos os animais estavam livres de tuberculose e brucelose e programas de vacinação foram adotadas para a prevenção das principais doenças de bovinos.

3.4.2.2 Colheita de sangue e sorologia

De outubro de 2005 a maio de 2008, amostras de sangue das vacas foram mensalmente colhidas, pela punção da veia coccígena, desde a inseminação até o parto. Somente uma gestação de cada vaca foi avaliada. Depois da centrifugação a 1.000 x g por 15 min, o soro foi removido e estocado à -20°C até análise.

Os soros foram testados para anticorpos contra *N. caninum* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) usando taquizoítos íntegros de cultura de células (cepa NC-1) como antígeno (DUBEY et al., 1988b). Amostras de soro foram inicialmente triadas na diluição 1:100 e as amostras positivas foram diluídas na base dois até o título final. Isoticianato de fluoresceína conjugado à IgG antiovino de coelho (Sigma, St Louis, MO, USA) foi usado na diluição de 1:3.000.

3.4.2.3 Análises estatísticas

Dados da RIFI das amostras individuais não permitiram uma distribuição normal, requerendo o uso de comparação estatística não paramétrica, Teste de Friedman, usando o programa SPSS 9.0 (SPSS Inc., 2004). Comparações múltiplas entre os anticorpos anti-*N. caninum* durante os meses da gestação foram conduzidas pelo Teste Wilcoxon Signed Ranks. Diferença foi considerada estatisticamente significativa para $P < 0,05$.

3.4.3 Resultados e Discussão

Durante a gestação, todas as vacas permaneceram clinicamente normais e pariram bezerros saudáveis. Não foram colhidas amostras de sangue pré-colostral dos bezerros recém-nascidos. Resultados sorológicos individuais são mostrados na tabela 9.

Tabela 9 - Título de anticorpos IgG anti-*Neospora caninum* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI ≥ 100) em vacas leiteiras, de quatro diferentes Fazendas, durante a gestação

Fazenda	Animal Nº	Mês de gestação								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9 ^{*1}
I	6	400	400	800	800	800	200	800	1600	800
I	215	400	200	200	100	400	800	800	800	800
II	78	200	200	400	800	800	400	800	400	800
II	234	N	200	800	400	12800	6400	12800	1600	3200
II	322	400	400	400	800	400	400	400	400	800
III	662	800	800	800	800	800	800	800	800	800
III	657	400	400	400	400	800	800	12800	800	800
IV	359	400	200	400	400	200	400	400	800	800
IV	374	100	400	200	400	200	200	200	200	1600
IV	557	800	200	200	800	800	800	1600	1600	800
IV	368	200	800	800	800	800	800	800	800	800
IV	547	400	800	800	800	800	1600	800	800	400

^{*1} - Data do Parto

N - Negativo

As vacas permaneceram soropositivas durante o estudo e os títulos da RIFI para *N. caninum* variaram de 100 à 12.800, somente o animal 234 apresentou um resultado negativo no primeiro mês de gestação, provavelmente causado por flutuações nos níveis de anticorpos que ocasionalmente caíram abaixo do ponto de detecção do teste sorológico (HIETALA; THURMOND, 1999; PEREIRA-BUENO et al., 2000; PFEIFFER et al., 2002; HÄSLER et al., 2006a; GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2008).

Diferenças significativas dos títulos da RIFI para *N. caninum* foram encontradas do 1º ao 9º mês de gestação pelo Teste de Friedman ($P < 0,001$). Nas comparações múltiplas, os meses 1 e 2 foram significativamente diferentes ($P < 0,05$) e apresentaram baixos títulos quando comparados aos meses 4 a 9 (segundo e terceiro trimestre de gestação). O mês 3 de gestação foi diferente ($P < 0,05$) dos meses 7, 8 e 9 (terceiro trimestre de gestação) com mais baixos títulos. Nenhuma diferença significativa ($P < 0,05$) nos títulos ocorreram entre os meses 4, 5 e 6 (segundo trimestre) e meses 7, 8 e 9 (terceiro trimestre).

Estes resultados mostraram aumento dos títulos de anticorpos para *N. caninum* no segundo e terceiro trimestre em relação ao primeiro trimestre. O aumento do nível de anticorpos durante meio e final da gestação foram relatados (DANNATT, 1995; STENLUND et al., 1999; PEREIRA-BUENO et al., 2000; GUY et al., 2001; FIORETTI et al., 2003; ANDRIANARIVO et al., 2005; GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2008), entretanto outros estudos não encontraram diferença nos níveis de anticorpos durante a gestação (FIORETTI et al., 2000; HÄSLER et al., 2006a).

No presente estudo, altos títulos foram observados em algumas vacas depois do quinto mês de gestação (Tabela 1). Diversos autores demonstraram que vacas com altos títulos de anticorpos para *N. caninum* tiveram maior risco de abortamento que soronegativas ou vacas com baixos títulos (MCALLISTER et al., 1996a; STENLUND et al., 1999; DUBEY et al., 1997; JENKINS et al., 1997; PEREIRA-BUENO et al., 2000; WILLIAMS et al., 2000; KASHIWAZAKI et al., 2004), entretanto nenhum abortamento ocorreu mesmo nessas vacas com altos títulos.

3.4.4 Conclusão

Este estudo mostrou variação dos níveis de anticorpos anti-*N. caninum* em vacas soropositivas durante diferentes períodos gestacionais. Maiores valores foram observados

durante o segundo e terceiro trimestre. O nível de anticorpos aumentou depois do quinto mês de gestação, entretanto este aumento não foi associado a abortamento.

4 CONCLUSÕES GERAIS

Os quatro estudos permitiram concluir:

- A ocorrência de animais soropositivos para *N. caninum* variou entre os rebanhos estudados e, dentro dos rebanhos, também foram verificadas variação da soroprevalência em relação à data de amostragem e classe animal;
- Resultados sorológicos transitórios, isto é, uma ou mais amostras positivas ou negativas não consecutivas, não caracterizando mudança no status sorológico, são observadas e apontam o cuidado que deve ser tomado ao analisar amostras de sangue isoladas para determinar o status sorológico em bovinos;
- Altas taxas de transmissão vertical do *N. caninum*, determinadas pela análise dos pares mãe-filha, comprovam que esta via é eficaz na transmissão e manutenção deste agente nos rebanhos bovinos;
- A transmissão horizontal é baixa, entretanto suficiente para contribuir para a perpetuação da infecção do *N. caninum* nos rebanhos, através da incidência de novos casos de animais infectados;
- Altas taxas de conversões de animais soropositivos para negativos são observadas nos rebanhos, sugerindo que a imunidade dos animais infectados pode ter um papel nesta alteração;
- O risco relativo de abortamento de vacas soropositivas foi semelhante ao de vacas negativas na maioria das observações, reforçando a importância de analisar além dos animais que abortaram, animais sob o mesmo risco e que não abortaram;
- O principal problema clínico associado à neosporose são os abortamentos e o parasito não foi associado a outros distúrbios reprodutivos, como o risco de abortamentos repetidos, idade gestacional no dia do abortamento, do número de serviços e do intervalo entre partos. O risco de descarte também não foi associado com a soropositividade do animal para *N. caninum*;
- Bezerros soronegativos recém-nascidos quando alimentados com um *pool* de colostro de vacas *N. caninum* positivas apresentam anticorpos colostrais até a 21ª semana depois do nascimento, indicando que a análise sorológica destes animais deve ser feita com muita cautela;

- Variação dos níveis de anticorpos anti-*N. caninum* ocorrem em vacas soropositivas durante a gestação, com mais altos níveis de anticorpos observados no 2º e 3º trimestre da gestação sem associação com abortamentos.

5 REFERÊNCIAS

AGUADO-MARTINEZ, A.; ÁLVAREZ-GARCIA, G.; ARNAIZ-SECO, I.; INNES, E.; ORTEGA-MORA, L. M. Use of avidity enzyme-linked immunosorbent assay and avidity Western blot to discriminate between acute and chronic *Neospora caninum* infection in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, p. 442-450, 2005.

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

ALAEDDINE, F.; KELLER, N.; LEEPIN, A.; HEMPHILL, A. Reduced infection and protection from clinical signs of cerebral neosporosis in C57BL/6 mice vaccinated with recombinant microneme antigen NCMIC. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 3, p. 657-665, 2005.

ALMERÍA, S.; ARAUJO, R.; TUO, W.; LÓPEZ-GATIUS, F.; DUBEY, J. P.; GASBARRE, L. C. Fetal death in cows experimentally infected with *Neospora caninum* at 110 days of gestation. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 3-4, p. 304-311, 2010.

ALMERÍA, S.; LÓPEZ-GATIUS, F.; GARCÍA-ISPIERTO, I.; NOGAREDA, C.; BECH-SABAT, G.; SERRANO, B.; SANTOLARIA, P.; YÁNIZ, J. L. Effects of crossbreed pregnancies on the abortion risk of *Neospora caninum*-infected dairy cows. **Veterinary Parasitology**, v. 163, p. 323-329, 2009a.

ALMERÍA, S.; NOGAREDA, C.; SANTOLARIA, P.; GARCIA-ISPIERTO, I.; YÁNIZ, J. L.; LÓPEZ-GATIUS, F. Specific anti-*Neospora caninum* IgG1 and IgG2 antibody responses during gestation in naturally infected cattle and their relationship with gamma interferon production. **Veterinary Immunology and Immunopathology** v. 130, p. 35-42, 2009b.

ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; COSTAS, E.; REBORDOSA, X.; ORTEGA-MORA, L. M. Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. **Veterinary Research**, v. 34, p. 341-352, 2003.

ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; PEREIRA-BUENO, J.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.; ORTEGA-MORA, L. M. Pattern of recognition of *Neospora caninum* tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted fetuses. **Veterinary Parasitology**, v. 107, p. 15-27, 2002.

ANDERSON, M. L.; BLANCHARD, P. C.; BARR, B. C.; DUBEY, J. P.; HOFFMAN, R. L.; CONRAD, P. A. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 198, p. 241-244, 1991.

ANDERSON, M. L.; PALMER, C. W.; THURMOND, M. C.; PICANSO, J. P.; BLANCHARD, P. C.; BREITMEYER, R. E.; LAYTON, A. W.; MCALLISTER, M.; DAFT, B.; KINDE, H.; READ, D. H.; DUBEY, J. P.; CONRAD, P. A.; BARR, B. C. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 207, p. 1206-1210, 1995.

ANDERSON, M. L.; REYNOLDS, J. P.; ROWE, J. D.; SVERLOW, K. W.; PACKHAM, A. E.; BARR, B. C.; CONRAD, P. A. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. infection in dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 210, p. 1169-1172, 1997.

ANDREOTTI, R.; PINCKNEY, R. D.; PIRES, P. P.; SILVA, E. A. E. Evidence of *Neospora caninum* in beef cattle and dogs in the State of Mato Grosso do Sul Center-Western region, Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Research**, v. 13, n. 3, p. 129-131, 2004.

ANDRIANARIVO, A. G.; ANDERSON, M. L.; ROWE, J. D.; GARDNER, I. A.; REYNOLDS, J. P.; CHOROMANSKI, L.; CONRAD, P. A. Immune responses during pregnancy in heifers naturally infected with *Neospora caninum* with and without immunization. **Parasitology Research**, v. 96, p. 24-31, 2005.

ANDRIANARIVO, A. G.; ROWE, J. D.; BARR, B. C.; ANDERSON, M. L.; PACKHAM, A. E.; SVERLOW, K. W.; CHOROMANSKI, L.; LOUI, C.; GRACE, A. CONRAD, P. A. A POLYGEN-adjuvanted killed *Neospora caninum* tachyzoite preparation failed to prevent foetal infection in pregnant cattle following i.v./i.m. experimental tachyzoite challenge. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 985-990, 2000.

ANDRIANARIVO, A. G.; BARR, B. C.; ANDERSON, M. L.; ROWE, J. D.; PACKHAM, A. E.; SVERLOW, K. W.; CONRAD, P. A. Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, v. 87, p. 817-825, 2001.

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

ATKINSON, R.; HARPER, P. A.; RYCE, C.; MORRISON, D. A.; ELLIS, J. T. Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 118, n. 4, p. 363-370, 1999.

ATKINSON, R. A.; COOK, R. W.; REDDACLIFF, L. A.; ROTHWELL, J.; BROADY, K. W.; HARPER, P. A. W.; ELLIS, J. T. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in a dairy cattle herd. **Australian Veterinary Journal**, v. 78, p. 262-266, 2000.

BAILLARGEON, P.; FECTEAU, G.; PARÉ, J.; LAMOTHE, P.; SAUVÉ, R. Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, p. 1803-1806, 2001.

BARLING, K. S.; MCNEILL, J. H.; THOMPSON, J. A.; PASCHÀL, J. C.; MCCOLLUM, E. T.; CRAIG, T. M.; ADAMS, L. G. Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 217, p. 1356-1360, 2000a.

BARLING, K. S.; SHERMAN, M.; PETERSON, M. J.; THOMPSON, J. A.; MCNEILL, J. W.; CRAIG, T. M.; ADAMS, L. G. Spatial associations among density of cattle, abundance

of wild canids, and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 217, p. 1361-1365, 2000b.

BARLING, K. S.; LUNT, D. K.; SNOWDEN, K. F.; THOMPSON, J. A. Association of serologic status for *Neospora caninum* and postweaning feed efficiency in beef steers. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, p. 1259-1262, 2001.

BARR, B. C.; ANDERSON, M. L.; BLANCHARD, P. C.; DAFT, B. M.; KINDE, H.; CONRAD, P. A. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. **Veterinary Pathology**, v. 27, p. 354-361, 1990.

BARR, B. C.; ANDERSON, M. L.; SVERLOW, K. W.; CONRAD, P. A. Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. **Veterinary Record**, v. 137, p. 611-613, 1995.

BARR, B. C.; ANDERSON, M. L.; DUBEY, J. P.; CONRAD, P. A. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. **Veterinary Pathology**, v. 28, p. 110-116, 1991a.

BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; DUBEY, J. P.; ANDERSON, M. L. *Neospora*-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure. and immunoreactivity. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 3, p. 39-46, 1991b.

BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; BREITMEYER, R.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M. L.; REYNOLDS, J.; CHAUVET, A. E.; DUBEY, J. P.; ARDANS, A. A. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: Four cases (1990-1992). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 202, p. 113-117, 1993.

BARR, B. C.; ROWE, J. D.; SVERLOW, K. W.; BONDURANT, R. H.; ARDANS, A. A.; OLIVER, M. N.; CONRAD, P. A. Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 207-215, 1994.

BARTELS, C. J.; WOUDA, W.; SCHUKKEN, Y. H. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). **Theriogenology**, v. 52, p. 247-257, 1999.

BARTELS, C. J. M.; VAN SCHAIK, G.; VELDHUISEN, J. P.; VAN DEN BORNE, B. H. P.; WOUDA, W.; DIJKSTRA, T. Effect of *Neospora caninum*-serostatus on culling, reproductive performance and milk production in Dutch dairy herds with and without a history of *Neospora caninum*-associated abortion epidemics. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 77, p. 186-198, 2006.

BARTELS, C. J. M.; HUININK, I.; BEIBOER, M. L.; VAN SCHAIK, G.; WOUDA, W.; DIJKSTRA, T.; STEGEMAN, A. Quantification of vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* infection in Dutch dairy herds. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 83-92, 2007.

- BARTLEY, P. M.; WRIGHT, S.; CHIANINI, F.; BUXTON, D.; INNES, E. A. Inoculation of Balb/c mice with live attenuated tachyzoites protects against a lethal challenge of *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 135, p. 13-21, 2007.
- BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M. C.; HILL, D. E.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; DUBEY, J. P. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 612-618, 2001a.
- BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M. C.; MOORE, P.; RAMBEAU, M.; UNZAGA, J. M.; CAMPERO, C.; BACIGALUPE, D.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 906-907, 2001b.
- BASZLER, T. V.; GAY, L. J. C.; LONG, M. T.; MATHISON, B. A. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 4059-4064, 1999a.
- BASZLER, T. V.; LONG, M. T.; MCELWAIN, T. F.; MATHISON, B. A. Interferon γ and interleukin-12 mediated protection to acute *N. caninum* infection in BALB/c mice. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1635-1646, 1999b.
- BASZLER, T. V.; MCELWAIN, T. F.; MATHISON, B. A. Immunization of BALB/c mice with killed *Neospora caninum* tachyzoite antigen induces a type 2 immune response and exacerbates encephalitis and neurological disease. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, n. 6, p. 893-898, 2000.
- BECH-SÀBAT, G.; LÓPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; GARCÍA-ISPIERTO, I.; PABÓN, M.; NOGAREDA, C.; YÁNIZ, J. L.; ALMÉRÍA, S. Progesterone supplementation during mid-gestation increases the risk of abortion in *Neospora*-infected dairy cows with high antibody titres. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 164-167, 2007.
- BENETTI, A. H.; SCHEIN, F. B.; SANTOS, T. R.; TONIOLLO, G. H.; COSTA, A. J.; MIMEO, J. R.; LOBATO, J.; SILVA, D. A. O.; GENNARI, S. M. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais da região Sudoeste do Estado de Mato Grosso. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 18, supl. 1, p. 29-33, 2009.
- BERGERON, N.; FECTEAU, G.; PARÉ, J.; MARTINEAU, R.; VILLENEUVE, A. Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Québec. **Canadian Veterinary Journal**, v. 41, p. 464-469, 2000.
- BERGERON, N.; GIRARD, C.; PARÉ, J.; FECTEAU, G.; ROBINSON, J.; BAILLARGEON, P. Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from seropositive dams giving birth to full-term calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, p. 173-175, 2001.
- BIELANSKI, A.; ROBINSON, J.; PHIPPS-TODD, B. Effect of *Neospora caninum* on in vitro development of preimplantation stage bovine embryos and adherence to the zona pellucida. **Veterinary Record**, v. 150, p. 316-318, 2002.

- BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeithschriff Fuer Parasitenkunde**, v. 70, p. 271-274, 1984.
- BJÖRKMAN, C.; GONDIM, L. F. P.; NÄSLUND, K.; TREES, A. J.; MCALLISTER, M. M. IgG avidity pattern in cattle after ingestion of *Neospora caninum* oocysts. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 195-200, 2005.
- BJORKMAN, C.; JOHANSSON, O.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O. J. M.; UGGLA, A. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 208, p. 441-444, 1996.
- BJÖRKMAN, C.; MCALLISTER, M. M.; FRÖSSLING, J.; NÄSLUND, K.; LEUNG, F.; UGGLA, A. Application of the *Neospora caninum* IgG avidity ELISA in assessment of chronic reproductive losses after an outbreak of neosporosis in a herd of beef cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, p. 3-7, 2003.
- BOGER, L. A.; HATTEL, A. L. Additional evaluation of undiagnosed bovine abortion cases may reveal fetal neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 113, p. 1-6, 2003.
- BOULTON, J. G.; GILL, P. A.; COOK, E. W.; FRASER, G. C.; HARPER, P. A. W.; DUBEY, J. P. Bovine *Neospora* abortion in north-eastern New South Wales. **Australian Veterinary Journal**, v. 72, p. 119-120, 1995.
- BRYAN, L. A.; GAJADHAR, A. A.; DUBEY, J. P.; HAINES, D. M. Bovine neonatal encephalomyelitis associated with a *Neospora* sp. protozoan. **Canadian Veterinary Journal**, v. 35, p. 111-113, 1994.
- BUXTON, D.; GILMOUR, J. S.; ANGUS, K. W.; BLEWETT, D. A.; MILLER, J. K. Perinatal changes in lambs infected with *Toxoplasma gondii*. **Research in Veterinary Science**, v. 32, p. 170-176, 1982.
- CAETANO-DA-SILVA, A.; FERRE, I.; ADURIZ, G.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; DEL POZO, I.; ATXAERANDIO, R.; REGIDOR-CERRILLO, J.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L. M. *Neospora caninum* infection in breeder bulls: seroprevalence and comparison of serological methods used for diagnosis. **Veterinary Parasitology**, v. 124, p. 19-24, 2004a.
- CAETANO-DA-SILVA, A.; FERRE, I.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; NAVARRO, V.; ADURIZ, G.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L. M. Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 62, p. 1329-1336, 2004b.
- CANADA, N.; MEIRELES, C. S.; CARVALHEIRA, J.; ROCHA, A.; SOUSA, S.; CORREIA DA COSTA, J. M. Determination of an optimized cut-off value for the *Neospora* agglutination test for serodiagnosis in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 121, p. 225-231, 2004.

CANADA, N.; MEIRELES, C. S.; FERREIRA, P.; COSTA, J. M. C.; ROCHA, A. Artificial insemination of cows with sêmen in vitro contaminated with *Neospora caninum* tachyzoites failed to induce neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 109-114, 2006.

CANNAS, A.; NAGULESWARAN, A.; MÜLLER, N.; EPERON, S.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A. Vaccination of mice against experimental *Neospora caninum* infection using NcSAG1- and NcSRS2-based recombinant antigens and DNA vaccines. **Parasitology**, v. 126, p. 303-312, 2003a.

CANNAS, A.; NAGULESWARAN, A.; MÜLLER, N.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A. Reduced cerebral infection of *Neospora caninum* infected mice after vaccination with recombinant microneme protein NcMIC3 and RIBI adjuvant. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 44-50, 2003b.

CHANLUN, A.; EMANUELSON, U.; FRÖSSLING, J.; AIUMLAMAI, S.; BJÖRKMAN, C. A longitudinal study of seroprevalence and seroconversion of *Neospora caninum* infection in dairy cattle in northeast Thailand. **Veterinary Parasitology**, v. 146, p. 242-248, 2007.

CHO, J.; CHUNG, W.; SONG, K.; NA, B.; KANG, S.; SONG, C.; KIM, T. Protective efficacy of vaccination with *Neospora caninum* multiple recombinant antigens against experimental *Neospora caninum* infection. **Korean Journal Parasitology**, v.1, p. 19-25, 2005.

CHOROMANSKI, L.; BLOCK, W. Humoral immune responses and safety of experimental formulations of inactivated *Neospora* vaccines. **Parasitology Research**, v. 86, p. 851-853, 2000.

COLE, R. A.; LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; SORJONEN, D. C. DUBEY, J. P. Vertical transmission of *Neospora* in dogs. **Journal of Parasitology**, v. 81, p. 208-211, 1995.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ARNÁIZ-SECO, I.; BURGOS, B. M.; RODRIGUES-BERTOS, A.; ADDURIZ G.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; ORTEGA-MORA, L. M. Comparison of *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions between epidemic and endemic bovine abortion cases. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p.187-191, 2006a.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; RODRÍGUEZ-BERTOS, A.; ARNÁIZ-SECO, I.; MORENO, B.; ADURIZ, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine fetuses. **Theriogenology**, v. 65, p. 629-641, 2006b.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ZALBALLOS, A.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1194-1198, 2002.

CONRAD, P. A.; BARR, B. C.; SVERLOW, K. W.; ANDERSON, M.; DAFT, B.; KINDE, H.; DUBEY, J. P.; MUNSON, L.; ARDANS, A. In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine fetuses. **Parasitology**, v. 106, p. 239-249, 1993a.

CONRAD, P. A.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M.; ROWE, J.; BONDURANT, R.; TUTER, G.; BREITMEYER, R.; PALMER, C.; THURMOND, M.; ARDANS, A.; DUBEY,

J. P.; DUHAMEL, G.; BARR, B. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, p. 572-578, 1993b.

CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.; DIAS, M. M. Aborto bovino por *Neospora caninum* no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 30, p. 863-868, 2000.

CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C. F. E.; GONDIM, L. F. P.; WALD, V. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 103, p. 195-202, 2002.

CORBELLINI, L. G.; PESCADOR, C. A.; FRANTZ, F.; WUNDER, E.; STEVEN, D.; SMITH, D. R.; DRIEMEIER, D. Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection: Importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 172, p. 114-120, 2006a.

CORBELLINI, L. G.; SMITH, D. R.; PESCADOR, C. A.; SCHMITZ, M.; CORREA, A.; STEFFEN, D. J.; DRIEMEIER, D. Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 74, p. 130-141, 2006b.

CORRIER, D. E. Mycotoxines: mechanisms of immunosuppression. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 30, p. 73-87, 1991.

COSTA, K. S.; SANTOS, S. L.; UZÊDA, R. S.; PINHEIRO, A. M.; ALMEIDA, M. A. O.; ARAÚJO, F. R.; MCALLISTER, M. M.; GONDIM, L. F. P. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 157-159, 2008.

COX, B. T.; REICHEL, M. P.; GRIFFITHS, L. M. Serology of a *Neospora* abortion outbreak on a dairy farm in New Zealand: A case study. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 46, p. 28-31, 1998.

CRAMER, G.; KELTON, D.; DUFFIELO, T. E.; HOBSON, J. C.; LISSEMORE, K.; HIETALA, S. K.; PEREGRINE, A. S. *Neospora caninum* serostatus and culling of Holstein cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 221, p. 1165-1168, 2002.

CRAWSHAW, W. M.; BROCKLEHURST, S. Abortion epidemic in a dairy herd associated with horizontally transmitted *Neospora caninum* infection. **Veterinary Record**, v. 152, n. 7, p. 201-206, 2003.

CUDDON, P.; LIN, D. S.; BOWMAN, D. D.; LINDSAY, D. S.; MILLER, T. K.; DUNCAN, I. D.; DELAHUNTA, A.; CUMMINGS, J.; SUTER, M.; COOPER, B.; KING, J. M.; DUBEY, J. P. *Neospora caninum* infection in English springer spaniel littermates: diagnostic evaluation and organism isolation. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 6, p. 325-332, 1992.

DANNATT, L. *Neospora caninum* antibody levels in an endemically- infected dairy herd. **Irish Veterinary Journal**, v. 51, p. 200-201, 1998.

DANNATT, L.; GUY, F.; TREES, A. J. Abortion due to *Neospora* species in a dairy herd. **Veterinary Record**, v. 137, p. 566-567, 1995.

DARIUS, A. K.; MEHLHORN, H.; HEYDORN, A. O. Effects of toltrazuril and ponazuril on *Hammondia heydorni* (syn. *Neospora caninum*) infections in mice. **Parasitology Research**, v. 92, p. 520-522, 2004a.

DARIUS, A. K.; MEHLHORN, H.; HEYDORN, A. O. Effects of toltrazuril and ponazuril on the fine structure and multiplication of tachyzoites of the NC-1 strain of *Neospora caninum* (a synonym of *Hammondia heydorni*) in cell cultures. **Parasitology Research**, v. 92, p. 453-458, 2004b.

DAVISON, H. C.; FRENCH, N. P.; TREES, A. Herd-specific and age-specific seroprevalence of *Neospora caninum* in 14 British dairy herds. **Veterinary Record**, v. 144, p. 547-550, 1999a.

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

DAVISON, H. C.; GUY, F.; OTTER, A.; TREES, A. J. Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1189-1194, 1999c.

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

DE MAREZ, T.; LIDDELL, S.; DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; GASBARRE, L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: Humoral and cellular immune responses. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1647-1657, 1999.

DE MEERSCHMAN, F.; FOCANT, C.; DETRY, J.; RETTIGNER, C.; CASSART, D.; LOSSON, B. Clinical, pathological and diagnostic aspects of congenital neosporosis in a series of naturally infected calves. **Veterinary Record**, 157: 115-118, 2005.

DE MEERSCHMAN, F.; SPEYBROECK, N.; BERKVEN, D.; RETTIGNES, C.; FOCANT, C.; LECLIPTEUX, T.; CASSART, D.; LOSSON, B. Fetal infection with *Neospora caninum* in dairy and beef cattle in Belgium. **Theriogenology**, v. 58, p. 933-945, 2002.

DE MELO, C. B.; LEITE, R. C.; LOBATO, Z. I.; LEITE, R. C. Infection by *Neospora caninum* associated with bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhea virus in cattle from Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 119, n. 2-3, p. 97-105, 2004.

DE MELO, C. B.; LEITE, R. C.; SOUZA, G. N.; LEITE, R. C. Frequência de infecção por *Neospora caninum* em dois diferentes sistemas de produção de leite e fatores predisponentes à infecção em bovinos em Minas Gerais. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 10, p. 67-74, 2001.

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

DE YANIZ, M. G.; MOORE, D. P.; ODEÓN, A. C.; CANO, A.; CANO, D. B.; LEUNDA, M. R.; CAMPERO, C. M. Humoral immune response in pregnant heifers inoculated with *Neospora caninum* tachyzoites by conjunctival route. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 213-218, 2007.

DEBACHE, K.; ALAEDDINE, F.; GUIONAUD, C.; MONNEY, T.; MÜLLER, J.; STROHBUSCH, M.; LEIB, S. L.; GRANDGIRARD, D.; HEMPHILL, A. Vaccination with recombinant NcROP2 combined with recombinant NcMIC1 and NcMIC3 reduces cerebral infection and vertical transmission in mice experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p.1373-1384, 2009.

DEBACHE, K.; GUIONAUD, C.; ALAEDDINE, F.; HEMPHILL, A. Intraperitoneal and intra-nasal vaccination of mice with three distinct recombinant *Neospora caninum* antigens results in differential effects with regard to protection against experimental challenge with *Neospora caninum* tachyzoites. **Parasitology**, v. 137, p. 229-240, 2010.

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

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H. W.; EYSKER, M.; WOUDA, W. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 209-215, 2001a.

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H. W.; BJÖRKMAN, C.; WOUDA, W. A high rate of seroconversion for *Neospora caninum* in a dairy herd without an obvious increased incidence of abortions. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 203-211, 2002b.

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H. W.; EYSKER, M.; BEIBOER, M. L.; WOUDA, W. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. **Veterinary Parasitology**, v. 110, p. 161-169, 2003.

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H. W.; HESSELINK, J. W.; WOUDA, W. Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 89-98, 2002c.

DIJKSTRA, T.; EYSKER, M.; SCHARES, G.; CONRATHS, F. J.; WOUDA, W.; BARKEMA, H. W. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 747-752, 2001b.

DIJKSTRA, T.; LAM, T. J. G. M.; BARTELS, C. J. M.; EYSKER, M.; WOUDA, W. Natural postnatal *Neospora caninum* infection in cattle can persist and lead to endogenous transplacental infection. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 2008, 220-225, 2008.

- DUBEY, J. P. Neosporosis in cattle. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. S42-S56, 2003.
- DUBEY, J. P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p. 349-367, 1999
- DUBEY, J. P.; DE LAHUNTA, A. Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf. **Applied Parasitology**, v. 34, p. 229-233, 1993.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. **American Journal Veterinary Research**, v. 50, p. 1578-1579, 1989.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. **Parasitology Research**, v. 86, p. 165-168, 2000.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis. **Parasitology Today**, v. 9, p. 452-457, 1993.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 67, p. 1-59, 1996.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1-2, p. 1-34, 2006
- DUBEY, J. P.; ABBITT, B.; TOPPER, M. J.; EDWARDS, J. E. Hydrocephalus associated with *Neospora caninum*-infection in an aborted bovine fetus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 118, p.169-173, 1998a.
- DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERKAS, I.; BJÖRKMAN, C.; BLAGBURN, B. L.; BOWMAN, D. D.; BUXTON, D.; ELLIS, J. T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D. E.; HOWE, D. K.; JENKINS, M. C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A. E.; MATSSON, J. G.; McALLISTER, M. M.; MODRY, D. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 929-946, 2002a.
- DUBEY, J. P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal Comparative Pathology**, v. 134, p. 267-289, 2006.
- DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, p. 1269-1285, 1988a.
- DUBEY, J. P.; DOROUGH, K. R.; JENKINS, M. C.; LIDDELL, S.; SPEER, C. A.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K. Canine neosporosis clinical signs, diagnosis, tretment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1293-1304, 1998b.
- DUBEY, J. P.; HARTLEY, W. J.; LINDSAY, D. S. Congenital *Neospora caninum* infection in a calf with spinal cord anomaly. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 197, p. 1043-1044, 1990a.

DUBEY, J. P.; HATTEL, A. L.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent experimental transmission. **Journal of the American Medical Association**, v. 193, n. 10, p. 1259-1263, 1988b.

DUBEY, J. P.; HILL, D. E.; LINDSAY, D. S.; JENKINS, M. C.; UGGLA, A.; SPEER, C. A. *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* are separate species. **Trends Parasitology**, v. 18, p. 66-69, 2002b.

DUBEY, J. P.; JANOVITZ, E. B.; SKOWRONEK, A. J. Clinical neosporosis in a 4-week-old Hereford calf. **Veterinary Parasitology**, v. 43, p.137-141, 1992a.

DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; ADAMS, D. S.; MCALLISTER, M. M.; ANDERSON-SPRECHER, R.; BASZLER, T. V.; KWOK, O. C. H.; LALLY, N. C.; BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and different enzyme-linked immunosorbent assays. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 1063-1069, 1997.

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

DUBEY, J. P.; LEATHERS, C. W.; LINDSAY, D. S. *Neospora caninum* like protozoon associated with fatal myelitis in newborn calves. **Journal of Parasitology**, v. 75, p. 146-148, 1989.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; ADAMS, D. S.; GAY, J. M.; BASZLER, T. V.; BLAGBURN, B. L.; THULLIEZ, P. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 329-336, 1996.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; ANDERSON, M. L.; DAVIS, S. W.; SHEN, S. K. Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 201, p. 709-713, 1992b.

DUBEY, J. P.; MILLER, S.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. *Neospora caninum*-associated myocarditis and encephalitis in an aborted calf. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 66-69, 1990c.

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.; SREEKUMAR, C.; KNICKMAN, E.; MISKA, K. B.; VIANNA, M. C. B.; KWOK, O. C. H.; HILL, D. E.; JENKINS, M. C.; LINDSAY, D. S.; GREENE, C. E. Biologic, morphologic, and molecular characterisation of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 1157-1167, 2004.

DYER, R. M.; JENKINS, M. C.; KWOK, O. C. H.; DOUGLAS, L. W.; DUBEY, J. P. Serologic survey of *Neospora caninum* infection in a closed dairy cattle herd in Maryland:

Risk of serologic reactivity by production groups. **Veterinary Parasitology**, v. 90, p. 171-181, 2000.

ELLIS, J. T. Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1053-1060, 1998.

ELLIS, J. T.; MCMILLAN, D.; RYCE, C.; PAYNE, S.; ATKINSON, R.; HARPER, P. A. W. Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1589-1596, 1999.

FERRE, I.; ADURIZ, G.; DEL-POZO, I.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ATXAERANDIO, R.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; HURTADO, A.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L. M. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 63, p. 1504-1518, 2005.

FERRE, I.; SERRANO-MARTÍNEZ, A.; MARTÍNEZ, K.; OSORO, A.; MATEOS-SANZ, I.; DEL-POZO, G.; ADURIZ, C.; TAMARGO, C. O.; HIDALGO, L. M.; ORTEGA-MORA, L. M. Effects of re-infection with *Neospora caninum* in bulls on parasite detection in semen and blood and immunological responses. **Theriogenology**, v. 69, p. 905-911, 2008.

FIORETTI, D. P.; PASQUAI, P.; DIAFERIA, M.; MANGILI, V.; ROSIGNOLI, L. *Neospora caninum* infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 50, p. 399-404, 2003.

FIORETTI, D. P.; ROSIGNOLI, L.; RICCI, G.; MORETTI, A.; PASQUALI, P.; POLIDORI, G. A. *Neospora caninum* infection in a clinically healthy calf: Parasitological study and serological follow-up. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 47, p. 47-53, 2000.

FRENCH, N. P.; LANCY, D.; DAVISON, H. C.; TREES, A. J. Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: Transmission and options for control. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1691-1704, 1999.

FRÖSSLING, J.; UGGLA, A.; BJÖRKMAN, C. Prevalence and transmission of *Neospora caninum* within infected Swedish dairy herds. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 209-218, 2005.

FURUTA, P. I.; MINEO, T. W.; CARRASCO, A. O.; GODOY, G. S.; PINTO, A. A.; MACHADO, R. Z. *Neospora caninum* infection in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. **Parasitology**, v. 134, p. 1931-1939, 2007.

GARCÍA-ISPIERTO, I.; LÓPEZ-GATIUS, F.; ALMERÍA, S.; YÁNIZ, J.; SANTOLARIA, P.; SERRANO, B.; BECH-SÀBAT, G.; NOGAREDA, C.; SULON, J.; DE SOUSA, N. M.; BECKERS, J. F. Factors affecting plasma prolactin concentrations throughout gestation in high producing dairy cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 36, n. 2, p. 57-66, 2009.

GARCÍA-ISPIERTO, I.; NOGAREDA, C.; YÁNIZ, J. L.; ALMERÍA, S.; MARTÍNEZ-BELLO, D.; DE SOUSA, N. M.; BECKERS, J. F.; LÓPEZ-GATIUS, F. *Neospora caninum* and *Coxiella burnetii* seropositivity are related to endocrine pattern changes during gestation in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 74, n. 2, p. 212-220, 2010.

GARCIA-VAZQUEZ, Z.; ROSARIO-CRUZ, R.; RAMOS-ARAGON, A.; CRUZ-VAZQUEZ, C.; MAPES-SANCHEZ G. *Neospora caninum* seropositivity and association with abortions in dairy cows in Mexico. **Veterinary Parasitology**, v. 134, n. 1-2, p. 61-65, 2005.

GIBNEY, E. H.; KIPAR, A.; ROSBOTTOM, A.; GUY, C. S.; SMITH, R. F.; HETZEL, U.; TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *N. caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 579-588, 2008.

GONDIM, L. F. P.; SARTOR, I. F.; HASEGAWA, M.; YAMANE, I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 86, p. 71-75, 1999a.

GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M. M.; ANDERSON-SPRECHER, R. C.; BJÖRKMAN, C.; LOCK, T. F.; FIRKINS, L. D.; GAO, L.; FISCHER, W. R. Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. **Journal of Parasitology**, v. 90, p. 1394-1400, 2004a.

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

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

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

GONDIM, L. F. P.; SARTOR, I. F.; MONTEIRO, L. A.; HARJTANI, M. *Neospora caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 47, p. 35, 1999b.

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

GONZÁLEZ, L.; BUXTON, D.; ATXAERANDIO, R.; ADURJZ, G.; MALEY, S.; MARCO, J. C.; CUERVO, L. A. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. **Veterinary Record**, v. 144, p. 145-150, 1999.

GONZÁLEZ-WARLETA, M.; CASTRO-HERMIDA, J. A.; CARRO-CORRAL, C.; CORTIZO-MELLA, J.; MEZO, M. Epidemiology of neosporosis in dairy cattle in Galicia (NW Spain). **Parasitology Research**, v. 102, p. 243-249, 2008.

GOTTSTEIN, B.; EPERON, S.; DAI, W. J.; CANNAS, A.; HEMPHILL, A.; GREIF, G. Efficacy of toltrazuril and ponazuril against experimental *Neospora caninum* infection in mice. **Parasitology Research**, v. 87, p. 43-48, 2001.

GOTTSTEIN, B.; HENTRICH, B.; WYSS, R.; THÜR, B.; BUSATO, A.; STÄRK, K. D. C.; MÜLLER, N. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 679-691, 1998.

GOTTSTEIN B.; RAZMI, G.R.; AMMANN, P.; SAGER, H.; MÜLLER, N. Toltrazuril treatment to control diaplacental *Neospora caninum* transmission in experimentally infected pregnant mice. **Parasitology**, v. 130, p. 41-48, 2005.

GUEDES, M. H.; GUIMARÃES, A. M.; ROCHA C. M.; HIRSCH, C. Frequency of anti-*Neospora caninum* antibodies in cows and fetuses from Municipalities of Southern Minas Gerais. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 17, n. 4, p. 189-194, 2008.

GUIMARÃES JR., J. S.; SOUZA, S. L.; BERGAMASCHI, D.P.; GENNARI, S. M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 124, n. 1-2, p. 1-8, 2004.

GUY, C. S.; WILLIAMS, D. J. L.; KELLY, D. E.; MCGARRY, J. W.; GUY, E.; BJÖRKMAN, C.; SMITH, R. E.; TREES, A. J. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: Spontaneous transplacental infection is associated with an acute rise in maternal antibody. **Veterinary Record**, v. 149, p. 443-449, 2001.

HADDADZADEH, H. R.; SADREBAZZAZ, A.; MALMASI, A.; ARDAKANI, H. T.; KHAZRAI NIA, P.; SADRESHIRAZI, N. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from rural and urban environments in Tehran, Iran. **Parasitology Research**, v. 101, p. 1563-1565, 2007.

HAERDI, C.; HAESSIG, M.; SAGER, H.; GREIF, G.; STAUBLI, D.; GOTTSTEIN, B. Humoral immune reaction of newborn calves congenitally infected with *Neospora caninum* and experimentally treated with toltrazuril. **Parasitology Research**, v. 99, p. 534-540, 2006.

HALDORSON, G. J.; MATHISON, B. A.; WENBERG, K.; CONRAD, P. A.; DUBEY, J. P.; TREES, A. J.; YAMANE, I.; BASZLER, T. V. Immunization with native surface protein NcSRS2 induces a Th2 immune response and reduces congenital *Neospora caninum* transmission in mice. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 1407-1415, 2005.

HALL, C. A.; REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 231-241, 2005.

HÄSLER, B.; HERNANDEZ, J. A.; REIST, M.; SAGER, H.; STEINER-MORET, C.; STAUBLI, D.; STÄRK, K. D. C.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum*: serological follow-up in dairy cows during pregnancy. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 222-230, 2006a.

HÄSLER, B.; REGULA, G.; STÄRK, K. D. C.; SAGER, H.; GOTTSTEIN, B.; REIST, M. Financial analysis of various strategies for the control of *Neospora caninum* in a dairy cattle in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 77, p. 230-253, 2006b.

- HÄSLER, B.; STÄRK, K. D. C.; SAGER, H.; GOTTSTEIN, B.; REIST, M. Simulating the impact of four control strategies on the population dynamics of *Neospora caninum* infection in Swiss dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 77, p. 254-283, 2006c.
- HÄSSIG, M.; GOTTSTEIN, B. Epidemiological investigations of abortions due to *Neospora caninum* on Swiss dairy farms. **Veterinary Record**, v. 150, p. 538-542, 2002.
- HATTEL, A. L.; CASTRO, M. D.; GUMMO, J. D.; WEINSTOCK, D.; REED, J. A.; DUBEY, J. P. Neosporosis-associated bovine abortion in Pennsylvania. **Veterinary Parasitology**, v. 74, p. 307-313, 1998.
- HELMAN, R. G.; STAIR, E. L.; LEHENBAUER, T. W.; RODGERS, S.; SALIKJ, J. T. Neosporal abortion in Oklahoma cattle with emphasis on the distribution of brain lesions in aborted fetuses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, p. 292-295, 1998.
- HERNANDEZ, J.; RISCO, C.; DONOVAN, A. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, p. 632-635, 2001.
- HERNANDEZ, J.; RISCO, C.; DONOVAN, A. Risk of abortion associated with *Neospora caninum* during different lactations and evidence of congenital transmission in dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 221, p. 1742-1746, 2002.
- HIETALA, S. K.; THURMOND, M. C. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1669-1676, 1999.
- HILL, D. E.; LIDDELL, S.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. Specific detection of *Neospora caninum* oocysts in fecal samples from experimentally-infected dogs using the polymerase chain reaction. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 395-398, 2001.
- HO, M. S. Y.; BARR, B. C.; ROWE, J. D.; ANDERSON, M. L.; SVERLOW, K. W.; PACKHAM, A.; MARSH, A. E.; CONRAD, P. A. Detection of *Neospora sp.* from infected bovine tissues by PCR and probe hybridization. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 508-514, 1997.
- HOAR, B. R.; MCQUARRY, A. C.; HIETALA, S. K. Prevalence of *Neospora caninum* and persistent infection with bovine viral diarrhea virus in dairy-breed steers in a feedlot. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 230, n. 7, p. 1038-1043, 2007.
- HOBSON, J. C.; DUFFIELD, T. F.; KELTON, D.; LISSEMORE, K.; HIETALA, S. K.; LESLIE, K. E.; MCEWEN, B.; CRAMER, G.; PEREGRINE, A. S. *Neospora caninum* serostatus and milk production of Holstein cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 221, p. 1160-1164, 2002.
- HOBSON, J. C.; DUFFIELD, T. F.; KELTON, D.; LISSEMORE, K.; HIETALA, S. K.; LESLIE, K. E.; MCEWEN, B.; PEREGRINE, A. S. Risk factors associated with *Neospora caninum* abortion in Ontario Holstein dairy herds. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 177-188, 2005.

- INNES, E. A.; ANDRIANARIVO, A. G.; BJÖRKMAN, C.; WILLIAMS, D. J.; CONRAD, P. A. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 18, p. 29-36, 2002.
- INNES, E. A.; PANTON, W.; MARKS, J.; TREES, A.; HOLMDAHL, J.; BUXTON, D. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum* as show by incorporation of 3H Uracil. **Journal Comparative Pathology**, v. 113, p. 95-100, 1995.
- INNES, E. A.; WRIGHT, S.; BARTLEY, P.; MALEY, S.; MACALDOWIE, C.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, p. 29-36, 2005.
- INNES, E. A.; WRIGHT, S. E.; MALEY, S.; RAE, A.; SCHOCK, A.; KIRVAR, E.; BARTLEY, P.; HAMILTON, C.; CAREY, I. M.; BUXTON, D. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 1523-1534, 2001.
- JENKINS, M. C.; BASZLER, T.; BJÖRKMAN, C.; SCHARES, G.; WILLIAMS, D. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 631-636, 2002.
- JENKINS, M. C.; CAVER, J. A.; BJÖRKMAN, C.; ANDERSON, T. A.; ROMAND, S.; VINYARD, B.; UGGLA, A.; THULLIEZ, P.; DUBEY, J. P. Serological investigation of an outbreak of *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in southeastern United States. **Veterinary Parasitology**, v. 94, p. 17-26, 2000.
- JENKINS, M. C.; FETTERER, R.; SCHARES, G.; BJÖRKMAN, C.; WAPENAAR, W.; MCALLISTER, M.; DUBEY, J. P. HPLC purification of recombinant NCGRA6 antigen improves enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 227-234, 2005.
- JENKINS, M. C.; TUO, W.; DUBEY, J. P. Evaluation of vaccination with *Neospora caninum* protein for prevention of fetal loss associated with experimentally induced neosporosis in sheep. **American Journal Veterinary Research**, v. 65, n. 10, p. 1404-1408, 2004.
- JENKINS, M. C.; WOUDA, W.; DUBEY, J. P. Serological response over time to recombinant *Neospora caninum* antigens in cattle after a neosporosis-induced abortion. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, n. 3, p. 270-4, 1997.
- JENSEN, A. M.; BJÖRKMAN, C.; KJELDSSEN, A. M.; WEDDERKOPP, A.; WILLADSEN, C.; UGGLA, A.; LIND, P. Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 40, n. 3-4, p. 151-163, 1999.
- KANG, S. W.; PARK, S. S.; CHOE, S. E.; JEAN, Y. H.; JUNG, S. C.; KIM, K.; QUVEN, D. V. Characterization of tissue distribution and histopathological lesions in *Neospora caninum* experimentally infected gerbils. **Parasitology Research**, v. 104, p.1261-1268, 2009.

KASARI, T. R.; BARLING, K.; MCGRANN, J. M. Estimated production and economic losses from *Neospora caninum* infection in Texas Beef Herds. **Bovine Practitioner**, v. 33, p. 113-120, 1999.

KASHIWAZAKI, Y.; GIANNECCHINI, R. E.; LUST, M.; GIL, J. Seroepidemiology of neosporosis in dairy cattle in Uruguay. **Veterinary Parasitology**, v. 120, p. 139-144, 2004.

KAUFMANN, H.; YAMAGE, M.; RODITI, I.; DOBBELAERE, D.; DUBEY, J. P.; HOLMDAHL, O. J. M.; TREES, A.; GOTTSTEIN, B. Discrimination of *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites by hybridization and PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 10, n. 4, p. 289-297, 1996.

KHAN, I.; SCHWARTZMAN, J.; FONSEKA, S.; KASPER, L. *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. **Experimental Immunology**, v. 85, p. 24-34, 1997.

KIM, J. H.; LEE, J. K.; LEE, B. C.; PARK, B. K.; YOO, H. S.; HWANG, W. S.; SHIN, N. R.; KANG, M. S.; JEAN, Y. H.; YOON, H. J.; KANG, S. K.; KIM, D. Y. Diagnostic survey of bovine abortion in Korea: with special emphasis on *Neospora caninum*. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, p. 1123-1127, 2002b.

KING, J. S.; SLAPETA, J.; JENKINS, D. J.; AL-QASSAB, S. E.; ELLIS, J. T.; WINDSOR, P. A. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 8, p. 945-950, 2010.

KOIWAI, M.; HAMAOKA, T.; HARITANI, M.; SHIMIZU, S.; KIMURA, K.; YAMANE, I. Proportion of abortions due to neosporosis among dairy cattle in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, p. 1173-1175, 2005.

KRAMER, L.; DE RISIO, L.; TRANQUILLO, V. M.; MAGNINO, S.; GENCHI, C. Analysis of risk factors associated with seropositivity to *Neospora caninum* in dogs. **Veterinary Record**, v. 154, n. 22, p. 692-693, 2004.

KYAW, T.; SUWIMONTEERABUTR, J.; VIRAKUL, P.; LOHACHIT, C.; KALPRAVIDH, W. Seronegative conversion in four *Neospora caninum*-infected cows, with a low rate of transplacental transmission. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 145-150, 2005.

LALLY, N. C.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. Development of a polymerase chain reaction assay for the diagnosis of neosporosis using the *Neospora caninum* 14-3-3 gene. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 75, p. 169-178, 1996.

LANDMANN, J. K.; JILLELLA, D.; O'DONOGHUE, P. J.; MCGOWAN, M. R. Confirmation of the prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle by the use of embryo transfer. **Australian Veterinary Journal**, v. 80, p. 502-503, 2002.

LARSON, R. L.; HARDIN, D. K.; PIERCE, V. L. Economic considerations for diagnostic and control options for *Neospora caninum*-induced abortions in endemically infected herds of beef cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, p. 1597-1604, 2004.

- LEI, Y.; DAVEY, M.; ELLIS, J. Autofluorescence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* cysts in vitro. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 1, p. 17-23, 2005.
- LIDDELL, S.; JENKINS, M. C.; COLLICA, C. M.; DUBEY, J. P. Prevention of vertical transfer of *Neospora caninum* in BALB/c mice by vaccination. **Journal of Parasitology**, v. 85, p. 1072-1075, 1999.
- LIDDELL, S.; PARKER, C.; VINVARD, B.; JENKINS, M.; DUBEY, J. P. Immunization of mice with plasmid DNA coding for NcGRA7 or NcsHSP33 confers partial protection against vertical transmission of *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology** v. 89, p. 496-500, 2003.
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **American Journal Veterinary Research**, v. 50, p. 1981-1983, 1989a.
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) infections in mice. **Journal of Parasitology**, v. 75, p. 772-779, 1989b.
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. In vitro development of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) from dogs. **Journal of Parasitology**, v. 75, p. 163-165, 1989c.
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, 82: 327-333, 1999a.
- LINDSAY, D. S.; LENZ, S. D.; COLE, R. A.; DUBEY, J. P.; BLAGBURN, B. L. Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. **Journal of Parasitology**, v. 81, p. 313-315, 1995.
- LINDSAY, D. S.; RITTER, D. M.; BRAKE, D. Oocysts excretion in dogs fed mouse brains containing tissue cysts of a cloned line of *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 909-911, 2001.
- LINDSAY, D. S.; UPTON, S. J.; DUBEY, J. P. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. **Internationa Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1521-1523, 1999b.
- LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V. T.; RICHARTZ, R. R. T. B.; GASINO-JOINEAU, M. E.; VINNE, R.; PINCKNEY, R. D. Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in southern Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 1493-1494, 2001.
- LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RICHARTZ, R. R. T. B.; GASINO-JOINEAU, M. E.; VAN DER VINNE, R.; PINCKNEY, R. D. Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 13, p. 103-109, 2004.
- LONG, M. T.; BASZLER, T. V. Fetal loss in Balb/c mice infected with *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, v. 82, p. 608-611, 1996.
- LONG, M. T.; BASZLER, T. V. Neutralization of maternal IL-4 modulates congenital protozoal transmission: comparison of innate versus acquired immune responses. **Journal Immunology**, v. 164, p. 4768- 4774, 2000.

LONG, M. T.; BASZLER, T. V.; MATHISON, B. A. Comparison of intracerebral parasite load, lesion development, and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, v. 84, p. 316-320, 1998.

LÓPEZ-GATIUS, F.; ALMERÍA, S.; DONOFRIO, G.; NOGAREDA, C.; GARCÍA-ISPIERTO, I.; BECH-SÀBAT, G.; SANTOLARIA, P.; YÁNIZ, J. L.; PABÓN, M.; DE SOUSA, N. M.; BECKERS, J. F. Protection against abortion linked to gamma interferon production in pregnant dairy cows naturally infected with *Neospora caninum*. **Theriogenology**, v. 68, p. 1067-1073, 2007.

LÓPEZ-GATIUS, F.; GARCÍA-ISPIERTO, I.; SANTOLARIA, P.; YÁNIZ, J. L.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; NOGAREDA, C.; ALMERÍA, S. Relationship between Rainfall and *Neospora caninum*-associated Abortion in Two Dairy Herds in a Dry Environment. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 52, p. 147-152, 2005a.

LÓPEZ-GATIUS, F.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; MURUGAVEL, K.; PABÓN, M.; FERREr, D.; ALMERÍA, S. *Neospora*-associated abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in northeast Spain. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 51, p. 348-352, 2004a.

LÓPEZ-GATIUS, F.; PABÓN, M.; ALMERÍA, S. *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 62, p. 606-613, 2004b.

LÓPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; ALMERÍA, S. *Neospora caninum* infection does not affect the fertility of dairy cows in herds with high incidence of *Neospora*-associated abortions. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 52, p. 51-53, 2005b.

LÓPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; YÁNIZ, J. L.; GARBAYO, J. M.; ALMERÍA, S. 2005b Use of beef semen reduces the risk of abortion in *Neospora*-seropositive dairy cows. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 52, p. 88-92, 2005c.

LUNDÉN, A.; WRIGHT, S.; ALLEN, J. E.; BUXTON, D. Immunisation of mice against neosporosis. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 867-876, 2002.

MACALDOWIE, C.; MALEY, S. W.; WRIGHT, S.; BARTLEY, P.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D.; INNES, E. A. Placental Pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. **Journal Comparative Pathology**, v. 131, p. 142-156, 2004.

MAINAR-JAIME, R. C.; THURMOND, M. C.; BERZAL-HERRANZ, B.; HIETALA, S. K. Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. **Veterinary Record**, v. 145, p. 72-75, 1999.

MALEY, S. W.; BUXTON, D.; THOMSON, K. M.; SCHRIEFER, C. E. S.; INNES, E. A. Serological analysis of calves experimentally infected with *Neospora caninum*: a 1-year study. **Veterinary Parasitology**, v. 96, p. 1-9, 2001.

MALEY, S. W.; BUXTON, D.; MACALDOWIE, C. N.; ANDERSON, I. E.; WRIGHT, S. E.; BARTLEY, P. M.; ESTEBAN-REDONDO, I.; HAMILTON, C. M.; STROSEY, A. K.; INNES, E. A. Characterization of the Immune Response in the Placenta of Cattle

Experimentally Infected with *Neospora caninum* in Early Gestation. **Journal Comparative Pathology**, v. 135, p. 130-141, 2006.

MALEY, S. W.; BUXTON, D.; RAE, A. G.; WRIGHT, S. E.; SCHOCK, A.; BARTLEY, P. M.; ESTEBAN-REDONDO, I.; SWALES, C.; HAMILTON, C. M.; SALES, J.; INNES, E. A. The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mild-gestation. **Journal Comparative Pathology**, v. 129, p. 186-195, 2003.

MAYHEW, I. G.; SMITH, K. C.; DUBEY, J. P.; GATWARD, L. K.; MCGLENNON, N. J. Treatment of encephalomyelitis due to *Neospora caninum* in a litter of puppies. **Journal Small Animal Practice**, v. 32, p. 609-612, 1991.

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

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

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

MCALLISTER, M. M.; PARMLEY, S. F.; WEISS, L. M.; WELCH, V. J.; MCGUIRE, A. M. An immunohistochemical method for detecting bradyzoite antigen (BAG5) in *Toxoplasma gondii* infected tissues cross-reacts with a *Neospora caninum* bradyzoite antigen. **Journal of Parasitology**, v. 82, p. 354-355, 1996b.

MCCANN, C. M.; MCALLISTER, M. M.; GONDIM, L. F. P.; SMITH, R. F.; CRIPPS, P. J.; KIPAR, A.; WILLIAMS, D. J. L.; TREES, A. J. *Neospora caninum* in cattle: Experimental infection with oocysts can result in exogenous transplacental infection, but not endogenous transplacental infection in the subsequent pregnancy. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1631-1639, 2007.

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

MEDINA, L.; CRUZ-VAZQUEZ, C.; QUEZADA, T.; MORALES, E.; GARCIA-VAZQUEZ, Z. Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, Mexico. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p. 187-191, 2006.

MELO, D. P. G.; SILVA, A. C.; ORTEGA-MORA, L. M.; BOAVANTURA, C. M. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos das microrregiões de Goiânia e Anápolis, Goiás. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 15, p. 105-109, 2006.

MILLER, C. M.; QUINN, H.; RYCE, C.; REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. Reduction in transplacental transmission of *Neospora caninum* in outbred mice by vaccination. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 821-828, 2005.

MILLER, C. M. D.; QUINN, H. E.; WINDSOR, P. A.; ELLIS, J. T. Characterization of the first Australian isolate of *Neospora caninum* from cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 80, p. 620-625, 2002.

MINEO, T. W. P.; ALENIUS, S.; NÄSLUND, K. MONTASSIER, H. J.; BJÖRKMAN, C. Distribution of antibodies against *Neospora caninum*, BVDV and BHV-1 among cows in Brazilian dairy herds with reproductive disorders. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 15, p. 188-192, 2006.

MINERVINO, A. H.; RAGOZO, A. M.; MONTEIRO, R. M.; ORTOLANI, E. L., GENNARI, S. M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle from Santarém, Pará, Brazil. **Research Veterinary Science**, v. 84, n. 2, p. 254-256, 2008.

MOORE, D. P.; CAMPERO, C. M.; ODEÓN, A. C.; CHAYER, R.; BIANCO, M. A. Reproductive losses due to *Neospora caninum* in a beef herd in Argentina. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 50, p. 304-308, 2003.

MOORE, D. P.; CAMPERO, C. M.; ODEÓN, A. C.; POSSO, M. A.; CANO, D.; LEUNDA, M. R.; BASSO, W.; VENTURINI, M. C.; SPÄTH, E. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 107, p. 303-316, 2002.

MOORE, D. P.; REGIDOR-CERRILLO, J.; MORRELL, E.; POSO, M. A.; CANO, D. B.; LEUNDA, M. R.; LINSCHINKY, L.; ODEÓN, A. C.; ODRIÓZOLA, E.; ORTEGA-MORA, L. M.; CAMPERO, C. M. The role of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in spontaneous bovine abortion in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 156, p. 163-167, 2008.

MOORE, D. P.; PÉREZ, A.; AGLIANO, S.; BRACE, M.; CANTÓN, G.; CANO, D.; LEUNDA, M. R.; ODEÓN, A. C.; ODRIÓZOLA, E.; CAMPERO, C. M. Risk factors associated with *Neospora caninum* infections in cattle in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n. 1-2, p. 122-5, 2009.

MOEN, A. R.; WOUDE, W.; MUL, M. F.; GRAAT, E. A. M.; VAN WERVEN, T. Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: A retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. **Theriogenology**, v. 49, p. 1301-1309, 1998.

MORALES, E.; TRIGO, F. J.; IBARRA, F.; PUENTE, E.; SANTACRUZ, M. Neosporosis in Mexican dairy herds: Lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. **Journal of Comparative Pathology**, v. 125, p. 58-63, 2001.

MORÉ, G.; BACIGALUPE, D.; BASSO, W.; RAMBEAUD, M.; BELTRAME, F.; RAMIREZ, B.; VENTURINI, M. C.; VENTURINI, L. Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 51-54, 2009.

- MORÉ, G.; BACIGALUPE, D.; BASSO, W.; RAMBEAUD, M.; VENTURINI, M. C.; VENTURINI, L. Serologic profiles for *Sarcocystis* sp. and *Neospora caninum* and productive performance in naturally infected beef calves. **Parasitology Research**, v. 106, n. 3, p. 689-693, 2010.
- MOSKWA, B.; GOZDZIK, K.; BIEN, J.; CABAJ, W. Studies on *Neospora caninum* DNA detection in the oocytes and embryos collected from infected cows. **Veterinary Parasitology**, v. 158, p. 370-375, 2008.
- MÜLLER, N.; ZIMMERMAN, V.; HENTRICH, B.; GOTTSTEIN, B. Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2850-2852, 1996.
- MUNHOZ, A. D.; FLAUSINO, W.; SILVA, R. T.; ALMEIDA, C. R. R.; LOPES, C. W. G. Distribuição de anticorpos contra *Neospora caninum* em vacas leiteiras dos municípios de Resende e Rio Claro, Estado do Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 15, p. 101-104, 2006.
- MUÑOZ-ZANZI, C. A.; THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Effect of bovine viral diarrhea virus infection on fertility of dairy heifers. **Theriogenology**, v. 61, n. 6, p. 1085-1099, 2004.
- NIETFELD, J. C.; DUBEY, J. P.; ANDERSON, M. L.; LIBAL, M. C.; YAEGER, M. J.; NEIGER, R. D. *Neospora*-like protozoan infection as a cause of abortion in dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, p. 223-226, 1992.
- NISHIKAWA, Y.; INOUE, N.; MAKALA, L.; NAGASAWA, H. A role for balance of interferon-gamma and interleukin-4 production in protective immunity against *Neospora caninum* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 116, p. 175-184, 2003.
- NISHIKAWA, Y.; INOUE, N.; XUAN, X.; NAGASAWA, H.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; OTSUKA, H.; MIKAMI, T. Protective efficacy of vaccination by recombinant vaccinia virus against *Neospora caninum* infection. **Vaccine**, v. 19, p. 1381-1390, 2001a.
- NISHIKAWA, Y.; MISHIMA, M.; NAGASAWA, H.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; OTSUKA, H.; MIKAMI, T. Interferon-gamma-induced apoptosis in host cells infected with *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 123, p. 25-31, 2001b.
- NISHIKAWA, Y.; TRAGOOLPUA, K.; INOUE, N.; MAKALA, L.; NAGASAWA, H.; OTSUKA, H.; MIKAMI, T. In the absence of endogenous gamma interferon, mice acutely infected with *Neospora caninum* succumb to a lethal immune response characterized by inactivation of peritoneal macrophages. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, p. 811-816, 2001c.
- NOGAREDA, C.; LÓPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; GARCÍA-ISPIERTO, I.; BECH-SÀBAT, G.; PABÓN, M.; MEZO, M.; GONZALEZ-WARLETA, M.; CASTRO-HERMIDA, J. A.; YÁNIZ, J.; ALMERÍA, S. Dynamics of anti-*Neospora caninum* antibodies during gestation in chronically infected dairy cows. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 193-199, 2007.

OBENDORF, D. L.; MURRAY, N.; VELDHUIS, G.; MUNDAY, B. L.; DUBEY, J. P. Abortion caused by neosporosis in cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 72, p. 117-118, 1995.

OGAWA, L.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O.; GONDIM, L. F. P.; NAVARRO, I. T. Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, p. 312-316, 2005.

OGINO, H.; WATANABE, E.; WATANABE, S.; AGAWA, H.; NARITA, M.; HARITANI, M.; KAWASHIMA, K. Neosporosis in the aborted fetus and newborn calf. **Journal of Comparative Pathology**, v. 107, p. 231-237, 1992.

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

OKEOMA, C. M.; WILLIAMSON, N. B.; POMROY, W. E.; STOWELL, K. M.; GILLESPIE, L. M. Isolation and molecular characterization of *Neospora caninum* in cattle in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 52, p. 364-370, 2004b.

ORTEGA-MORA, L. M.; FERRE, I.; DEL POZO, I.; CAETANO DA SILVA, A.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ADURIZ, G. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 4, p. 301-308, 2003.

OSHIRO, L. M.; MATOS, M. F. C.; OLIVEIRA, J. M.; MONTEIRO, L. A. R. C.; ANDREOTTI, R. Prevalence of Anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 16, n. 3, p. 133-138, 2007.

OSORO, K.; ORTEGA-MORA, L. M.; MARTÍNEZ, A.; SERRANO-MARTÍNEZ, E.; FERRE, I. Natural breeding with bulls experimentally infected with *Neospora caninum* failed to induce seroconversion in dams. **Theriogenology**, v. 71, p. 639-642, 2009

O'TOOLE, D.; JEFFREY, M. Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. **Veterinary Record**, v. 121, p. 563-566, 1987

OTRANTO, D.; LIAZARI, A.; TESTINI, G.; TRAVERSA, D.; DI REGALBONO, A. F.; BADAN, M.; CAPELLI, G. Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 118, p. 7-18, 2003.

OTTER, A.; JEFFREY, M.; GRIFFITHS, L. B.; DUBEY, J. P. A survey of the incidence of *Neospora caninum* infection in aborted and stillborn bovine fetuses in England and Wales. **Veterinary Record**, v. 136, p. 602-606, 1995.

OULD-AMROUCHE, A.; KLEIN, F.; OSDOIT, C.; MOHAMED, H. O.; TOURATIER, A.; SANAA, M.; MIALOT, J. P. Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Normandy, France. **Veterinary Research**, v. 30, p. 531-538, 1999.

- PABÓN, M.; LÓPEZ-GATIUS, F.; GARCÍA-ISPIERTO, I.; BECH-SÀBAT, G.; NOGAREDA, C.; ALMERÍA, S. Chronic *Neospora caninum* infection and repeat abortion in dairy cows: A 3-year study. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 40-46, 2007.
- PAN, Y.; JANSEN, G. B.; DUFFIELD, T. F.; HIETALA, S.; KELTON, D.; LIN, C. Y.; PEREGRINE, A. S. Genetic susceptibility to *Neospora caninum* infection in Holstein cattle in Ontario. **Journal Dairy Science**, v. 87, p. 3967-3975, 2004.
- PARADIES, P.; CAPELLI, G.; TESTINI, G.; CANTACESSI, C.; TREES, A. J.; OTRANTO, D. Risk factors for canine neosporosis in farm and kennel dogs in southern Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 240-244, 2007.
- PARÉ, J.; FECTEAU, G.; FORTIN, M.; MARSOLAIS, G. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, p. 1595-1598, 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, n. 2, p. 273-275, 1995.
- PARÉ, J.; THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 60, p. 133-139, 1996.
- PARÉ, J.; THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 82-87, 1997.
- PARISH, S. M.; MAAG-MILLER, L.; BESSER, T. E.; WEINDER, J. P.; MCELWAIN, T.; KNOWLES, D. P.; LEATHERS, C. W. Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 191, p. 1599-1600, 1987.
- PATITUCCI, A. N.; CHARLESTON, W. A.; ALLEY, M. R.; O'CONNOR, R. J.; POMROY, W. E. Serological study of a dairy herd with a recent history of *Neospora* abortion. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 47, p. 28-30, 1999.
- PAYNE, S.; ELLIS, J. Detection of *Neospora caninum* DNA by the polymerase chain reaction. **International Journal for Parasitology**, v. 26, p. 347-351, 1996.
- PEREGRINE, A. S.; DUFFIELD, T. F.; WIDEMAN, G.; KELTON, D.; HOBSON, J.; CRAMER, G.; HIETALA, S. K. Udder health in dairy cattle infected with *Neospora caninum*. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 64, n. 2-4, p. 101-12, 2004.
- PÉREZ-ZABALLOS, F. J.; ORTEGA-MORA, L. M.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; NAVARRO-LOZANO, V.; GARCÍA-VILLADA, L.; COSTAS, E. Adaptation of *Neospora caninum* isolates to cell-culture changes: an argument in favor of its clonal population structure. **Journal of Parasitology**, v. 91, p. 507-510, 2005.

- PEREIRA-BUENO, J.; QUINTANILLA-GOZALO, A.; PEREZ-PEREZ, V.; ESPI-FELGUEROSO, A.; ÁLVAREZ, G.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ORTEGA-MORA, L. M. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 111, p. 143-152, 2003.
- PEREIRA-BUENO, J.; QUINTANILLA-GOZALO, A.; SEIJAS-CARBALFEDO, A.; COSTAS, E.; ORTEGA-MORA, L. M. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: Pattern of transmission and age-related antibody fluctuations. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 906-909, 2000.
- PESCADOR, C. A.; CORBELLINI, L. G.; OLIVEIRA, E. C.; RAYMINDO, D. L.; DRIEMEIER, D. Histopathological and immunohistochemical aspects of *Neospora caninum* diagnosis in bovine aborted fetuses. **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 159-163, 2007.
- PETERS, M.; LUTKEFELS, E.; HECKEROTH, A. R.; SCHARES G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 1144-1148, 2001.
- PFEIFFER, D. V.; WILLIAMSON, N. B.; REICHEL, M. P.; WICHTEL, J. J.; TEAGUE, W. R. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on a dairy farm in New Zealand. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 54, p. 11-24, 2002.
- PIERGILI FIORETTI, D.; ROSIGNOLI, L.; RICCI, G.; MORETTI, A.; PASQUALI, P.; POLIDORI, G. A. *Neospora caninum* infection in a clinically healthy calf: parasitological study and serological follow-up. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 47, p. 47-53, 2000.
- PINITKIATISAKUL, S.; FRIEDMAN, M.; WIKMAN, M.; MATTSSON, J.G.; LÖVGREN-BENGTSSON, K.; STAHL, S.; LUNDÉN, A. Immunogenicity and protective effect against murine cerebral neosporosis of recombinant NcSRS2 in different iscom formulations. **Vaccine**, v. 25, p. 3658-3668, 2007.
- PINITKIATISAKUL, S.; MATTSSON, J. G.; WIKMAN, M.; FRIEDMAN, M.; LÖVGREN-BENGTSSON, K.; STAHL, S.; LUNDÉN, A. Immunisation of mice against neosporosis with recombinant NcSRS2 iscoms. **Veterinary Parasitology**, v. 129, p. 25-34, 2005.
- PIPANO, E.; SHKAP, V.; FISH, L.; SAVITSKY, I.; PERL, S.; ORGAD, U. Susceptibility of *Psammomys obesus* and *Meriones tristrami* to tachyzoites of *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, v. 88, p. 314-319, 2002.
- PITEL, P. H.; PRONOST, S.; CHATAGNON, G.; TAINTURIER, D.; FORTIER, G.; BALLET, J. J. Neosporosis in bovine dairy herds from the west of France: Detection of *Neospora caninum* DNA in aborted fetuses, seroepidemiology of *N. caninum* in cattle and dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 102, p. 269-277, 2001.
- POPE, G. S.; GUPTA, S. K.; MUNRO, I. B. Progesterone levels in the systemic plasma of pregnant, cycling and ovariectomised cows. **Journal of the Society for Reproduction and Fertility**, v. 20, p. 369-381, 1969.
- QUINN, H. E.; MILLER, C. M. D.; ELLIS, J. T. The cell-mediated immune response to *Neospora caninum* during pregnancy in the mouse is associated with bias towards production of interleukin-4. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 723-732, 2004.

QUINN, H. E.; MILLER, C. M. D.; RYCE, C.; WINDSOR, P. A.; ELLIS, J. T. Characterisation of an outbred pregnant mouse model of *Neospora caninum* infection. **Journal of Parasitology**, v. 88, p. 691-696, 2002.

RAMAMOORTHY, S.; SRIRANGANATHAN, N.; LINDSAY, D. S. Gerbil model of acute neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 111-114, 2005.

RAMAMOORTHY, S.; LINDSAY, D. S.; SCHURIG, G. G.; BOYLE, S. M.; DUNCAN, R. B.; VEMULAPALLI, R.; SRIRANGANATHAN, N. Vaccination with c-Irradiated *Neospora caninum* Tachyzoites Protects Mice Against Acute Challenge with *N. caninum*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 151-156, 2006.

RAMAMOORTHY, S.; SANAKKAYALA, N.; VEMULAPALLI, R.; DUNCAN, R. B.; LINDSAY, D. S.; SCHURIG, G. S.; BOYLE, S. M.; KASIMANICKAM, R.; SRIRANGANATHAN, N. Prevention of lethal experimental infection of C57BL/6 mice by vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 expressing *Neospora caninum* antigens. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1521-1529, 2007a.

RAMAMOORTHY, S.; SANAKKAYALA, N.; VEMULAPALLI, R.; JAIN, N.; LINDSAY, D. S.; SCHURIG, G. S.; BOYLE, S. M.; SRIRANGANATHAN, N. Prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in C57BL/6 mice vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51 expressing *Neospora caninum* protective antigens. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1531-1538, 2007b.

RAZMI, G. R.; ZAREA, H.; NASERI, Z. A survey of *Neospora caninum*-associated bovine abortion in large dairy farms of Mashhad, Iran. **Parasitology Research**, v. 106, p. 1419-1423, 2010.

REES, S.; STRINGER, M.; JUST, Y.; HOOPER, S. B.; HARDIN, R. The vulnerability of the fetal sheep brain to hypoxemia at mild-gestation. **Development Brain Reseach**, v. 103, p. 103-118, 1997.

REGIDOR-CERRILLO, J.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.; PEREIRA-BUENO, J.; ADURIZ, G.; NAVARRO-LOZANO, V.; RISCO-CASTILLO, V.; FÉRNANDEZ-GARCÍA, A.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; ORTEGA-MORA, L. M. Isolation and genetic characterization of *Neospora caninum* from asymptomatic calves in Spain. **Parasitology**, v. 135, p. 1651-1659, 2008

REICHEL, M. P. *Neospora caninum* infections in Australia and New Zealand. **Australian Veterinary Journal**, v. 78, p. 258-261, 2000.

REICHEL, M. P.; DRAKE, J. M. The diagnosis of *Neospora* abortions in cattle. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 44, p. 151-154, 1996.

REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. If control of *Neospora caninum* infections is technically feasible does it make economic sense? **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 23-34, 2006.

- REITT, K.; HILBE, M.; VOEGTLIN, A.; CORBOZ, L.; HAESSIG, M.; POSPISCHIL, A. Aetiology of Bovine Abortion in Switzerland from 1986 to 1995 - A Retrospective Study with Emphasis on Detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* by PCR. **Journal of Veterinary Medicine A**, v. 54, p. 15-22, 2007.
- RINALDI, L.; FUSCO, G.; MUSELLA, V.; VENEZIANO, V.; GUARINO, A.; TADDEI, R.; CRINGOLI, G. *Neospora caninum* in pastured cattle: determination of climatic, environmental, farm management and individual risk factors using remote sensing and geographic information systems. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 219- 230, 2005.
- RITTER, D. M.; KERLIN, R.; SIBERT, G.; BRAKE, D. Immune factors influencing the course of infection with *Neospora caninum* in the murine host. **Journal of Parasitology**, v. 88, p. 271-280, 2002.
- ROJO-MONTEJO, S.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; MARUGAN-HERNÁNDEZ, V.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; BLANCO-MURCIA, J.; PRENAFETA, A.; ORTEGA-MORA, L. M. Isolation and characterization of a bovine isolate of *Neospora caninum* with low virulence. **Veterinary Parasitology**, v. 159, p. 7-16, 2009.
- ROMERO, J. J.; FRANKENA, K. The effect of the dam-calf relationship on serostatus to *Neospora caninum* on 20 Costa Rican dairy farms. **Veterinary Parasitology**, v. 114, p. 159-171, 2003.
- ROMERO, J. J.; PÉREZ, E.; FRANKENA, K. Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 149-159, 2004.
- ROMERO, J. J.; VAN BREDA, S.; VARGAS, B.; DOLZ, G.; FRANKENA, K. Effect of neosporosis on productive and reproductive performance of dairy cattle in Costa Rica. **Theriogenology**, v. 64, p. 1928-1939, 2005.
- ROSBOTTOM, A.; GIBNEY, E. H.; GUY, C. S.; KIPAR, A.; SMITH, R. F.; KAISER, P.; TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. 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**, v. 76, n. 6, p. 2352-2361, 2008.
- SADREBAZZAZ, A.; HABIBI, G.; HADDADZADEH, H.; ASHRAFI, J. Evaluation of bovine abortion associated with *Neospora caninum* by different diagnostic techniques in Mashhad, Iran. **Parasitology Research**, v. 100, p. 1257-1260, 2007.
- SAGER, H.; FISCHER, I.; FURRER, K.; STRASSER, M.; WALDVOGEL, A.; BOERLIN, P.; AUDIGÉ, L.; GOTTSTEIN, B. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. **Veterinary Parasitology**, v. 102, p. 1-15, 2001.
- SÁNCHEZ, G. F.; MORALES, S. E.; MARTINEZ, M. J.; TRIGO, J. F. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 67, n. 2, p. 142-145, 2003.

SÁNCHEZ, G. F. D.; BANDA, R. V. M.; SAHAGUN, R. A.; LEDESMA, M. N.; MORALES, S. E. Comparison between immunohistochemistry and two PCR methods for detection of *Neospora caninum* in formalin-fixed and paraffin-embedded brain tissue of bovine fetuses. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 328-332, 2009.

SANDERSON, M. W.; GAY, J. M.; BASZLER, T. V. *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. **Veterinary Parasitology**, v. 90, p. 15-24, 2000.

SANTOLARIA, P.; LÓPEZ-GATIUS, F.; YÁNIZ, J.; GARCÍA-ISPIERTO, I.; NOGAREDA, C.; BECH-SÀBAT, G.; SERRANO, B.; ALMERIA, S. Early postabortion recovery of *Neospora*-infected lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 72, p. 798-802, 2009.

SAWADA, M.; KONDO, H.; TOMIOKA, Y.; PARK, C. H.; MORITA, T.; SHI-MADA, A.; UMEMURA, T. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. **Veterinary Parasitology**, v. 90, p. 247-252, 2000.

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

SCHARES, G.; BÄRWALD, A.; STAUBACH, C.; SÖNDGEN, P.; RAUSER, M.; SCHRÖDER, R.; PETERS, M.; WURM, R.; SELHORST, T.; CONRATHS, F. J. P38-avidity-ELISA: Examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p. 293-305, 2002.

SCHARES, G.; BÄRWALD, A.; STAUBACH, C.; ZILLER, M.; KLÖSS, D.; SCHRODER, R.; LABOHM, R.; DRÄGER, K.; FASEN, W.; HESS, R. G.; CONRATHS, F. J. Potential risk factors for bovine *Neospora caninum* infection in Germany are not under the control of the farmers. **Parasitology**, v. 129, p. 301-309, 2004.

SCHARES, G.; BÄRWALD, A.; STAUBACH, C.; ZILLER, M.; KLÖSS, D.; WURM, R.; RAUSER, M.; LABOHM, R.; DRÄGER, K.; FASEN, W.; HESS, R. G.; CONRATHS, F. J. Regional distribution of bovine *Neospora caninum* infection in the German state of Rhineland-Palatinate modelled by logistic regression. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 1631-1640, 2003.

SCHARES, G.; CONRATHS, F. J.; REICHEL, M. P. Bovine neosporosis: Comparison of serological methods using outbreak sera from a dairy herd in New Zealand. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1659-1667, 1999a.

SCHARES, G.; PANTCHEV, N.; BARUTZKI, D.; HEYDDORN, A. O.; BAUER, C.; CONRATHS, F. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 14, p. 1525-1537, 2005.

SCHARES, G.; PETERS, M.; WURM, R.; BÄRWALD, A.; CONRATHS, F. J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. **Veterinary Parasitology**, v. 80, p. 87-98, 1998.

- SCHARES, G.; RAUSER, M.; ZIMMER, K.; PETERS, M.; WURM, R.; DUBEY, J. P.; DE GRAAF, D. C.; EDELHOFER, R.; MERTENS, C.; HESS, G.; CONRATHS, F. J. Serological differences in *Neospora caninum*-associated epidemic and endemic abortions. **Journal of Parasitology**, v. 85, p. 688-694, 1999b.
- SCHOCK, A.; BUXTON, D.; SPENCE, J. A.; LOW, J. C.; BAIRD, A. Histopathological survey of aborted bovine fetuses in Scotland with special reference to *Neospora caninum*. **Veterinary Record**, v. 147, p. 687-688, 2000.
- SCHOCK, A.; INNES, E. A.; YAMANE, I.; LATHAM, S. M.; WASTLING, J. M. Genetic and biological diversity among isolates of *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 123, p. 13-23, 2001.
- SCOTT, H. M.; SORENSEN, O.; WU, J. T. Y.; CHOW, E. Y. W.; MANNINEN, K.; VANLEEUEWEN, J. A. Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, *Neospora caninum*, Bovine leukemia virus, and Bovine viral diarrhea virus infection among dairy cattle and herds in Alberta and agroecological risk factors associated with seropositivity. **Canadian Veterinary Journal**, v. 47, p. 981-991, 2006.
- SERRANO, E.; FERRE, I.; OSORO, K.; ADURIZ, G.; MATEOS-SANZ, A.; MARTÍNEZ, A.; ATXAERANDIO, R.; HIDALGO, C. O.; ORTEGA-MORA, L. M. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 197-203, 2006.
- SERRANO-MARTÍNEZ, E.; FERRE, I.; MARTÍNEZ, A.; OSORO, K.; MATEOS-SANZ, A.; DEL-POZO, I.; ADURIZ, G.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C. O.; ORTEGA-MORA, L. M. Experimental neosporosis in bulls: Parasite detection in semen and blood and specific antibody and interferon-gamma responses. **Theriogenology**, v. 67, p. 1175-1184, 2007a.
- SERRANO-MARTÍNEZ, E.; FERRE, I.; OSORO, K.; ADURIZ, G.; MOTA, R. A.; MARTÍNEZ, A.; DEL-POZO, I.; HIDALGO, C. O.; ORTEGA-MORA, L. M. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. **Theriogenology**, v. 67, p. 729-737, 2007b.
- SHARMA, R. P. Immunotoxicity of mycotoxins. **Journal Dairy Science**, v. 78, p. 892-897, 1993.
- SHIBAHARA, T.; KOKUHO, T.; ETO, M.; HARITANI, M.; HAMAOKA, T.; SHIMURA, K.; NAKAMURA, K.; YOKOMIZO, Y.; YAMANE, I. Pathological and immunological findings of athymic nude and congenic wild type BALB/c mice experimentally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Pathology**, v. 36, p. 321-327, 1999.
- SHIVAPRASAD, H. L.; ELY, R.; DUBEY, J. P. A *Neospora*-like protozoon found in an aborted bovine placenta. **Veterinary Parasitology**, v. 34, p. 145-148, 1989.
- SLAPETA, J. R.; KOUDELA, B.; VOTYPKA, J.; MODRY, D.; HOREJS, R.; LUKES, J. Coprodiagnosis of *Hammondia heydorni* in dogs by PCR based amplification of ITS 1 rRNA: differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*. **Veterinary Journal**, v. 163, p. 147-154, 2002a.

SLAPETA, J. R.; MODRY, D.; KYSELOVA, I.; HOREIS, R.; LUKES, J.; KOUDELA, B. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 157-167, 2002b.

SLOTVED, H. C.; JENSEN, L.; LIND, P. Comparison of the IFAT and Iscom-ELISA response in bovine foetuses with *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1165-1174, 1999.

SÖNDGEN, P.; PETERS, M.; BÄRWALD, S.; WURM, R.; HOLLING, E.; CONRATHS, F. J.; SCHARES, G. Bovine neosporosis: Immunoblot improves foetal serology. **Veterinary Parasitology**, v. 102, p. 279-290, 2001.

SPEER, C. A.; DUBEY, J. P. Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum*. **Journal Protozoology**, v. 36, p. 458-463, 1989.

STÅHL, K.; BJÖRKMAN, C.; EMANUELSON, U.; RIVERA, H.; ZELADA, A.; MORENO-LÓPEZ, J. A prospective study of the effect of *Neospora caninum* and BVDV infections on bovine abortions in a dairy herd in Arequipa, Peru. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 75, p. 177-188, 2006.

STENLUND, S.; KINDAHL, H.; MAGNUSSON, U.; UGGLA, A.; BJÖRKMAN, C. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 85, p. 227-234, 1999.

STENLUND, S.; KINDAHL, H.; UGGLA, A.; BJÖRKMAN, C. A long-term study of *Neospora caninum* infection in a Swedish Dairy Herd. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 44, p. 63-71, 2003.

STOTT, G. H.; MARX, D. B.; MENEFEY, B. E.; NIGHTENGAL, G. T. Colostral immunoglobulin transfer in calves. I. Period of absorption. **Journal Dairy Science**, v. 62, p. 1632-1638, 1979.

STROHBUSCH, M.; MÜLLER, N.; HEMPHILL, A.; GREIF, G.; GOTTSTEIN, B. NCGR2 as a molecular target to assess the parasitocidal activity of toltrazuril against *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 135, p. 1065-1073, 2008.

STROHBUSCH, M.; MÜLLER, N.; HEMPHILL, A.; KREBBER, R.; GREIF, G.; GOTTSTEIN, B. Toltrazuril treatment of congenitally acquired *Neospora caninum* infection in newborn mice. **Parasitology Research**, v. 104, p. 1335-1343, 2009.

SZEKERES-BARTHO, J.; BARAKONYI, A.; PAR, G.; POLGAR, B.; PALKOVICS, T.; SZEREDAY, L. Progesterone as an immunomodulatory molecule. **International Immunopharmacology**, v. 1, p. 1037-1048, 2001.

TANAKA, T.; HAMADA, T.; INOUE, N.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; SUZUKI, N.; MIKAMI, T. The role of CD4(+) or CD8(+) T cells in the protective immune response of BALB/c mice to *Neospora caninum* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 90, p. 183-191, 2000.

THILSTED, J. P.; DUBEY, J. P. Neosporosis-like abortion in a herd of dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 1, p. 205-209, 1989.

THOMPSON, G.; CANADA, N.; DO CARMO TOPA, M.; SILVA, E.; VAZ, F.; ROCHA, A. First confirmed case of *Neospora caninum*-associated abortion outbreak in Portugal. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 309-312, 2001.

THORNTON, R. N.; GAJADHAR, A.; EVANS, J. *Neospora* abortion epidemic in a dairy herd. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 42, p. 190-191, 1994.

THORNTON, R. N.; THOMPSON, E. J.; DUBEY, J. P. *Neospora* abortion in New Zealand cattle. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 39, p. 129-133, 1991.

THRUSFELD M. Veterinary epidemiology. 2. ed. Oxford: Blackwell Science, 1997.

THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 1559-1562, 1996.

THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, p. 1381-1385, 1997a.

THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Strategies to control *Neospora* infection in cattle. **Bovine Practitioner**, v. 29, p. 60-63, 1995.

THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 210, p. 672-674, 1997b.

THURMOND, M. C.; ANDERSON, M. L.; BLANCHARD, P. C. Secular and seasonal trends of *Neospora* abortion in California dairy cows. **Journal of Parasitology**, v. 81, p. 364-367, 1995.

THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K.; BLANCHARD, P. C. Herd-based diagnosis of *Neospora caninum*-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, p. 44-49, 1997.

TIWARI, A.; VANLEEUEWEN, J. A.; DOHOO, I. R.; KEEFE, G. P.; HADDAD, J. P.; TREMBLAY, R.; SCOTT, H. M.; WHITING, T. Production effects of pathogens causing Bovine Leukosis, Bovine Viral Diarrhea, Paratuberculosis, and Neosporosis. **Journal Dairy Science**, v. 90, p. 659-669, 2007.

TIWARI, A.; VANLEEUEWEN, J. A.; DOHOO, I. R.; STRYHN, H.; KEEFE, G. P.; HADDAD, J. P. Effects of seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* on culling in dairy cattle in four Canadian provinces. **Veterinary Microbiology**, v. 109, p. 147-158, 2005.

TIZARD, I. R. Imunologia Veterinária: uma introdução. 6. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2002.

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

TREES, A. J.; MCALLISTER, M. M.; GUY, C. S.; MCGARRY, J. W.; SMITH, R. E.; WILLIAMS, D. J. L. *Neospora caninum*: Oocyst challenge of pregnant cows. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 147-154, 2002.

TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. Neosporosis in the United Kingdom. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 891-893, 2000.

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

UGGLA, A.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O. J. M.; JAKUBEK, E. B.; THEBO, P.; KINDAHL, H.; BJÖRKMAN, C. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1467-1472, 1998.

VÁCLAVEK, P.; KOUDELA, B.; MODRÝ, D.; SEDLÁK, K. Seroprevalence of *Neospora caninum* in aborting dairy cattle in the Czech Republic. **Veterinary Parasitology**, v. 115, n. 3, p. 239-45, 2003.

VANLEEUEWEN, J. A.; HADDAD, J. P.; DOHOO, I. R.; KEEFE, G. P.; TIWARI, A.; SCOTT, H. M. Risk factors associated with *Neospora caninum* seropositivity in randomly sampled Canadian dairy cows and herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 93, p. 129-138, 2010.

VEMULAPALLI, R.; SANAKKAYALA, N.; GULANI, J.; SCHURIG, G. G.; BOYLE, S. M.; LINDSAY, D. S.; SRIRANGANATHAN, N. Reduced cerebral infection of *Neospora caninum* in BALB/c mice vaccinated with recombinant *Brucella abortus* RB51 strains expressing *N. caninum* SRS2 and GRA7 proteins. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 219-230, 2007.

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

WALDNER, C. L. Serological status for *N. caninum*, bovine viral diarrhea virus, and infectious bovine rhinotracheitis virus at pregnancy testing and reproductive performance in beef herds. **Animal Reproduction Science**, v. 90, p. 219-242, 2005.

WALDNER, C. L.; CUNNINGHAM, G.; CAMPBELL, J. R. Agreement between three serological tests for *Neospora caninum* in beef cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, p. 313-315, 2004.

WALDNER, C. L.; HENDERSON, J.; WU, J. T. Y.; BREKER, K.; CHOW, E. Y. W. Reproductive performance of a cow-calf herd following a *Neospora caninum*-associated abortion epidemic. **Canadian Veterinary Journal**, v. 42, p. 355-360, 2001a.

WALDNER, C. L.; HENDERSON, J.; WU, J. T. Y.; COUPLAND, R.; CHOW, E. Y. W. Seroprevalence of *Neospora caninum* in beef cattle in northern Alberta. **Canadian Veterinary Journal**, v. 42, p. 130-132, 2001b.

WALDNER, C. L.; JANZEN, E. D.; HENDERSON, J.; HAINES, D. M. Outbreak of abortion associated with *Neospora caninum* infection in a beef herd. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 215, p. 1485-1490, 1999.

WALDNER, C. L.; JANZEN, E. D.; RIBBLE, C. S. Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, p. 685-690, 1998.

WAPENAAR, W.; JENKINS, M. C.; O'HANDLEY, R. M.; BARKEMA, H. W. *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. 1270-4, 2006.

WESTON, J. F.; WILLIAMSON, N. B.; POMROY, W. E. Associations between pregnancy outcome and serological response to *Neospora caninum* among a group of dairy heifers. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 53, p. 142-148, 2005.

WILLIAMS, D. J. L.; GUY, C. S.; MCGARRY, J. W.; GUY, F.; TASKER, L.; SMITH, R. F.; MACEACHERN, K.; CRIPPS, P. J.; KELLY, D. F.; TREES, A. J. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: The time of experimentally- induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. **Parasitology**, v. 121, p. 347-358, 2000.

WILLIAMS, D. J. L.; GUY, C. S.; SMITH, R. F.; GUY, F.; MCGARRY, J. W.; MCKAY, J. S.; TREES, A. J. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 1059-1065, 2003.

WILLIAMS, D. J. L.; GUY, C. S.; SMITH, R. F.; ELLIS, J.; BJÖRKMAN, C.; REICHEL, M. P.; TREES, A. J. Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 1343-1348, 2007.

WOODBINE, K. A.; MEDLEY, G. F.; MOORE, S. J.; RAMIREZ-VILLAESCUSA, A.; MASON, S.; GREEN, L. E. A four year longitudinal sero-epidemiology study of *Neospora caninum* in adult cattle from 114 cattle herds in south west England: Associations with age, herd and dam-offspring pairs. **Veterinary Research**, v. 4, p. 1-12, 2008.

WOUDA, W.; DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 545-547, 1997a.

WOUDA, W.; MOEN, A. R.; VISSER, I. J. R.; VANKNAPEN, F. Bovine fetal neosporosis: A comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, p. 180-185, 1997b.

WOUDA, W.; BARTELS, C. J. M.; MOEN, A. R. Characteristics of *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995-1997). **Theriogenology**, v. 52, p. 233-245, 1999a.

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

WOUDA, W.; MOEN, A. R.; SCHUKKEN, Y. H. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. **Theriogenology**, v. 49, p. 1311-1316, 1998.

YAEGER, M. J.; SHAWD-WESSELS, S.; LESLIE-STEEN, P. *Neospora* abortion storm in a midwestern dairy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 506-508, 1994.

YAMANE, I.; SHIBAHARA, T.; KOKUHO, T.; SHIMURA, K.; HAMAOKA, T.; HARITANI, M.; CONRAD, P. A.; PARK, C. H.; SAWADA, M.; UMEMURA, T. An improved isolation technique for bovine *Neospora* species. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, p. 364-368, 1998.

YAMAGE, M.; FLECHTNER, O.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum*: Specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). **Journal of Parasitology**, v. 82, p. 272-279, 1996.

YAMANE, I.; KITANI, H.; KOKUHO, T.; SHIBAHARA, T.; HARITANI, M.; HAMAOKA, T.; SHIZUMI, S.; KOIWAI, M.; SHIMURA, K.; YOKOMIZO, Y. The inhibitory effect of interferon gamma and tumour necrosis factor alpha on intracellular multiplication of *Neospora caninum* in primary bovine brain cells. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, p. 347-351, 2000.

YAO, L.; YANG, N.; LIU, Q.; WANG, M.; ZHANG, W.; QIAN, W. F.; HU, Y. F.; DING, J. Detection of *Neospora caninum* in aborted bovine fetuses and dam blood samples by nested PCR and ELISA and seroprevalence in Beijing and Tianjin, China. **Parasitology**, v. 136, p. 1251-1256, 2009.

ANEXOS

ANEXO A

379

Perfil sorológico dos anticorpos colostrais para *Neospora caninum* em bezerros livres da infecção

José Márcio S. CARDOSO¹
Mikaela Renata FUNADA¹
Rodrigo Martins SOARES¹
Solange Maria GENNARI¹

1 - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São
Paulo, São Paulo-SP

Correspondência para :
Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87,
Cidade Universitária, 05508-000, São
Paulo-SP; sgennari@usp.br

Recebido para publicação: 04/12/2007
Aprovado para publicação: 29/05/2008

Resumo

Neospora caninum é considerado a principal causa de aborto bovino mundial. O diagnóstico laboratorial correto é muito importante para identificar os animais infectados e para aplicar medidas de controle. O objetivo deste trabalho foi mostrar o declínio de anticorpos colostrais em bezerros. Este estudo empregou oito bezerros holandeses, recém-nascidos, machos, descendentes de vacas soronegativas para *N. caninum*. Amostra de sangue pré-colostroal foram colhidas destes bezerros e todos estavam soronegativos para *N. caninum*. Estes bezerros foram alimentados com dois litros de um pool de colostro de vacas soropositivas dentro de duas horas após o nascimento. Amostras de sangue dos bezerros foram colhidas semanalmente até os animais soroconverterem negativo. As amostras foram testadas para anticorpos de *N. caninum* usando teste de imunofluorescência indireta nos títulos de 1:50; 1:100 e 1:200. Os resultados mostraram que 3 dos 8 bezerros não soroconverteram e foram excluídos do estudo. Os restantes cinco bezerros soroconverteram em todos os títulos no quinto dia após a inoculação. No título 1:50, um bezerro permaneceu positivo por 21 semanas, dois por 20 semanas e um por 13 semanas. No título 1:100, um bezerro foi positivo por 15 semanas e o restante quatro bezerros por 13 semanas. No título 1:200, cada bezerro foi positivo por 1; 7; 12; 12 e 13 semanas, respectivamente. Estes resultados demonstram que o anticorpo colostroal para *N. caninum* pode permanecer até 21 semanas após o nascimento nos bezerros e é muito importante excluir os bezerros até quatro meses de idade nos estudos de soroprevalência para impedir os resultados falso-positivos.

Palavras-chave:
Neospora.
Bovinos.
Bezerros.
Colostro.
Sorologia.

Introdução

Deste seu primeiro reconhecimento em 1984 em cães na Noruega¹ e a descrição de um novo gênero e espécie *Neospora caninum*², este coccídeo tem emergido como um sério problema mundial em cães e bovinos³. Estudos demonstraram que cães^{4,5,6} e coiotes⁷ são hospedeiros definitivos para *N. caninum*.

Em bovinos, transmissão vertical ou congênita do *N. caninum* é considerada a via de transmissão mais importante, onde até 95% dos bezerros nascidos de vacas soropositivas foram infectados congenitamente e clinicamente

normais.^{8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22}

Estudos sorológicos têm demonstrado evidências de transmissão horizontal através da falta de associação entre o status sorológico dos pares mães-filhas, da diferença da soroprevalência entre grupos de diferentes faixas etárias ou de lotes de separação; soroconversões; respostas sorológicas transitórias; curva epidêmica durante um surto de aborto associado ao *N. caninum* e infecção aguda baseada no ELISA avidéz.^{14,15,17,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38}

Existe evidência em camundongos sugerindo que a transmissão lactogênica de *N. caninum* pode ocorrer, como demonstrado por Cole et al.³⁹ em um dos

51 camundongos lactentes de uma fêmea infectada experimentalmente. Transmissão lactogênica de *N. caninum* foi demonstrada experimentalmente em bezerros recém-nascidos alimentados com colostro ou leite inoculados com taquizoítas^{40,41}, mas, não há evidências, de que ocorra transmissão em infecções naturais⁴¹.

A alimentação de bovinos recém-nascidos com *pool* de colostro e leite é uma prática bastante utilizada em propriedades leiteiras em algumas regiões do Brasil e do mundo e o conhecimento do perfil dos anticorpos contra *N. caninum* em bezerros leiteiros é de grande importância para a interpretação de dados sorológicos obtidos em bovinos jovens. Assim o objetivo deste estudo foi determinar, em neonatos bovinos soronegativos para *N. caninum*, o perfil dos anticorpos anti-*N. caninum* adquiridos passivamente pelo colostro.

Material e Método

O estudo foi conduzido no *Campus* Administrativo da Universidade de São Paulo, no município de Pirassununga, SP. Foram empregados oito bezerros holandeses, recém-nascidos, machos, filhos de vacas soronegativas para *N. caninum* pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com título ≤ 25 . As vacas doadoras de colostro (cinco animais) eram soropositivas para *N. caninum* (RIFI >100). O colostro desses animais foi colhido, identificado, acondicionado em frascos apropriados e armazenado à -20°C até a sua utilização.

Os bezerros recém nascidos não foram alimentados com leite ou colostro materno ou de outro animal, recebendo, em até 2 horas após o nascimento, oralmente, através de mamadeiras, dois litros do colostro previamente obtido para este estudo.

Antes da administração do colostro, uma amostra de sangue foi colhida para confirmar que anticorpos anti-*N. caninum* não estavam presentes. Estes animais foram mantidos em baias coletivas com quatro bezerros por baia e receberam leite em pó

comercial até o desmame, aos 60 dias de idade. Ração comercial e feno foram fornecidos em quantidades adequadas à idade e água *ad libitum*. Estes procedimentos tiveram por finalidade impedir possíveis infecções pelo *N. caninum* após o nascimento.

Amostras de sangue foram colhidas um dia após a ingestão do colostro e depois uma vez por semana de todos os animais para acompanhamento dos níveis de anticorpos séricos anti-*N. caninum*. A técnica utilizada foi a RIFI segundo metodologia descrita por Dubey et al.⁴². Todas as amostras foram processadas em três diluições: 1:50, 1:100 e 1:200 e soros bovinos controles positivos e negativos foram processados. Amostras de sangue foram colhidas até que todos os animais apresentassem resultados negativos, em todas as diluições, por três semanas consecutivas, quando os animais foram considerados negativos.

Resultados e Discussão

Todas as cinco vacas doadoras de colostro apresentaram anticorpos anti-*N. caninum* com título de 1:100. Os bezerros usados no estudo e suas respectivas mães estavam negativas pela RIFI com título ≤ 25 , quando do nascimento.

A tabela 1 apresenta os resultados da sorologia dos bezerros durante as 24 semanas de observação. Os bezerros número 2, 3 e 4 receberam colostro da vaca 5729; os bezerros 1 e 5 das vacas 3287 e 5807, respectivamente. Três bezerros não soroconverteram, dos quais dois haviam sido alimentados com colostro da mesma vaca (4060) e o outro com colostro da vaca 3118. Estes três bezerros que não soroconverteram nas quatro primeiras amostragens foram retirados do estudo.

Após sete dias da administração do colostro cinco bezerros tinham anticorpos anti-*N. caninum* pela RIFI nas três diluições estudadas. Com exceção do bezerro número 5, que se tornou negativo da diluição 1:200 na segunda semana pós-colostro, os outros bezerros apresentavam títulos nas três diluições até a sétima semana. Algumas

Tabela 1 – Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta, (P – Positivo; N – negativo) nas diluições de 1:50, 1:100 e 1:200, dos soros de bezerros negativos e alimentados com colostro de vacas positivas para *Neospora caninum*, nas primeiras 24 semanas de vida

SEMANA	NÚMERO DOS BEZERROS														
	1			2			3			4			5		
	1:50	1:100	1:200	1:50	1:100	1:200	1:50	1:100	1:200	1:50	1:100	1:200	1:50	1:100	1:200
1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
4	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
5	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
6	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
7	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
8	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
9	P	P	N	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P	N	N
10	P	P	N	P	P	N	P	P	N	P	P	P	P	N	N
11	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
12	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
13	P	P	N	P	P	N	P	P	N	P	P	P	P	P	N
14	P	P	N	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
15	P	P	N	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
16	P	N	N	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
17	P	N	N	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
18	P	N	N	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
19	P	N	N	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
20	P	N	N	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
21	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
22	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
23	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
24	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

oscilações foram observadas, em especial na diluição 1:200, com animais com resultados negativos por uma ou duas semanas, positivando novamente na terceira. Entretanto os animais só foram considerados negativos, para cada um dos títulos, quando se apresentavam negativos por três semanas consecutivas. Na diluição 1:50, o bezerro 4 manteve-se positivo por 21 semanas; os bezerros 1 e 2 por 20 semanas e os outros dois por 13 semanas. Na diluição 1:100, o bezerro 1 manteve-se positivo por 15 semanas e os outros quatro por 13 semanas. Na diluição 1:200, o bezerro 5 apresentou títulos de anticorpos por uma semana e os bezerros 1, 2, 3 e 4 por 7, 12, 12 e 13 semanas, respectivamente.

Segundo Tizard⁴³, a falha da transferência de anticorpos maternos através do colostro pode ocorrer por produção de colostro insuficiente ou de má qualidade pela mãe; falha de ingestão por parte do animal recém-nascido e/ou falha de absorção dos anticorpos através do epitélio intestinal, fatos que podem ter ocorrido neste estudo.

Em ruminantes, a placenta não permite a transferência de imunoglobulina

materna para a circulação fetal, por isso qualquer anticorpo no soro pré-colostroal é derivado do feto que indica uma resposta imune ativa contra a invasão do parasito. Durante as primeiras 24-36 horas de vida o bezerro é hábil pra absorver imunoglobulinas do leite da mãe através do intestino e, conseqüentemente, os anticorpos têm especificidade idêntica da mãe⁴⁴. Hietala e Thurmond²⁸ e Innes et al.⁴⁵ usando bezerros soronegativos pré-colostroal nascidos de vacas soropositivas que soroconverteram após a ingestão de colostro demonstraram que a resposta de anticorpos anti-*N. caninum* declinou ao redor de 19,6 dias e 21 dias após o nascimento, respectivamente.

Hietala e Thurmond²⁸ relataram que bezerros nascidos negativos e que receberam colostro de vacas *N. caninum* positivas, tornaram-se soropositivos e os anticorpos colostrais declinaram aos 128 dias após o nascimento, isto é ao redor da 18ª semana após o nascimento. Estes resultados foram semelhantes aos do presente estudo, no qual na semana 21 foi observado o desaparecimento dos anticorpos colostrais

em todos os bezerros na menor diluição utilizada na RIFI.

No trabalho realizado por Hietala e Thurmond²⁸, 17 dos 284 bezerros classificados como negativos para *N. caninum* soroconverteram e 13 destas soroconversões ocorreram no período neonatal seguido da ingestão de colostro, no qual as mães de nove bezerros eram soropositivos, uma soronegativa e três não tinham o diagnóstico. Assim, foi sugerido que os bezerros que soroconverteram podem ter sido infectados durante os primeiros meses de vida; infectados congenitamente, mas não tiveram uma resposta de anticorpos detectáveis no nascimento e a sensibilidade e especificidade do teste empregado pode ter influenciado no diagnóstico da soroconversão, como também mostrado por Davison, Guy e Otter¹⁷.

Conclusões

Estes resultados mostram que bezerros recém-nascidos soronegativos pré-colostrais quando alimentados com colostro de diferentes vacas podem apresentar resultados sorológicos positivos para *N. caninum* devido à absorção de anticorpos colostrais. Este encontro em bezerros com até quatro meses de idade deve ser sempre interpretado com grande cautela, em especial em animais alimentados com *pool* de colostro, nos quais não se pode identificar com exatidão as vacas doadoras. Exames pareados bezerros e suas mães são importantes para melhor avaliação dos resultados da sorologia, entretanto nas propriedades que utilizam *pool* de colostro, a avaliação sorológica dos bezerros só deve ser realizada em animais com idade mínima de quatro meses.

Serological profile of colostral antibodies to *Neospora caninum* in infection free calves

Abstract

Neospora caninum is considered the main cause of bovine abortion worldwide. The correct laboratorial diagnose is very important to identify the infected animals and to apply control measure. The objective of this study was to show the persistence period of colostral antibodies in calves. Eight newborn Holstein Friesian calves, males, were selected from *N. caninum* soronegative dams. Pre-colostral blood samples were collected of these calves and all of them were seronegative to *N. caninum*. They were fed with two liters of pooled colostrum from seropositive cows within two hours after birth. Blood samples were collected and tested weekly until the animals turned negative. Serum samples were tested for antibodies to *N. caninum* using indirect fluorescence antibody test at 1:50; 1: 100 and 1:200 dilutions. Antibodies were not detected from three out of eight calves and they were excluded from the study. The remaining 5 calves seroconverted in all dilutions at the fifth day after colostrums ingestion. At 1:50 dilution, one calf remained positive for 21 weeks, two for 20 weeks and one for 13 weeks. At 1:100, one calf was positive for 15 weeks and the remaining 4 calves for 13 weeks. At 1:200, each calf was positive for 1, 7, 12, 12 and 13 weeks, respectively. These results demonstrate that the colostral antibody to *N. caninum* may persist until 21 weeks after birth in calves and it's very important to exclude the calves at the first month of age in the seroprevalence studies to avoid the false-positive results.

Key words:
Neospora.
Bovine.
Calves.
Colostrum.
Serology.

Referências

- 1 BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Zeitschrift fuer Parasitenkunde*, v. 70, p. 271-274, 1984.
- 2 DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 192, p. 1269-1285, 1988.
- 3 DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean Journal of Parasitology*, v. 41, p. 1-16, 2003.
- 4 MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; MCGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, v. 28, p. 1473-1478, 1998.
- 5 LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, v. 82, p. 327-333, 1999.
- 6 LINDSAY, D. S.; UPTON, S. J.; DUBEY, J. P. A structural study of the *Neospora caninum* oocysts. *International Journal for Parasitology*, v. 29, p. 1521-1523, 1999.
- 7 GONDIM, L. P.; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, v. 34, p. 159-161, 2004.
- 8 PARÉ, J.; THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 60, p. 133-139, 1996.
- 9 BJÖRKMAN, C.; JOHANSSON, O.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O. J. M.; UGGLA, A. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 208, p. 1441-1444, 1996.
- 10 ANDERSON, M. L.; REYNOLDS, J. P.; ROWE, J. D.; SVERLOW, K. W.; PACKHAM, A. E.; BARR, B. C.; CONRAD, P. A. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. infection in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 210, p. 1169-1172, 1997.
- 11 PARÉ, J.; THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *Journal of Parasitology*, v. 83, p. 82-87, 1997.
- 12 THURMOND, M. C.; HIETALA, S. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *American Journal of Veterinary Research*, v. 58, p. 1381-1385, 1997.
- 13 SCHARES, G.; PETERS, M.; WURM, R.; BÄRWALD, A.; CONRATHS, F. J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Veterinary Parasitology*, v. 80, p. 87-98, 1998.
- 14 WOUDA, W.; MOEN, A. R.; SCHUKKEN, Y. H. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology*, v. 49, p. 1311-1316, 1998.
- 15 WOUDA, W.; BARTELS, C. J. M.; MOEN, A. R. Characteristics of *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995-1997). *Theriogenology*, v. 52, p. 233-245, 1999.
- 16 DAVISON, H. C.; GUY, F.; OTTER, A.; TREES, A. J. Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle. *International Journal for Parasitology*, v. 29, p. 1189-1194, 1999.
- 17 DAVISON, H. C.; GUY, F.; OTTER, A. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *International Journal for Parasitology*, v. 29, p. 1683-1689, 1999.
- 18 JENSEN, A. M.; BJÖRKMAN, C.; KJELDSSEN, A. M.; WEDDERKOPP, A.; WILLADSEN, C.; UGGLA, A.; LIND, P. Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 40, p. 151-163, 1999.
- 19 WALDNER, C. L.; JANZEN, E. D.; HENDERSON, J.; HAINES, D. M. Outbreak of abortion associated with *Neospora caninum* infection in a beef herd. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 215, p. 1485-1490, 1999.
- 20 ATKINSON, R. A.; COOK, R. W.; REDDACLIFF, L. A.; ROTHWELL, J.; BROADY, K. W.; HARPER, P. A. W.; ELLIS, J. T. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in a dairy cattle herd. *Australian Veterinary Journal*, v. 78, p. 262-266, 2000.
- 21 BERGERON, N.; FECTEAU, G.; PARÉ, J.; MARTINEAU, R.; VILLENEUVE, A. Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Québec. *Canadian Veterinary Journal*, v. 41, p. 464-469, 2000.
- 22 DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H. W.; EYSKER, M.; WOUDA, W. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *International Journal for Parasitology*, v. 31, p. 209-215, 2001.
- 23 MCALLISTER, M.; HUFFMAN, E. M.; HIETALA, S. K.; CONRAD, P. A.; ANDERSON, M. L.; SALMAN, M. D. Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 8, p. 355-357, 1996.
- 24 THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K.; BLANCHARD, P. C. Herd-based diagnosis of *Neospora*

- caninum-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 9, p. 44-49, 1997.
- 25 COX, B. T.; REICHEL, M. P.; GRIFFITHS, L. M. Serology of a *Neospora* abortion outbreak on a dairy farm in New Zealand: A case study. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 46, p. 28-31, 1998.
- 26 WALDNER, C. L.; JANZEN, E. D.; RIBBLE, C. S. Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 213, p. 685-690, 1998.
- 27 BJÖRKMAN, C.; NASLUND, K.; STENLUND, S.; MALEY, S. W.; BUXTON, D.; UGGLA, A. An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 11, p. 41-44, 1999.
- 28 HIETALA, S. K.; THURMOND, M. C. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. *International Journal for Parasitology*, v. 29, p. 1669-1676, 1999.
- 29 PATITUCCI, A. N.; CHARLESTON, W. A. G.; ALLEY, M. R. et al. Serological study of a dairy herd with a recent history of *Neospora* abortion. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 47, p. 28-30, 1999.
- 30 SCHARES, G.; CONRATHS, F. J.; REICHEL, M. P. Bovine neosporosis: Comparasion of serological methods using outbreak sera from a dairy herd in New Zealand. *International Journal for Parasitology*, v. 29, p. 1659-1667, 1999.
- 31 DYER, R. M.; JENKINS, M. C.; KWOK, O. C. H.; DOUGLAS, L. W.; DUBEY, J. P. Serologic survey of *Neospora caninum* infection in a closed dairy cattle herd in Maryland: Risk of serologic reactivity by production groups. *Veterinary Parasitology*, v. 90, p. 171-181, 2000.
- 32 JENKINS, M. C.; CAVER, J. A.; BJÖRKMAN, C.; ANDERSON, T. A.; ROMAND, S.; VINYARD, B.; UGGLA, A.; THULLIEZ, P.; DUBEY, J. P. Serological investigation of an outbreak of *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in southeastern United States. *Veterinary Parasitology*, v. 94, p. 17-26, 2000.
- 33 MCALLISTER, M. M.; BJÖRKMAN, C.; ANOERSON-SPRECHER, R.; ROGERS, D. G. 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, p. 881-887, 2000.
- 34 DIJKSTRA, T.; EYSKER, M.; SCHARES, G.; CONRATHS, F. J.; WOUDA, W.; BARKEMA, H. W. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *International Journal for Parasitology*, v. 31, p. 747-752, 2001.
- 35 DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H. W.; EYSKER, M.; HESSELINK, J. W.; WOUDA, W. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. *Veterinary Parasitology*, v. 105, p. 99-104, 2002.
- 36 SCHARES, G.; BÄRWALD, A.; STAUBACH, C.; SÖNDGEN, P.; RAUSER, M.; SCHRÖDER, R.; PETERS, M.; WURM, R.; SELHORST, T.; CONRATHS, F. J. p38-avidity-ELISA: Examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Veterinary Parasitology*, v. 106, p. 293-305, 2002.
- 37 STENLUND, S.; KINDAHL, H.; UGGLA, A.; BJÖRKMAN, C. A long-term study of *Neospora caninum* infection in a Swedish Dairy Herd, *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 44, p. 63-71, 2003.
- 38 KASHIWAZAKI, Y.; GIANNECCHINI, R. E.; LUST, M.; GIL, J. Seroepidemiology of neosporosis in dairy cattle in Uruguay, *Veterinary Parasitology*, v. 120, p. 139-144, 2004.
- 39 COLE, R. A.; LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; DUBEY, J. P. Vertical transmission of *Neospora* in mice. *Journal for Parasitology*, v. 81, p. 730-732, 1995.
- 40 UGGLA, A.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O. J. M.; JAKUBEK, E. B.; THEBO, P.; KINDAHL, H.; BJÖRKMAN, C. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *International Journal for Parasitology*, v. 28, p. 1467-1472, 1998.
- 41 DAVISON, H. C.; GUY, C. S.; MCGARRY, J. W.; GUY, E.; WILLIAMS, D. J. L.; TREES, A. J. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. *Research in Veterinary Science*, v. 70, p. 163-168, 2001.
- 42 DUBEY, J. P.; HATTEL, A. L.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent experimental transmission. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 193, n. 10, p. 1259-1263, 1988.
- 43 TIZARD, I. R. Imunologia veterinária: uma introdução. In: TIZARD, I. R. Imunidade no feto e no recém-nascido. São Paulo: Roca, 2002. p. 233-246.
- 44 STOTT, G. H.; MARX, D. B.; MENEFE, B. E.; NIGHTENGALE, G. T. Colostral immunoglobulin transfer in calves. I. Period of absorption. *Journal Dairy Science*, v. 62, p. 1632-1638, 1979.
- 45 INNES, E. A.; WRIGHT, S. E.; MALEY, S.; RAE, A.; SCHOCK, A.; KIRVAR, E.; BARTLEY, P.; HAMILTON, C.; CAREY, I. M.; BUXTON, D. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology*, v. 31, p. 1523-1534, 2001.

ANEXO B

395

Antibody dynamics during gestation in cows naturally infected with *Neospora caninum* from four dairy herds in Brazil

José Márcio Sbruzzi
CARDOSO¹
Sandra Mayumi NISHI¹
Mikaela Renata FUNADA¹
Marcos AMAKU¹
José da Silva GUIMARÃES
JÚNIOR²
Solange Maria GENNARI¹

1 - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo,
São Paulo-SP
2 - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR

Abstract

Neospora caninum has been described as an important cause of abortion in bovine worldwide. The objective of the present study was to characterize patterns of antibody dynamics during gestation in dairy cows naturally infected with *N. caninum*. Twelve *N. caninum* naturally infected cows were selected from four dairy herds from Brazil and blood samples were monthly collected during pregnancy. Serum were tested for antibodies against *N. caninum* by Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT). During this period, all cows remained clinically normal and gave birth to healthy calves. The cows remained seropositives during the study and *N. caninum* IFAT titers ranged from 100 to 12,800; only animal 234 presented one negative result in the first month of pregnancy. Significant differences of *N. caninum* IFAT titers were found between months from 1 to 9 of pregnancy by the Friedman Test ($P < 0.001$). The statistical analysis showed an increase of *N. caninum* antibody titers from second and third trimester of pregnancy in relation to first trimester. High titers were observed in few cows after month fifth of pregnancy. This study showed a variation of specific antibody levels in seropositive cows during different gestational periods. The highest values were observed during the second and third trimester. The antibody increase after the fifth month of gestation was not associated to abortion.

Key words:
Neospora caninum.
Antibody dynamics.
Antibody titer.
Pregnancy.
Bovine.

Correspondence to:
José Márcio Sbruzzi Cardoso, Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr.
Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade
Universitária, São Paulo, SP, Brasil,
05508-270; email: jmc Cardoso@usp.br

Recebido para publicação: 30/09/2008
Aprovado para publicação: 24/09/2009

Introduction

Neospora caninum is an apicomplexan parasite that was first recognized in dogs by Norwegian scientists¹ and isolated, characterized and named in 1988 in the United States². *N. caninum* has been described as an important cause of abortion in bovine worldwide^{3,4,5}.

Despite the discovery that dogs and coyotes can serve as a definitive host for *N. caninum*^{6,7}, congenital infection is generally accepted as the main way of transmission and maintenance of *N. caninum* in cattle and can occur in subsequent pregnancies and over several generations^{8,9,10,11,12,13,14,15}. Whereas

some fetal infections lead to abortion, birth of congenitally infected calves is the most frequent observation.

Bovine neosporosis develops either as a result of maternal infection during gestation or as consequence of a recrudescence of a persistent infection of the dam during gestation, denoted exogenous or endogenous transplacental infection, respectively.¹⁶ The study of the dynamics of antibodies allows better interpretation of the serological analyses. It is generally accepted that this enhanced humoral response shown by *N. caninum*-infected pregnant dams reflects reactivation of the parasite and its transplacental transmission to the fetus.¹⁷

The objective of the present study was to characterize patterns of antibody dynamics during gestation in dairy cows naturally infected with *N. caninum*.

Material and Method

This study was conducted in four dairy herds, three in São Paulo and one in Paraná State, Brazil. The cattle were of Holstein Friesian crossbreed and were reared in the semi-extensive system. The herds had previously confirmed cases of *N. caninum* infection in prospective studies using serological assays. Twelve pregnant cows naturally infected with *N. caninum* were selected. All the cows were artificially inseminated and pregnancy was diagnosed by rectal palpation on day 40 after insemination. The pregnancies were not coordinated in time, but spread over the year. All animals were tuberculosis and brucellosis free and vaccination programs were adopted for the prevention of main bovine diseases.

From October 2005 to May 2008, blood samples of the cows were monthly collected by coccygeal venipuncture from breeding to calving. Only one pregnancy of each cow was evaluated. After centrifugation at 1,000 x g for 15 min, serum was removed and stored at -20°C until analysis.

Serum were tested for antibodies against *N. caninum* by Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) using whole culture-driven tachyzoites (NC-1 strain) as antigen.¹⁸ Serum samples were titrated in doubling dilution from 1:100. Fluorescein isothiocyanate conjugated rabbit anti-bovine IgG (Sigma, St Louis, MO, USA) was used at 1:3,000 dilution.

IFAT data from the individual sera did not follow a normal distribution, requiring the use of a nonparametric statistical comparison, the Friedman Test, using SPSS 9.0 program (SPSS Inc., 2004). Multiple comparisons between titers of anti-*N. caninum* antibody during pregnancy months were carried out by Wilcoxon Signed Ranks Test. Difference was considered statistically significant for P<0.05.

Results and Discussion

During the pregnancy, all cows remained clinically normal and gave birth to healthy calves. Blood samples of calves were not collected because it was not possible collect pre-colostral samples. Individual serological results are shown in table 1.

The cows remained seropositives during the study and *N. caninum* IFAT titers ranged from 100 to 12,800, only animal 234

Table 1 - *Neospora caninum* IgG antibody titers by Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT>100) during pregnancy in 12 seropositive dairy cows

Farm	Animal	IFAT Titer during month of pregnancy								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9 ^{*1}
I	6	400	400	800	800	800	200	800	1600	800
I	215	400	200	200	100	400	800	800	800	800
II	78	200	200	400	800	800	400	800	400	800
II	234	Neg ^{*2}	200	800	400	12800	6400	12800	1600	3200
II	322	400	400	400	800	400	400	400	400	800
III	662	800	800	800	800	800	800	800	800	800
III	657	400	400	400	400	800	800	12800	800	800
IV	359	400	200	400	400	200	400	400	800	800
IV	374	100	400	200	400	200	200	200	200	1600
IV	557	800	200	200	800	800	800	1600	1600	800
IV	368	200	800	800	800	800	800	800	800	800
IV	547	400	800	800	800	800	1600	800	800	400

^{*1} Date of calving; ^{*2} Negative

presented one negative result in the first month of pregnancy, probably caused by fluctuations in the levels of antibodies that occasionally fall below of detection of serological tests.^{13,14,19,20,21}

Significant differences of *N. caninum* IFAT titers were found between months from 1 to 9 of pregnancy by the Friedman Test ($P < 0.001$). In the multiple comparisons, months 1 and 2 were significantly different ($p < 0.05$) and presenting low titers when compared to months 4 to 9 (second and third trimester of pregnancy). Month 3 was different ($P < 0.05$) to months 7, 8 and 9 (third trimester of pregnancy) showing lower titers. No significant difference ($P < 0.05$) in titers occurred between months 4, 5 and 6 (second trimester) and months 7, 8 and 9 (third trimester). These results show an increase of *N. caninum* antibody titers from second and third trimester of pregnancy in relation to first trimester. The increase of antibody level

during mid- and late-gestation has been reported^{13,14,22,23,24,25,26}, however other few studies found no difference in the levels of antibodies during pregnancy^{21,27}.

In the present study, high titers were observed in few cows after month fifth of pregnancy (Table 1). Several authors demonstrated that cows with high *N. caninum* antibody titer had higher risk of abortion than seronegative or cows with low titer^{14,23,28,29,30,31,32}, however no abortion occurred, even in the cows they showed increase of *N. caninum* antibody titers after the fifth month of pregnancy.

This study showed variation of specific antibody levels in seropositive cows during different gestational periods. Highest values were observed during the second and third trimester. The level of antibodies increased after the fifth month of gestation; however this was not associated to abortion.

Dinâmica de anticorpos durante a gestação em vacas naturalmente infectadas com *Neospora caninum* de quatro rebanhos leiteiros no Brasil.

Resumo

Neospora caninum é descrito como uma importante causa de abortamento em bovinos por todo o mundo. O objetivo do presente estudo foi caracterizar o padrão da dinâmica de anticorpos durante a gestação em vacas leiteiras infectadas naturalmente por *N. caninum*. Doze vacas gestantes infectadas naturalmente com *N. caninum* foram selecionadas de quatro rebanhos leiteiros do Brasil e amostras de sangue foram mensalmente colhidas da concepção até o parto das vacas. Soros foram testados para anticorpos contra *N. caninum* pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Durante a gestação, todas as vacas permaneceram clinicamente normais e geraram bezerros saudáveis. As vacas permaneceram soropositivas durante o estudo e títulos de anticorpos anti-*N. caninum* variaram de 100 a 12.800; somente o animal 234 apresentou um resultado negativo no primeiro mês de gestação. Diferenças significativas dos títulos da RIFI para *N. caninum* foram encontradas entre os meses de 1 a 9 de gestação pelo Teste de Friedman ($P < 0,001$). As análises estatísticas mostraram um aumento dos títulos de anticorpos anti-*N. caninum* no segundo e terceiro trimestre de gestação em relação ao primeiro trimestre. Altos títulos de anticorpos foram observados em algumas vacas após o mês cinco de gestação. Este estudo mostrou variação dos níveis de anticorpos em vacas soropositivas durante diferentes períodos gestacionais. Altos títulos foram observados durante o

Palavras-chave:
Neospora caninum.
Dinâmica de anticorpos.
Título anticorpos.
Gestação.
Bovinos.

segundo e terceiro trimestre e o aumento dos títulos de anticorpos após o quinto mês de gestação não foi associado a abortamentos.

References

- 1 BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Zeitschrift fuer Parasitenkunde*, v. 70, n. 2, p. 271-274, 1984.
- 2 DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988.
- 3 ANDERSON, M. L.; BLANCHARD, P. C.; BARR, B. C.; DUBEY, J. P.; HOFFMAN, R. L.; CONRAD, P. A. Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 198, n. 2, p. 241-244, 1991.
- 4 ANDERSON, M. L.; PALMER, C. W.; THURMOND, M. C.; PICANSO, J. P.; BLANCHARD, P. C.; BREITMEYER, R. E.; LAYTON, A. W.; MCALLISTER, M.; DAFT, B.; KINDE, H.; READ, D. H.; DUBEY, J. P.; CONRAD, P. A.; BARR, B. C. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 207, n. 9, p. 1206-1210, 1995.
- 5 WOUDE, W.; BARTELS, C. J. M.; MOEN, A. R. Characteristics of Neospora caninum-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995-1997). *Theriogenology*, v. 52, n. 2, p. 233-245, 1999.
- 6 MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; MCGUIRE, A. M. Rapid communication: dogs are definitive hosts of Neospora caninum. *International Journal for Parasitology*, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, 1998.
- 7 GONDIM, L. P.; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of Neospora caninum. *International Journal for Parasitology*, v. 34, n. 2, p. 159-161, 2004.
- 8 PARÉ, J.; THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Congenital Neospora caninum infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 60, n. 2, p. 133-139, 1996.
- 9 ANDERSON, M. L.; REYNOLDS, J. P.; ROWE, J. D.; SVERLOW, K. W.; PACKHAM, A. E.; BARR, B. C.; CONRAD, P. A. Evidence of vertical transmission of Neospora sp. infection in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 210, n. 8, p. 1169-1172, 1997.
- 10 THURMOND, M. C.; HIETALA, S. Effect of congenitally acquired Neospora caninum infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *American Journal of Veterinary Research*, v. 58, n. 12, p. 1381- 1385, 1997.
- 11 SCHARES, G.; PETERS, M.; WURM, R.; BÄRWALD, A.; CONRATHS, F. J. The efficiency of vertical transmission of Neospora caninum in dairy cattle analysed by serological techniques. *Veterinary Parasitology*, v. 80, n. 2, p. 87-98, 1998.
- 12 DAVISON, H. C.; GUY, F.; OTTER, A. 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.
- 13 GONZÁLEZ-WARLETA, M.; CASTRO-HERMIDA, J. A.; CARRO-CORRAL, C.; CORTIZO-MELLA, J.; MEZO, M. Epidemiology of neosporosis in dairy cattle in Galicia (NW Spain). *Parasitology Research*, v. 102, n. 2, p. 243-249, 2008.
- 14 PEREIRA-BUENO, J.; QUINTANILLA-GOZALO, A.; SEIJAS-CARBALFEDO, A.; COSTAS, E.; ORTEGA-MORA, L. M. 4. 2. Observational studies in Neospora caninum infected dairy cattle: pattern of transmission and age-related antibody fluctuations. In: HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B. (Ed.). *A European perspective on Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, v. 30, n. 8, p. 906-909, 2000.
- 15 PABÓN, M.; LÓPEZ-GATIUS, F.; GARCÍA-ISPEIRTO, I.; BECH-SÀBAT, G.; NOGAREDA, C.; ALMERIA, S. Chronic Neospora caninum infection and repeat abortion in dairy cows: A 3-year study. *Veterinary Parasitology*, v. 147, n. 1/2, p. 40-46, 2007.
- 16 TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. Endogenous and exogenous transplacental infection in Neospora caninum and Toxoplasma gondii. *Trends in Parasitology*, v. 21, n. 12, p. 558-561, 2005.
- 17 INNES, E. A.; ANDRIANARIVO, A. G.; BJÖRKMAN, C.; WILLIAMS, D. J. L.; CONRAD, P. A. Immune responses to Neospora caninum and prospects for vaccination. *Trends in Parasitology*, v. 18, n. 11, p. 497-504, 2002.
- 18 DUBEY, J. P.; HATTEL, A. L.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. Neonatal Neospora caninum infection in dogs: isolation of the causative agent experimental transmission. *Journal of the American Medical Association*, v. 193, n. 10, p. 1259-1263, 1988.
- 19 HIETALA, S. K.; THURMOND, M. C. Postnatal Neospora caninum transmission and transient serologic responses in two dairies. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 10, p. 1669-1676, 1999.
- 20 PFEIFFER, D. V.; WILLIAMSON, N. B.; REICHEL, M. P.; WICHTEL, J. J.; TEAGUE, W. R. A longitudinal study of Neospora caninum infection on a dairy farm in New Zealand. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 54, n. 1, p. 11-24, 2002.

- 21 HÄSLER, B.; HERNANDEZ, J. A.; REIST, M.; SAGER, H.; STEINER-MORET, C.; STAUBLI, D.; STÄRK, K. D. C.; GOTTSTEIN, B. Neospora caninum: serological follow-up in dairy cows during pregnancy. *Veterinary Parasitology*, v. 137, n. 3/4, p. 222-230, 2006.
- 22 DANNATT, L. Neospora caninum antibody levels in an endemically-infected dairy herd. *Cattle Practice*, v. 5, p. 335-337, 1997.
- 23 STENLUND, S.; KINDAHL, H.; MAGNUSSON, U.; UGGLA, A. BJÖRKMAN, C. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, v. 85, n. 4, p. 227-234, 1999.
- 24 GUY, C. S.; WILLIAMS, D. J. L.; KELLY, D. E.; MCGARRY, J. W.; GUY, E.; BJÖRKMAN, C.; SMITH, R. E.; TREES, A. J. Neospora caninum in persistently infected, pregnant cows: Spontaneous transplacental infection is associated with an acute rise in maternal antibody. *Veterinary Record*, v. 149, n. 15, p. 443-449, 2001.
- 25 FIORETTI, D. P.; PASQUAI, P.; DIAFERIA, M.; MANGILI, V.; ROSIGNOLI, L. Neospora caninum infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. *Journal of Veterinary Medicine B*, v. 50, n. 8, p. 399-404, 2003.
- 26 ANDRIANARIVO, A. G.; ANDERSON, M. L.; ROWE, J. D.; GARDNER, I. A.; REYNOLDS, J. P.; CHOROMANSKI, L.; CONRAD, P. A. Immune responses during pregnancy in heifers naturally infected with *Neospora caninum* with and without immunization. *Parasitology Research*, v. 96, n. 1, p. 24-31, 2005.
- 27 FIORETTI, D. P.; ROSIGNOLI, L.; RICCI, G.; MORETTI, A.; PASQUALI, P.; POLIDORJ, G. A. Neospora caninum infection in a clinically healthy calf: Parasitological study and serological follow-up. *Journal of Veterinary Medicine B*, v. 47, n. 1, p. 47-53, 2000.
- 28 MCALLISTER, M.; HUFFMAN, E. M.; HIETALA, S. K.; CONRAD, P. A.; ANDERSON, M. L.; SALMAN, M. D. Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 8, n. 3, p. 355-357, 1996.
- 29 DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; ADAMS, D. S.; MCALLISTER, M. M.; ANDERSON-SPRECHER, R.; BASZLER, T. V.; KWOK, O. C. H.; LALLY, N. C.; BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and different enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Parasitology*, v. 83, p. 1063-1069, 1997.
- 30 JENKINS, M. C.; WOUDE, W.; DUBEY, J. P. Serological response over time to recombinant *Neospora caninum* antigens in cattle after a neosporosis-induced abortion. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 4, n. 3, p. 270-274, 1997.
- 31 KASHIWAZAKI, Y.; GIANNECCHINI, R. E.; LUST, M.; GIL, J. Seroepidemiology of neosporosis in dairy cattle in Uruguay. *Veterinary Parasitology*, v. 120, n. 1/2, p. 139-144, 2004.
- 32 WILLIAMS, D. J. L.; GUY, C. S.; MCGARRY, J. W.; GUY, F.; TASKER, L.; SMITH, R. F.; MACEACHERN, K.; CRIPPS, P. J.; KELLY, D. F.; TREES, A. J. 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.