

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

MURILO DE OLIVEIRA BÔA-MORTE

**DIAGNÓSTICO DA TRANSMISSÃO VERTICAL DE *Neospora caninum*
ATRAVÉS DA SOROLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR EM BOVINOS NA
MESORREGIÃO NORTE FLUMINENSE**

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ

2013

MURILO DE OLIVEIRA BÔA-MORTE

**DIAGNÓSTICO DA TRANSMISSÃO VERTICAL DE *Neospora caninum*
ATRAVÉS DA SOROLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR EM BOVINOS NA
MESORREGIÃO NORTE FLUMINENSE**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal. Na área de concentração de Sanidade Animal

Orientador: Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira

Co-orientador: Edwards Frazão Teixeira

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ

2013

MURILO DE OLIVEIRA BÔA-MORTE

**DIAGNÓSTICO DA TRANSMISSÃO VERTICAL DE *Neospora caninum*
ATRAVÉS DE SOROLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR EM BOVINOS NA
MESORREGIÃO NORTE FLUMINENSE**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito
parcial para obtenção do grau de Doutor
em Ciência Animal. Na área de
concentração de Sanidade Animal

Aprovada em 03 de Setembro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. George Rego Albuquerque (Doutor em Ciências Veterinárias) - UESC

Prof. Carlos Wilson Gomes Lopes (PhD em Patologia) – UFRRJ

**Dr. Edwards Frazão Teixeira (Doutor em Produção Animal) - UENF
(co-orientador)**

**Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira (Doutor em Ciências Veterinárias) - UENF
(orientador)**

À minha esposa e filha

Thais Corrêa Nogueira Cruz Bôa Morte e Thainá Corrêa Bôa Morte

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela dádiva da vida, pelo suporte nas horas difíceis e pela certeza da sua presença nos momentos alegres;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro pela oportunidade de aprendizado científico e pessoal;

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela disponibilidade material para a realização desta pesquisa;

Aos meus pais pela dedicação, que tiveram e ainda tem por mim até hoje, fornecendo-me muito mais do eu preciso para o meu desenvolvimento;

Aos meus irmãos Marcelo Freitas Bôa Morte e Maurício de Oliveira Bôa Morte pelos exemplos e amizade sempre existentes;

À minha esposa Thais Correa Nogueira Cruz pelo carinho, amor e compreensão em todos os momentos;

Aos amigos do Grupo Espírita Culto Pedro, do futebol e do “poquerzão” que são pessoas mais do que especiais em minha vida;

Aos amigos do laboratório de Sanidade Animal pelo apoio em diversos momentos; Vagner Ricardo Fiuza; Edward Frazão Teixeira; André Mauricio Barroso; Carina dos santos Teixeira; Samira Salim Gallo; Luciana Sales; Amanda Lucia Jimenes;

Ao amigo Evenilton Pessoa, por dividir os seus conhecimentos auxiliando-me neste trabalho;

Aos Professores Carlos Logullo e Luís Fernando Pita Gondim por me auxiliarem neste trabalho;

Em especial ao meu padrinho, amigo e orientador, prof. Dr. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira por me orientar não somente nas questões científicas, mas também e, principalmente, nas lutas diárias da vida.

“... o homem que construir suas defesas, baseadas na amizade, fará uma muralha indestrutível.”

**Don Corleone em O Chefão
Livro de Mário Puzo**

RESUMO

Bôa-Morte, M. O. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Setembro 2013; Diagnóstico da transmissão vertical de *Neospora caninum* através da sorologia e biologia molecular em bovinos na mesorregião Norte Fluminense.
Orientador: Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira
Co-orientador: Edwards Frazão Teixeira

Neosporose é uma doença parasitária causada pelo protozoário *N. caninum* em que o abortamento é o sinal clínico mais evidente nos bovinos que têm a infecção congênita como principal via de transmissão. Com o objetivo de caracterizar a transmissão vertical da neosporose em bovinos da Mesorregião Norte Fluminense através do diagnóstico sorológico e molecular, sangues de vacas abatidas e dos respectivos fetos, quando essas estavam prenhes, foram coletados para pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* utilizando-se o teste de ELISA. Dos fetos, foram também coletados cérebros para pesquisa do DNA. Foi observada uma frequência de 22% (43/195) de vacas soropositivas, não havendo diferenças significativas quanto à aptidão 17% (19/112) e 29% (24/83) corte e leiteiras, respectivamente. A frequência de 26% (26/100) em vacas com idade superior a três anos e 15% (11/73) em vacas com menos de três anos não implicaram diferenças significativas. Com relação ao período gestacional também não se verificou diferenças estatísticas entre as vacas soropositivas no primeiro 20% (2/10), segundo 25% (8/32) e terceiro 32% (13/41) trimestres de gestação. Foi observada uma taxa de transmissão vertical de 23% e 76% através do ELISA e PCR, respectivamente e uma diferença extremamente significativa quando comparadas. Estes resultados permitiram inferir que os rebanhos de vacas da Mesorregião Norte Fluminense estão infectados de forma endêmica por *N. caninum* independentemente da aptidão, idade ou estado gestacional e que nesta mesorregião a transmissão vertical, também é uma importante via de infecção, além de se detectar que a PCR parece ser uma melhor ferramenta que o Teste de ELISA para o estudo de infecção congênita da neosporose.

PALAVRAS-CHAVE: *Neospora caninum*; ELISA; PCR; transmissão vertical; bovinos.

ABSTRACT

Bôa-Morte, M. O. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; September 2013; Diagnosis of vertical transmission of *Neospora caninum* through serology and molecular biology in cattle in northern Rio de Janeiro state. Advisor: Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira
CoAdvisor: Edwards Frazão Teixeira

Neosporosis is a parasitic disease caused by the protozoan *N. caninum* for which abortion is the most evident clinical sign among cattle with congenital infection as the main via of transmission. In order to characterize the vertical transmission of neosporosis in cattle of the northern region of Rio de Janeiro state through serological and molecular diagnosis, blood of slaughtered cows and their respective fetuses, when pregnant, were collected for research of anti-*N. caninum* antibodies using ELISA. Brains of the fetuses were also collected for DNA research. The frequency of seropositive cows was 22% (43/195) and there was no significant difference as for aptitude, 17% (19/112) and 29% (24/83) for beef and dairy cows respectively. The 26% of frequency (26/100) in cows older than three years and 15% (11/73) in cows younger than three years did not implicate in significant differences. Concerning the gestational period there were no statistical differences among seropositive cows in the first, 20% (2/10), second, 25% (8/32) and third, 32% (13/41) trimesters of gestation. The vertical transmission rates were 23% and 76% for ELISA and PCR respectively, with highly significant difference between the techniques. These results allowed to infer that the cattle herds in the North region of Rio de Janeiro state are endemically infected by *N. caninum*, independently of the aptitude, age or gestational state, and that in this region the vertical transmission is an important via of infection. Also, PCR seems to be a better tool than ELISA for studies of congenital neosporosis.

KEY-WORDS: *Neospora caninum*; ELISA; PCR; vertical transmission; bovines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas de corte soropositivas 10% (19/195) e negativos 48% (93/195), comparadas pelo Teste de Fisher ($p=0,0553$) com aproximação de Katz e intervalo de confiança de 95%, com vacas de aptidão leiteiras soropositivas 12% (24/195) e soronegativas 30% (59/195) oriundas do Norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil..... **27**
- Figura 2** Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas com até três anos soropositivas 6% (11/173) e negativos 36% (62/173), comparadas pelo teste de Fisher ($p=0,0937$) com aproximação de Katz e intervalo de confiança de 95%, com vacas com mais de três anos soropositivas 15% (26/173) e soronegativas 43% (74/173) oriundas do Norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil..... **28**
- Figura 3** Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas Prenhes soropositivas 12% (23/195) e negativos 31% (60/195), comparadas pelo Teste de Fisher ($p=0,1172$) com aproximação de Katz e intervalo de confiança de 95%, com vacas vazias soropositivas 10% (20/195) e soronegativas 47% (92/195) oriundas do Norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil..... **29**
- Figura 4** Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas no primeiro trimestre gestacional soropositivas 2,4% (2/83) e negativos 9,6% (8/83), em vacas no segundo trimestre gestacional soropositivas 9,6% (8/83) e negativas 28,9% (24/83) e no terceiro trimestre gestacional soropositivas 15,7% (13/83) e negativas 33,7% (28/83) oriundas do Norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. Comparadas pelo Teste de Fisher ($p=0,4299$) com aproximação de Katz e intervalo de confiança de 95%..... **30**

Figura 5 Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os produtos da PCR do gene 18S rRNA de *Neosporacanium*. Marcador molecular (MM), controle positivo (CP) com banda visível de 328 pares de bases (pb), controle negativo (CN) e amostras de 1 a 21..... **33**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Avaliação da infecção congênita <i>Neospora caninum</i> de vacas prenhes, seus respectivos fetos através da pesquisa de anticorpos e DNA do parasita.....	31
-----------------	---	-----------

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	15
2.1. OBJETIVO GERAL.....	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1. HISTÓRICO.....	16
3.2. CLASSIFICAÇÃO, MORFOLOGIA E BIOLOGIA.....	16
3.3. NEOSPOROSE EM CÃES.....	18
3.4. NEOSPOROSE EM BOVINOS.....	18
3.5. EPIDEMIOLOGIA.....	19
3.6. DIAGNÓSTICO, CONTROLE E PROFILAXIA.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. LOCAL DO EXPERIMENTO E ANIMAIS UTILIZADOS.....	23
4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS.....	23
4.3. COLETA DAS AMOSTRAS.....	24
4.4. PROCESSAMENTO DO SANGUE.....	24
4.4.1. Obtenção do soro	24
4.4.2. Sorologia	24
4.5. DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	25
4.5.1. Extração do DNA	25
4.5.2. Reação em cadeia da Polimerase	25
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
5. RESULTADOS	27
5.1. FREQUÊNCIA DE NEOSPOROSE EM VACAS.....	27
5.2. TRANSMISSÃO VERTICAL.....	31
5.2.1. Ensaio Imuno Enzimático (ELISA)	31
5.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	32

6. DISCUSSÃO.....	34
7. CONCLUSÕES.....	38
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

1. INTRODUÇÃO

Na medicina veterinária, o interesse pelo protozoário *Neospora caninum* vem crescendo a partir do momento que Thilsted e Dubey, em 1989, identificaram, pela primeira vez, esse agente etiológico associado ao aborto bovino.

Neosporose é uma doença parasitária de animais silvestres, de produção e de companhia causado pelo protozoário *N. caninum*. Este agente pode infectar células de animais de sangue quente e apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo tanto em regiões de clima tropical e subtropical, quanto em zonas de clima temperado.

Neospora caninum é transmitida de forma horizontal e vertical, sendo esse o principal meio de transmissão em bovinos, podendo ocasionar abortos, natimortos, nascimento de bezerros infectados, apresentando sinais neurológicos, além de alterações reprodutivas, tais como, repetição de cio, infertilidade e baixo desempenho reprodutivo em bovinos.

Nos Estados Unidos esse parasito é responsável por perdas econômicas significativas, no Brasil, os prejuízos determinados por este agente não foram estimados, no entanto, a neosporose é uma importante causa de abortamento no país. O impacto econômico será dependente de custos indiretos, bem como do valor do feto perdido, custos indiretos incluem ajuda profissional e custos associados com o estabelecimento do diagnóstico, aumento do intervalo entre partos, possível perda na produção leiteira e com a reposição de animais, após o descarte de vacas que abortaram.

Com base nessas informações, o agente e a doença têm despertado grande interesse, fazendo com que pesquisadores do mundo inteiro trabalhem com intuito de elucidar e conhecer melhor os mecanismos de dispersão do parasito.

A Mesorregião Norte e Noroeste Fluminense gera receita de 213 milhões de reais, despesas de 103 milhões de reais, investimentos de 25 milhões de reais com financiamentos em torno de três milhões de reais (IBGE, 2007; CIDE, 2007), não se sabendo o impacto de problemas reprodutivos sobre a economia pecuária da região. Assim a ausência de informações no que diz respeito à frequência de abortos relacionados ao *N. caninum* e a transmissão da doença da vaca ao feto no Norte Fluminense, motiva a realização da presente pesquisa.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Caracterizar a transmissão vertical da neosporose em bovinos da Mesorregião Norte Fluminense através do diagnóstico sorológico e molecular.

2.2. ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência de anticorpos anti-*N. caninum* em vacas abatidas na região Norte Fluminense.
- Determinar a frequência de anticorpos anti-*N. caninum* em fetos oriundos de vacas soropositivas, abatidas na região Norte Fluminense;
- Comparar a frequência de anticorpos anti-*N. caninum* em vacas abatidas na região Norte Fluminense de acordo com a aptidão (corte e leiteira), idade (até três e após três anos), estado gestacional (prenhe ou vazia) e trimestre gestacional (primeiro, segundo e terceiro);
- Detectar a presença de DNA de *N. caninum* em cérebros de fetos oriundos de vacas soropositivas, abatidas na região Norte Fluminense;
- Associar o trimestre gestacional à intensidade da transmissão vertical
- Confrontar a transmissão vertical da neosporose através da sorologia de mães soropositivas e seus respectivos fetos com a transmissão vertical pela presença do DNA do parasita em pauta nos cérebros de fetos de mães soropositivas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. HISTÓRICO

O primeiro relato relacionado com *N. caninum* foi em 1984, na Noruega Bjerkas et al. (1984), em três ninhadas de cães da raça boxer, detectaram uma doença neurológica, com sintomas similares aos causados pela infecção por *T. gondii*, sendo responsável por lesões no cérebro e músculos. Entretanto, anticorpos anti-*T. gondii* não foram observados no soro desses cães e nem foi possível o isolamento do parasito dos animais infectados em camundongos. Em 1988, um parasita morfológicamente similar ao *T. gondii* foi evidenciado em cães nos Estados Unidos, no entanto características próprias deste parasita puderam classificá-lo como uma nova espécie, sendo então denominado *N. caninum* (DUBEY et al., 1988).

A presença de *N. caninum* foi reportada pela primeira vez por Thilsted e Dubey (1989) em cérebro de fetos de um rebanho bovino com abortamentos persistentes no Novo México (EUA). O diagnóstico presuntivo foi feito baseado em achados de alguns cistos de um suposto *T. gondii* e a ineficácia de achar qualquer outra causa de aborto. A Toxoplasmose foi excluída porque nenhum anticorpo anti-*T. gondii* foi verificado nas vacas que abortaram e *T. gondii*, até então, não havia sido responsável por causar aborto em vacas. Finalmente o diagnóstico de neosporose foi confirmado quando o soro específico de *N. caninum* ficou disponível (LINDSAY; DUBEY, 1989a) e mais tarde Anderson et al., 1991 e Barr et al., 1991 descreveram este protozoário como responsável pela maior causa de abortamento de bovinos leiteiros da Califórnia.

3.2. CLASSIFICAÇÃO MORFOLOGIA E BIOLOGIA

De acordo com Current et al. (1990) e Cavalier-Smith (1993), a classificação taxonômica proposta para o parasito é a seguinte: Império – Eukariota, Cavalier-Smith, 1993; Reino – Protozoa Owen, 1858; Filo – Apicomplexa Levine 1970 Classe – Sporozoasida Leukart, 1879; Subclasse – Coccidiasina Leukart, 1879; Ordem – Eucoccidiorida Léger; Doboscq, 1910; Subordem – Eimeriorina Léger, 1911; Família – Sarcocystidae Poche, 1913; Subfamília – Toxoplasmatinae Bioca, 1956; Gênero –

Neospora Dubey, Carpenter, Speer, Topper e Uggla, 1988; Espécie – *N. caninum* Dubey, Carpenter, Speer, Topper e Uggla, 1988.

O ciclo de vida do *N. caninum* foi descrito em 1998, quando foi demonstrado que os cães (*Canis lupus familiaris*) eram os hospedeiros definitivos do agente, liberando oocistos em suas fezes (McALLISTER et al., 1998). Gondim et al. (2004 b) descobriram que os coiotes (*Canis latrans*), também agem como hospedeiros definitivos e recentemente King et al. (2010) observaram após ingestão de cistos teciduais a liberação de oocistos não esporulados nas fezes de dingos (*Canis familiaris dingo*). Assim sendo, *N. caninum* passou a ser considerado um parasito que tem seu ciclo biológico heteroxeno obrigatório, possuindo uma grande variedade de hospedeiros intermediários demonstrados tanto experimental quanto naturalmente, tais como: bovinos, equinos, cães, camundongos, gerbils, ovinos, suínos, coiotes, raposas, búfalos (DUBEY, 1999b), assim como galinhas e outras aves (DUBEY et al., 2003, DUBEY et al., 2007, COSTA et al., 2008, GONDIM et al., 2010).

Existem três tipos celulares os taquizoítos, os bradizoítos e os esporozoítos. Os taquizoítos são encontrados livres ou em colônias em células do sistema nervoso central (SNC), macrófagos, células endoteliais vasculares, miócitos, células epiteliais tubulares renais, hepatócitos, coração, pulmões, rins, placenta e líquido amniótico e em outras células do corpo (DUBEY, 1999b; LINDSAY; DUBEY, 2000), esses então, diferenciam-se em bradizoítos e uma persistente infecção com presença de cistos teciduais é estabelecida (LYONS et al., 2002), principalmente no SNC (DUBEY, 1999b) podendo estar presente tanto no hospedeiro definitivo, como no intermediário.

Os estágios endógenos de *N. caninum*, que dão origem à eliminação de oocistos, não são bem conhecidas. O período pré-patente é de cinco dias ou mais a partir da ingestão de cistos teciduais (LINDSAY et al., 1999a). Oocistos deste parasito são eliminados não esporulados nas fezes (McALLISTER et al., 1998) e esporulam dentro de 24 horas à 37 °C (LINDSAY et al., 1999a), tornando-se infectantes para hospedeiros definitivos e intermediários, como no caso dos bovinos que podem se infectar por via oral, através de oocistos esporulados eliminados por cães (De MAREZ et al., 1999).

3.3. NEOSPOROSE EM CÃES

Os principais sinais clínicos encontrados nessa enfermidade em cães são: a encefalite, polimiosite, poliradiculoneurite e paralisia ascendente (DUBEY et al., 1998). Uma forma incomum de neosporose encontrada em cães adultos é a dermatite, a maioria dos casos de neosporose clínica em cães ocorre em filhotes infectados no útero materno (DUBEY, et al., 1998; PASQUALI et al., 1998).

O cão possui um importante papel epidemiológico na rota da transmissão horizontal da infecção em rebanhos bovinos (DUBEY, 1999b; WOUDA et al., 1999), o que foi comprovado no México por SANCHÉZ et al (2003), apesar de estudos epidemiológicos indicarem que a transmissão horizontal tem menor importância, ocorrendo em níveis inferiores aos verificados para a via transplacentária, que varia entre 50 e 95%, sendo considerado o principal modo de transmissão em bovinos, responsável pela propagação e manutenção da infecção nos rebanhos (SCHARES et al., 1998; HALL et al., 2005).

3.4. NEOSPOROSE EM BOVINOS

Os bovinos são os principais hospedeiros intermediários do *N. caninum*, por se infectarem e permanecerem carreadores do parasito durante toda a vida (INNES et al., 2002), nestes a enfermidade é caracterizada por abortos, que se constituem na principal evidência clínica observada nas vacas infectadas, podendo ocorrer a partir do terceiro mês até o término da gestação, mas na maioria dos casos ocorre entre o quinto e o sexto mês de gestação (ANDERSON et al., 1991, 1997, DUBEY, 1999), dentro do rebanho o abortamento pode ocorrer em grupo, de forma esporádica ou epidêmica. Os fetos podem morrer no útero, sendo esses reabsorvidos, mumificados ou autolizados; nascerem mortos; vivos, porém doentes ou clinicamente normais, porém portadores da infecção (YAEGER et al., 1994), tanto o gado de corte, quanto o leiteiro em todo o mundo tem sido relatado como portadores de *N. caninum*, (DUBEY, 1999b).

Alterações reprodutivas, tais como, repetição de cio, infertilidade e baixo desempenho reprodutivo também podem ser observadas (GONDIM et al., 2004 a) além de diminuição na produção leiteira (GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2011). Outros sinais clínicos associados à neosporose, tais como: flexão ou hiperextensão dos

membros; ataxia; diminuição do reflexo patelar e perda da propriocepção consciente; perda de peso e incapacidade para se levantar, têm sido descritos somente em bezerros com menos de 2 meses de idade, ou que nascem infectados (DUBEY e LINDSAY, 1996; BARR et al., 1993).

3.5. EPIDEMIOLOGIA

Neosporacanium é transmitido verticalmente de forma eficiente em bovinos, provavelmente por várias gerações (ANDERSON et al., 1997). Vacas que abortam uma vez podem abortar de novo, não ocorrendo a transmissão vertical do parasito.

Um melhor entendimento da dinâmica de transmissão deste protozoário dentro da população bovina faz-se necessário para adoção de estratégias de controle adequadas. Estudos nos EUA e no Reino Unido têm mostrado uma alta probabilidade (81-100%) das vacas infectadas transmitirem *N. caninum* aos filhotes durante a gestação (PARÉ et al., 1995; THURMOND e HIETALA, 1997b; DAVISON et al., 1999), pois os estádios assexuados de *N. caninum* são transmitidos verticalmente em bovinos por várias gerações (DUBEY, 1999a). Em contraste, somente poucas taxas de transmissão horizontal (como indicativo de soroconversão) tinham sido registradas até 1999 (HIETALA e THURMOND 1999; DAVISON et al., 1999). Contudo, modelos matemáticos sobre a infecção por *N. caninum* dentro de fazendas leiteiras, sugerem que as baixas taxas de transmissão horizontal podem ser importantes para a manutenção da infecção dentro dos rebanhos (FRENCH et al., 1999), a menos que animais soropositivos sejam selecionados, para a reprodução (BJORKMAN et al., 1996).

Embora a transmissão vertical possa contribuir significativamente para a persistência da infecção na fazenda, a infecção horizontal em bovinos tem sido também documentada (THURMOND et al., 1997; DIJKSTRA et al., 2001a) e hoje caracterizada em vários estudos como um importante modo de infecção (McALLISTER; LATHAM, 2002).

Em propriedades em que a transmissão vertical é a rota dominante de infecção, os soropositivos encontram-se uniformemente distribuídos entre as diferentes faixas etárias e pertencentes às mesmas linhagens de família (WOUDA et al., 1999; DIJKSTRA et al., 2001a). A evidência de uma infecção horizontal ou pós-

natal é observada, quando existe uma falta de associação entre a condição sorológica das vacas em relação a suas filhas (THURMOND et al., 1997), diferença no número de animais soropositivos de acordo com a faixa etária (DIJKSTRA et al., 2001a), presença de uma curva epidêmica durante surtos de abortamentos associados a *N. caninum* (McALLISTER et al., 1996, 2000), infecção aguda baseada nos resultados do ELISA por avidéz (BJORKMAN et al., 1999; JENKINS et al., 2000) e por observação da soroconversão em estudos longitudinais (DAVISON et al., 1999; HIETALA e THURMOND, 1999).

3.6. DIAGNÓSTICO, CONTROLE E PROFILAXIA

A presença de anticorpos específicos no soro de vacas que abortaram e de cães é somente um indicativo da exposição dos animais para o *N. caninum*. Vários testes sorológicos têm sido usados para detectar anticorpos deste parasito, incluindo o teste de ELISA (BJORKMAN et al., 1999; ATKINSON et al., 2000) a imunofluorescência indireta (RIFI), e o teste de aglutinação direta (DUBEY et al., 1997; PACKHAM et al., 1998; ROMAND et al., 1998; WOUUDA et al., 1998) e o “Western Blots” (ATKINSON et al., 2000).

Em 2000 foi validado pela Divisão de Segurança Alimentar em Edmonton no Canadá, frente ao Immunoblotting (IB) e ao ELISA de inibição competitiva com uma sensibilidade de 97,56 a 100% e especificidade de 93,33 a 98,53% respectivamente. Demonstrando possuir uma alta reprodutibilidade e substancial concordância (WU et al. 2002).

Schares et al. (2002) registraram uma alta sensibilidade do ELISA utilizado no estudo frente a RIFI. Os soros positivos no ELISA, também reagiram especificamente com o IB, indicando que a discrepância entre o ELISA e a RIFI, não foi em virtude de uma baixa especificidade do ELISA.

Uma das técnicas mais utilizadas no diagnóstico de aborto em bovinos, bem como em estudos epidemiológicos e filogenéticos é a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do DNA genômico do parasito nos tecidos fetais, devido à sua rapidez e facilidade de execução, além da tolerância com relação à qualidade da amostra enviada (BASZLER et al., 1999; SCHOCK et al., 2000; COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2002).

O exame do feto faz-se necessário para um diagnóstico definitivo da neosporose. O ideal seria que todo o feto fosse analisado, porém, caso não seja possível, amostras de cérebro, coração e fígado devem ser coletadas e enviadas para avaliação histopatológica (DEMEERSCHAM et al 2002) e imunohistoquímica (BASZLER et al., 1999; DUBEY, 1999a), além da avaliação sorológica de fluidos corporais e do soro sanguíneo (DUBEY & LINDSAY, 1996; DUBEY 2003).

A presença de anticorpos no soro de fetos abortados confirma a infecção, contudo resultados negativos não podem descartar a presença do parasito, pois a síntese de anticorpos pelo feto é dependente do período da gestação, nível de exposição, e o tempo entre a infecção e o aborto (BARR et al., 1995; WOUDA et al., 1997). Além disso, o tempo de autólise fetal pode acelerar a degradação das imunoglobulinas gerando com isso resultados falso-negativos (WOUDA et al., 1997).

Além dos métodos já descritos, há ainda o isolamento do parasito em cultivo celular ou em animais de laboratório (LINDSAY e DUBEY, 1989b).

O diagnóstico por meio de ensaio biológico era difícil de ser realizado, pois não havia um modelo satisfatório utilizando roedores para neosporose, visto que o *N. caninum* não era patogênico para diversas linhagens de camundongo (LINDSAY e DUBEY, 1989b; 1990), somente certas linhagens imunodeficientes ou quimicamente imunossuprimidos eram susceptíveis com a inoculação parenteral de taquizoítos (LINDSAY et al., 1995; DUBEY et al., 1998), não sendo visto susceptibilidade para inoculação oral com oocistos de *N. caninum* (LINDSAY et al., 1999b).

Hoje sabe-se que gerbils da Mongólia (*Merionesunguiculatus*) são susceptíveis para taquizoítos (GONDIM et al., 1999) e oocistos (DUBEY e LINDSAY, 2000), sendo utilizado como modelos em bioensaio para o isolamento do *N. caninum*.

Não existe um tratamento nem vacinas eficazes contra a neosporose, desta forma, medidas de controle e profilaxia devem ser fundamentados nos aspectos epidemiológicos conhecidos, até o momento devem ser realizadas com o intuito de evitar a disseminação da doença. Recomenda-se que cães, únicos hospedeiros definitivos domésticos, até o momento, não devem ter acesso às instalações, à água ou à comida das vacas, para evitar uma possível contaminação, com suas fezes (DIJKSTRA et al. 2002). Assim como, deve ser evitado o consumo de placentas, carcaças, descargas uterinas das vacas e alimentação com carne crua para os cães (HEMPHILL; GOTTSTEIN, 2000; BASSO et al., 2001; DIJKSTRA et al., 2001b). Embora, a transmissão horizontal, entre vacas, ainda não tenha sido provada, alguns

autores têm recomendado o descarte do animal, devido à eficiência da transmissão vertical (TRESS et al., 1999).

Embora pouco se saiba sobre o tempo de eliminação e a resistência dos oocistos no ambiente, é prudente evitar a contaminação de água e alimentos, com fezes de cães, além de se evitar a ingestão por cães de fetos abortados, membranas fetais e bezerros mortos. Não existem vacinas eficientes para prevenção do aborto ou para evitar eliminação dos oocistos pelos cães, sendo o descarte o único caminho, até o momento para prevenção da transmissão vaca-bezerro (DUBEY, 1999a).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. LOCAL DE EXECUÇÃO E ANIMAIS UTILIZADOS

As amostras para este estudo foram coletadas de animais destinados ao abate em um frigorífico do Município de Campos dos Goytacazes-RJ e o processamento do material foi realizado no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Parasitologia (NUPAP) localizado no Hospital Veterinário da UENF e pertencente ao Setores de Parasitologia Veterinária do Laboratório de Sanidade Animal (LSA) do Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuária (CCTA).

Foram utilizadas 195 vacas das quais 112 de corte e 83 leiteiras além dos respectivos fetos das 83 prenhes. De todos os fetos, foram coletados sangue, e seus cérebros que foram estocados em temperatura de -20°C , destes foram selecionados os oriundos de vacas soropositivas para *N. caninum*, e esses foram avaliados quanto a presença de anticorpos anti-*N. caninum* (22) e presença do DNA do parasita nos cérebros pela PCR. Todos os animais eram originários de propriedades de bovinos da Mesorregião Norte Fluminense.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS

A aptidão das vacas foi determinada pela observação fenotípica dos animais e através de inspeção visual das mudas dentárias, as vacas foram caracterizadas quanto à idade (DIRKSEN, et al. 1993). Desta forma, vacas com erupção da dentição permanente dos incisivos centrais e mediais foram caracterizados com idade de até 3 anos e vacas com erupção dos incisivos laterais e cantos, com idade acima de três anos.

A determinação da idade fetal e conseqüentemente o período de gestação da vaca, foram calculados de acordo com a fórmula adaptada de Noakes (1986) citado por Collantes-Fernández (2003) a seguir:

$$\text{Idade fetal} = \sqrt{\frac{2 \times \text{distância entre a região occipital e a base da cauda}}{2,54}}$$

4.3. COLETA DE AMOSTRAS

Foram coletados 10 ml de sangue da veia jugular de vacas abatidas e dos respectivos fetos, das vacas que estavam prenhes, após antissepsia local com solução de álcool iodado a 2%, utilizando agulhas descartáveis de dimensão 40x12. O sangue foi colocado em tubos de 5 ml (BD Vacutainer®) com gel separador, identificados e mantidos em refrigeração até seu processamento. Dos fetos também foram coletados fragmentos de tecidos do cérebro e estes foram acondicionados em sacos plásticos devidamente identificados, mantidos em congelamento a – 20 °C e posteriormente utilizados para a extração de DNA e aplicação da técnica de PCR (MEDINA et al., 2006).

4.4. PROCESSAMENTO DO SANGUE

4.4.1. Obtenção do soro

As amostras de sangue foram centrifugadas a 350 x g por 10 minutos para a separação do soro e esse foi recolhido e acondicionado em microtubo plástico “snapcap” de 2,0 mL em duplicata, identificados que foram mantidos a temperatura de –20 °C até o momento da realização dos exames sorológicos.

4.4.2. Sorologia

Para detecção e titulação de anticorpos anti-*N.caninum* em vacas e fetos, foram utilizados o teste de ELISA indireto (Herdcheck®, IDEXX Laboratories Inc. EUA) de acordo com a recomendação do fabricante.

4.5. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

4.5.1. Extração do DNA

Para a extração do DNA, foi utilizado o DNeasyTissue Kit (Qiagen®), com algumas modificações em relação ao protocolo sugerido pelo fabricante (SANTÍN et al., 2004). Para cada amostra, foram adicionados 180 µl de Tampão ATL e 20µL de proteinase K e, após homogeneização em vortex, foram incubadas a 55°C até que dissolvessem todo o tecido. Após esta etapa, as amostras foram novamente homogeneizadas em vortex durante 15 segundos e, em seguida, foram adicionados 200 µl de Tampão AL. Cada amostra foi submetida a uma nova homogeneização e incubada a 70°C por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 200 µl de etanol (96–100%) em cada tubo de amostra, que foram homogeneizados e o conteúdo transferido para uma coluna DNeasy Mini spin, colocada em tubo de 2 mL. Cada coluna foi centrifugada a 6.000 x g (8.000 rpm) por 1 min e, logo após, todo o conteúdo do tubo de 2 mL foi descartado. As colunas DNeasy Mini spin foram então colocadas em um novo tubo de 2 mL, adicionados 500 µL de Tampão AW1, e submetidas a nova centrifugação por 1 min a 6.000 x g (8.000 rpm), tendo o conteúdo do tubo de 2 mL novamente descartado. Cada coluna foi colocada em um novo tubo de 2 mL, adicionados 500 µL de Tampão AW2, e centrifugados dessa vez por 3 min a 20.000 x g (14.000 rpm) com a finalidade de secar a membrana da coluna DNeasy. O conteúdo do tubo de 2 mL foi então descartado.

As colunas DNeasy Mini spin foram colocadas em um novo tubo de 1,5 mL, e foram adicionados 100 µL de Tampão AE diretamente da membrana da coluna DNeasy com a finalidade de aumentar a concentração de DNA. Após 1 min de incubação em temperatura ambiente, foram então centrifugadas por 1 min a 6000 x g (8.000 rpm) para eluição.

4.5.2. Reação em Cadeia da Polimerase

Foi utilizada a técnica de PCR, com amplificação de um fragmento de 328 pares de bases (pb) do gene 18S rRNA com o iniciador Np6 plus e Np21 plus (5'-CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT-3') e (5'-CCCAGTGCGTCCAATCCTGTAAC-3').

O procedimento de amplificação foi realizado com os seguintes componentes para a amplificação: Água para PCR (31 µl), tampão com MgCl₂ (6 µl), dNTP (2 µl); tampão sem MgCl₂ (5 µl), Taqpolimerase (0,5 µl), 0,25 µl de cada um dos iniciadores (Np6 plus e Np21plus) e o DNA extraído (5 µl) totalizando um volume final de 50 µl.

Para a amplificação, foram realizados os seguintes ciclos no termociclador: 95 °C/2 minutos; 35 ciclos de 95 °C/30 segundos 55 °C/30 segundos e 72 °C/1 minuto; e uma extensão final de 72 °C/5 minutos.

Os produtos da PCR foram analisados em eletroforese de gel de agarose a 1,5% corado com gel red (Biotium[®]) e imerso em tampão TAE 10X em cuba horizontal.

A visualização das bandas foi realizada sob transiluminação ultravioleta em fotodocumentadora (Kodak EDAS 290[®]) após a corrida eletroforética, e os tamanhos dos fragmentos comparados com marcador molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen[®]) e com controles positivo e negativo.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o Teste de Fisher para comparar as frequência de vacas com a presença de anticorpos anti- *N. caninum* em seus soros com vacas negativas, em relação à aptidão (corte e leiteira), faixa etária das vacas (até três anos e mais de três anos), estado gestacional (prenhe e vazia) e o Teste do χ^2 para comparar a frequência de acordo com o período gestacional (primeiro, segundo e terceiro trimestres). A correlação entre os valores de razão S/P referentes ao Teste de ELISA de vacas prenhes positivas, seus respectivos fetos e idade dos mesmos foi feita utilizando-se a Regressão Linear Múltipla. O Teste de Fisher foi utilizado também para comparar a taxa de transmissão vertical pelo Teste de ELISA com PCR com a taxa de transmissão vertical pela PCR em relação a aptidão, faixa etária das vacas, estado gestacional e o período gestacional (até seis meses e maior que seis meses). Todos os testes foram feitos utilizando-se o programa SAEG – Sistema para Análise Estatística, versão 9.1 com intervalo de confiança de 95%.

5. RESULTADOS

5.1. FREQUÊNCIA DE *Neospora caninum* EM VACAS

As amostras de soros das vacas 22% (43/195), tinham anticorpos anti-*N. caninum*, as vacas com características fenotípicas de animais de corte 17% (19/112) eram soropositivas. As vacas leiteiras 29% (24/83) foram sororreativas. Não foi observada diferença significativa comparada pelo Teste de Fisher ($p=0,0553$) quanto à aptidão dos animais (Figura 1).

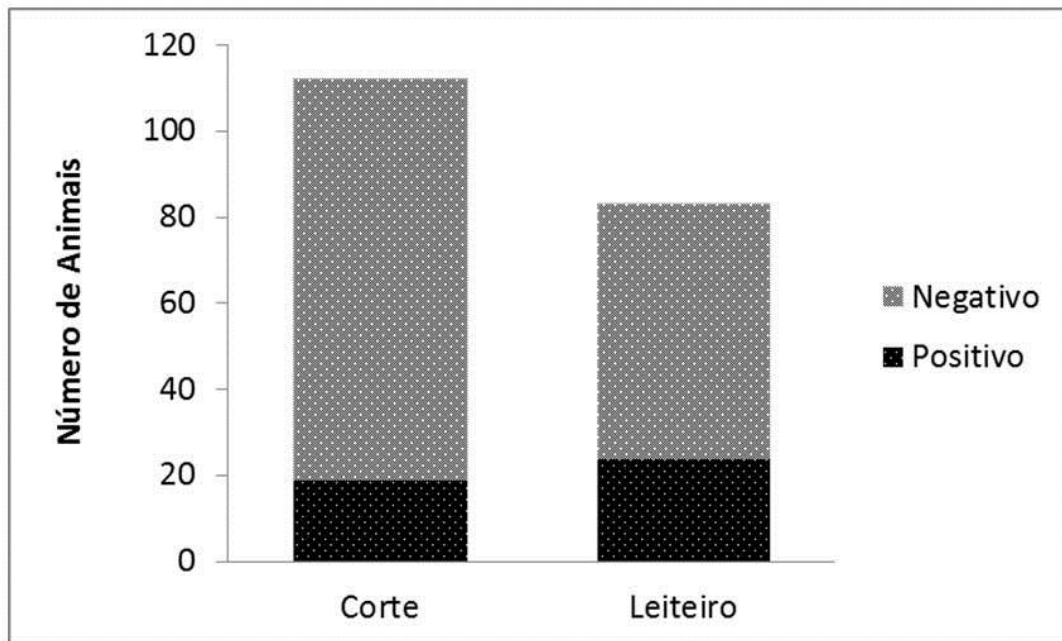


Figura 1: Frequência de anticorpos anti-*Neosporacanicum* em vacas de corte soropositivas 10% (19/195) e negativos 48% (93/195), comparadas pelo Teste de Fisher ($p=0,0553$) com aproximação de Katz e intervalo de confiança de 95%, com vacas de aptidão leiteiras soropositivas 12% (24/195) e soronegativas 30% (59/195) oriundas do Norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Foi possível identificar a idade de 173 vacas das 195 avaliadas e verificou-se que dos animais com idade superior a três anos, 26% (26/100) tinham anticorpos anti-*N. caninum* não observando diferença significativa ($p=0,0937$) com as vacas soropositivas com menos de três anos 15% (11/73) comparadas pelo Teste de Fisher (Figura 2).

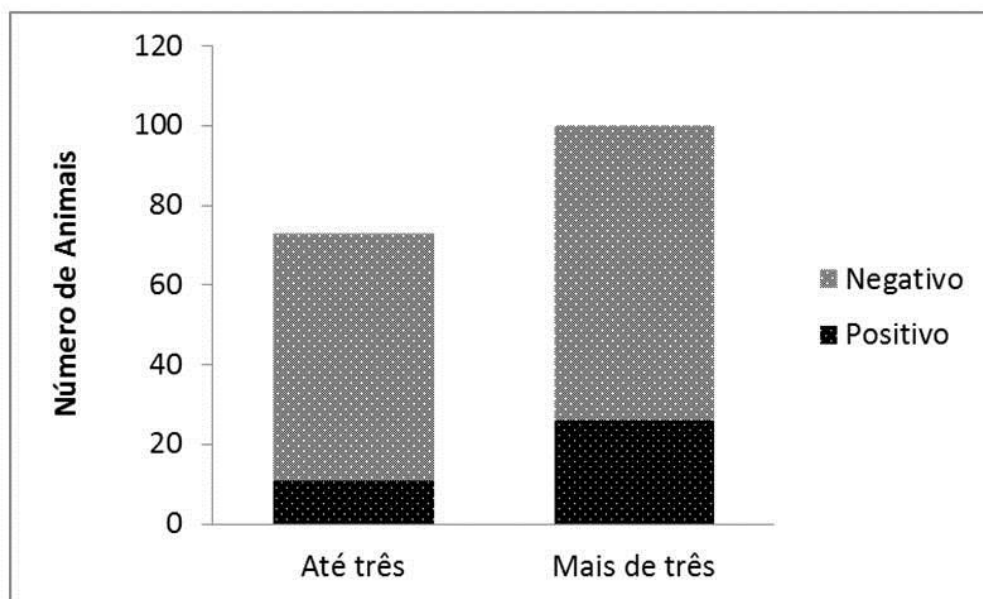


Figura 2: Frequência de anticorpos anti-*Neosporacanium* em vacas com até três anos soropositivas 6% (11/173) e negativos 36% (62/173), comparadas pelo teste de Fisher ($p=0,0937$) com aproximação de Katz e intervalo de confiança de 95%, com vacas com mais de três anos soropositivas 15% (26/173) e soronegativas 43% (74/173) oriundas do Norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Das vacas prenhes avaliadas 28% (23/83), tiveram anticorpos anti-*N. caninum* e com relação às vacas vazias 18% (20/112) estavam soropositivas não havendo diferença estatística ($p=0,1172$) comparadas pelo Teste de Fisher (Figura 3).

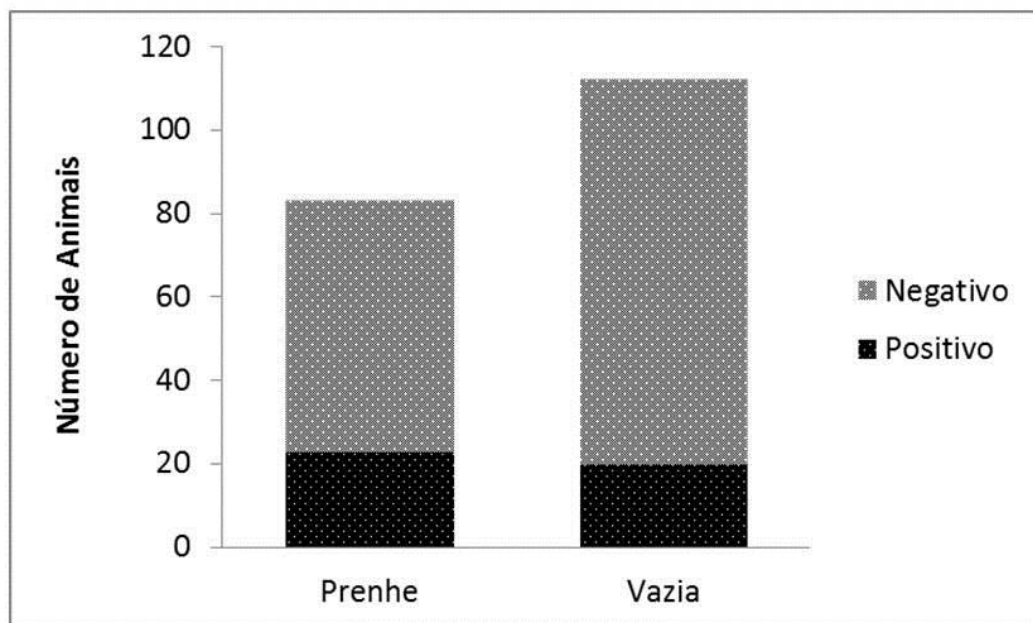


Figura 3: Frequência de anticorpos anti-*Neosporacanium* em vacas Prenhes soropositivas 12% (23/195) e negativos 31% (60/195), comparadas pelo Teste de Fisher ($p=0,1172$) com aproximação de Katz e intervalo de confiança de 95%, com vacas vazias soropositivas 10% (20/195) e soronegativas 47% (92/195) oriundas do Norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Com relação ao período gestacional também não se verificou diferenças estatísticas ($p=0,4299$) entre as vacas soropositivas para *N. caninum* no primeiro 20% (2/10), segundo 34% (14/41) e terceiro 22% (7/32) trimestres de gestação das vacas (Figura4).

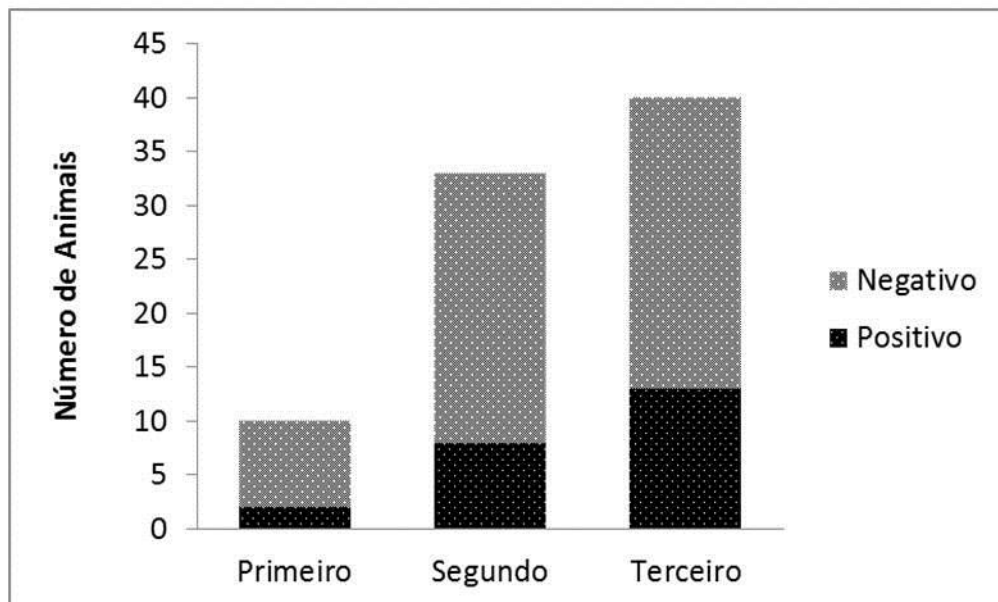


Figura 4: Frequência de anticorpos anti-*Neosporacanium* em vacas no primeiro trimestre gestacional soropositivas 2,4% (2/83) e negativos 9,6% (8/83), em vacas no segundo trimestre gestacional soropositivas 9,6% (8/83) e negativas 28,9% (24/83) e no terceiro trimestre gestacional soropositivas 15,7% (13/83) e negativas 33,7% (28/83) oriundas do Norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. comparadas pelo Teste do χ^2 ($p=0,6904$) e intervalo de confiança de 95%

5.2. TRANSMISSÃO VERTICAL

5.2.1. Ensaio ImunoEnzimático (ELISA)

Foi observada uma taxa de 23% de transmissão vertical sem correlação positiva nos valores da razão S/P entre as vacas e os fetos ($P=0,0618$), idade dos fetos com a razão (S/P) das vacas ($p=0,8378$) e nem dos fetos ($p=0,3360$).

Constatou-se também que, das oito vacas com razão (S/P) mais elevada ($> 1,5$), quatro foram capazes de transmitir a infecção ao feto 50% ao contrário das 14 vacas com razão (S/P) mais baixa ($\leq 1,5$), somente uma transmitiu o parasita ao feto 7% (Tabela 1).

Tabela 1- Avaliação da infecção congênita *Neosporacanicum* de vacas prenhes, seus respectivos fetos através da pesquisa de anticorpos e DNA do parasita.

Amostras	Vacas soropositivas ¹		Fetos	
	Razão (S/P) ⁴	Gestação ³	Razão (S/P)	PCR ²
1	0,561	1 ^o	0,032	N
2	0,659	3 ^o	0,032	AP ⁴
3	1,424	2 ^o	0	N
4	1,240	2 ^o	0,029	+
5	1,545	3 ^o	0,032	+
6	0,797	3 ^o	0,033	+
7	0,654	2 ^o	0,020	+
8	1,016	3 ^o	0,032	+
9	1,409	2 ^o	0,030	+
10	1,942	2 ^o	1,459*	+
11	1,861	3 ^o	1,590*	+
12	1,25	2 ^o	-0,04	N
13	2,47	2 ^o	-0,05	+
14	0,74	3 ^o	-0,06	N
15	2,99	3 ^o	-0,01	+
16	2,92	3 ^o	3,13*	+
17	1,99	3 ^o	2,90*	+
18	1,11	3 ^o	2,55*	+
19	2,03	3 ^o	0,10	+
20	2,14	2 ^o	0,19	N
21	0,59	3 ^o	0,08	+
22	0,74	3 ^o	-0,03	+

¹ Pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* pelo teste de ELISA indireto (Herdcheck®, IDEXX Laboratories Inc. EUA).

² Amplificação de um fragmento de 328 pares de bases do gene 18S rRNA.

³ Em trimestres.

⁴ Amostra perdida.

* Fetos sorologicamente positivos ($S/P \geq 0,5$)

$$^1 S/P = \frac{(\text{Valores médios de absorbância da amostra}) - (\text{Valor médio do controle negativo})}{(\text{Valor médio do controle positivo}) - (\text{Valor médio do controle negativo})}$$

5.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Das 22 vacas soropositivas para *N. caninum* e prenhes foram avaliados molecularmente 21 fetos, observando-se a presença de fragmento específico de 328 pb do DNA do parasita em 16 amostras (Figura 5), caracterizando transmissão vertical de 76% (16/21). Estes resultados foram significativamente maior ($p=0,0007$), quando comparados a avaliação pela sorologia dos fetos (Tabelas 1)

Sete destas vacas tinham aptidão para corte e, dessas seis transmitiram o parasita aos fetos (86%) e das outras 14 vacas de aptidão leiteira, 10 (71%) foram capazes de transmitir o parasita para seus respectivos fetos (Tabela 1). Não foi observada diferença estatística pelo Teste de Fisher ($p=0,6244$) quanto à capacidade de transmissão vertical de *N. caninum* em relação à aptidão das vacas.

Com relação à idade das vacas, foi possível avaliar a transmissão vertical em 17 das 22 soropositivas para *N. caninum*. Observou-se que 85% (11/13) das vacas com idade superior a três anos transmitiram congenitamente (Tabela 2) o parasita a seus fetos e 50% (2/4) das vacas com idade igual ou inferior a três anos de idade não impediram a transmissão do parasita via placenta e não foi observada diferença estatística ($p=0,2189$) pelo Teste de Fisher (utilizando aproximação de Katz).

Foi possível avaliar infecção fetal quanto ao período gestacional em 21 amostras de cérebro verificando-se que 92% (11/12) dos fetos infectados pertenciam a vacas que se encontravam no último trimestre de gestação e 56% (5/9) dos fetos contaminados eram oriundos de vacas com gestação até seis meses (Tabela 1) e não foi constatada diferença significativa ($p=0,1194$) pelo Teste de Fisher (com aproximação de Katz).

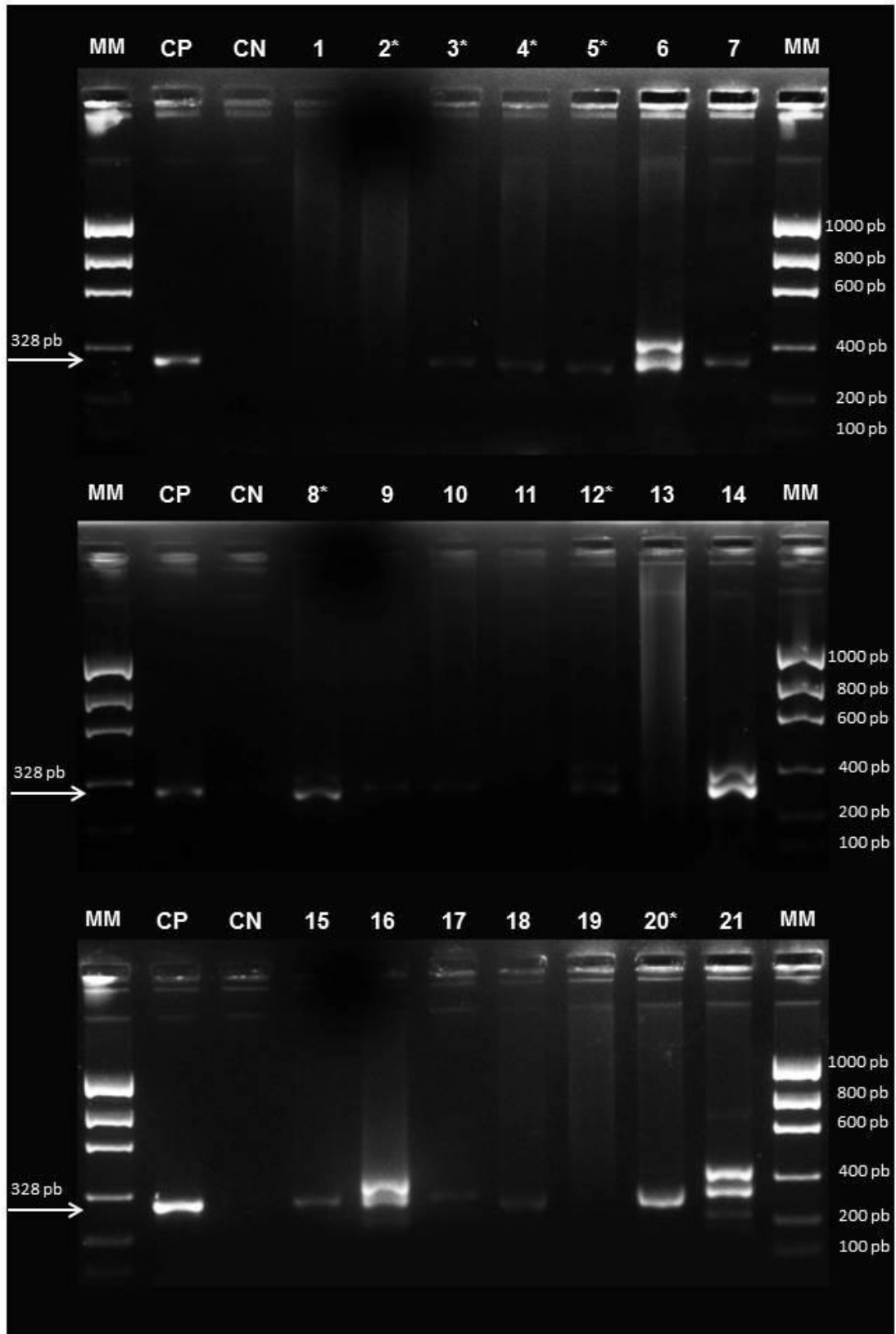


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os produtos da PCR do gene 18S rRNA de *Neosporacanium*. Marcador molecular (MM), controle positivo (CP) com banda visível de 328 pares de bases (pb), controle negativo (CN) e amostras de 1 a 21, (*) vacas de aptidão de corte.

6. DISCUSSÃO

Embora com grande variabilidade em média, frequências de neosporose próxima aos 22%, observado no Norte Fluminense, foram constatadas em outras regiões do Brasil, como os 12% encontrados no Norte do Paraná (OGAWA et al., 2008), 30,4% de Anápolis e Goiânia em Goiás (MELO et al., 2006) e 23,3% no Rio de Janeiro (MUNHOZ et al., 2006). Nas Américas, as frequências também têm variabilidade bastante acentuada oscilando desde 11,6 % observados no México (GARCIA-VAZQUEZ et al. 2009), 45% para EUA (ANDERSON et al., 1995) chegando aos 80,9% observados na Argentina (MORÉ et al., 2009).

Estudos epidemiológicos feitos em países da Europa evidenciaram frequências elevadas, porém com variabilidade de resultados como os 46,5 % observados na Turquia (KUL et al., 2009), 49% na Alemanha, 63% na Espanha e 76% na Holanda (BARTELS et al. 2006).

Esta tendência na variabilidade de frequência de neosporose se repete em outras regiões do mundo como os 23 a 34% observados por Landmann et al. (2011) na Austrália e os 12,2 a 26,7 citados por Xia et al. (2011) na China. Estas últimas citações junto aos 20,1 % observados na Eslováquia (REITEROVÁ et al., 2009), são próximas às observadas nas vacas do Norte Fluminense. Esta variabilidade da frequência de anticorpos anti-*N. caninum* pode ser atribuída aos diferentes tipos de manejos nas diferentes regiões e países como já citado por Dubey et al. (2007).

Com relação à aptidão dos animais leiteira ou de corte, os dados de nossa pesquisa 29% e 17% são superiores aos observados por Aguiar et al. (2011) no estado de São Paulo 13,7% e 8,6%, respectivamente. Resultados observados por Caetano-da-Silva et al. (2004) para bovinos de corte (16,3%) são próximos à frequência observada para as vacas abatidas no Norte Fluminense, no entanto, para os animais de aptidão leiteira estes pesquisadores obtiveram resultados bem abaixo do padrão europeu (7%), dos 18,9% observados na China (XIA et al, 2011) e inclusive para as vacas de respectiva aptidão abatidas e avaliadas na presente pesquisa.

Embora concordando com Melo et al. (2006), que também não observaram diferença quanto à aptidão dos bovinos no estado de Goiás o que pode explicar a maior frequência de neosporose em vacas leiteiras (Figura 1), pode ser a maior tecnificação implementada nas propriedades, imprimindo maior estresse relativo à produtividade, o que ocorre com menor intensidade em propriedades de países em

desenvolvimento, incluindo as do Norte Fluminense (GALVÃO et al., 2011), a exceção aos dados de Caetano-da-Silva et al. (2004) para vacas da Espanha

Vacas com idade superior a três anos tiveram uma soroprevalência maior (Figura 2). Do mesmo modo Ragozo et al. (2003) observaram em seis estados brasileiros, incluindo o Rio de Janeiro, frequência crescente de anticorpos anti-*N. caninum* com o aumento da idade dos animais. Guimarães Júnior et al. (2004) no Paraná, estado que também foi pesquisado por Ragozo et al (2003), observaram frequência crescente de acordo com a idade dos animais. Xia et al. (2011) e Teixeira et al. (2010) citam frequências crescentes até a idade de cinco e seis e anos das vacas, respectivamente, com declínio a partir dessa idade. Resultados contrários foram descritos por Melo et al. (2006) que encontraram 30,2% de vacas soropositivas contra 35,7% em novilhas. Assim como Munhoz et al. (2004), todos os demais pesquisadores (RAGOZO et al., 2003; GUIMARÃES JÚNIOR et al., 2004; MELO et al., 2006; PABÓN et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2010; XIA et al., 2011), não encontraram evidências da interferência da idade com a frequência de anticorpos anti-*Neosporacanium* em bovinos, tal como os resultados observados na pesquisa para o Norte Fluminense (Figura 2), que a diferença entre as frequências (15% e 26%) também não foram suficientes para se determinar diferença estatísticas quanto as faixas etárias ($p=0,0937$), reforçando a hipótese de que a transmissão vertical é a principal via de transmissão da neosporose como já citado por Benetti et al (2009) e Marques et al. (2011).

Dados relativos à frequência de 15,8% para vacas prenhe com anticorpos anti-*N. caninum* em seus soros, descrito por Marques et al. (2011) são inferiores aos obtidos nas vacas prenhes do Norte Fluminense 28% (Figura 3). Frequência de 22,3% e 32,6% foram observadas por Pabón et al. (2007) e López-Gatius et al. (2005) respectivamente, também em vacas prenhes, resultados mais próximos ao 28% verificados no Norte Fluminense. Para esta região, a condição gestacional não é fator determinante quanto à taxa de infecção por *N. caninum*, uma vez que não foi observada diferença estatística quanto ao estado de prenhes ou não das vacas ($p=0,1172$), logo estes resultados confirmam a não associação entre a neosporose e a redução da fertilidade como já citado por Brickell et al. (2010).

Marques et al. (2011) descreve que a resposta imune celular e humoral da vaca como responsável pela diminuição da disseminação de taquizoítos extracelular durante a gestação o que influencia na permanência gestacional da mesma. Esta

afirmação pode estar ligada também à observação de não ser verificada diferença estatística ($p=0,4299$) entre os primeiro, segundo e terceiros trimestres de gestação das vacas de sua pesquisa e as do Norte Fluminense (Figura 4). Em infecção natural Corbellini et al. (2006), verificou uma significativa diferença em números de animais positivos no terço médio de gestação, no entanto, em infecção experimental não foram observadas diferenças quanto ao período gestacional (McCann et al., 2007), concordando com os resultados do Norte Fluminense (Figura 4).

A taxa de 23% (5/22) de transmissão vertical obtida pela sorologia (Tabela 1) está abaixo da média de outros autores que variaram de 33,7% à 58% (;DIJKSTRA et al. 2008; KUL et al., 2009; MORÉ et al., 2009), porém ao se analisar pela PCR (Figura 5), a taxa de transmissão vertical de 76% (16/21) desta pesquisa é superior aos pesquisadores citados, no entanto próximas as observadas por Romero e Frankena (2003), 63,7%, e Hein et al. (2012), 69,2%, ambos com avaliações sorológicas das vacas e fetos. A variação dos resultados através da sorologia pode ser atribuída à imaturidade imunológica dos fetos ou por terem esses sofrido infecções recentes não havendo tempo hábil para produção de anticorpos (DUBEY; SCHARES, 2006). A análise pela PCR foi bem superior às taxas citadas por Corbellini et al. (2006) através da análise por Imunohistoquímica dos fetos (23%) sugerindo ser a PCR uma ferramenta mais eficiente que a imunohistoquímica. Dubey e Schares, (2011) citam *N. caninum* como um dos parasitas mais eficientes em transmissão transplacentária entre todos os agentes infecciosos que acometem bovinos, o que reafirma a importância da transmissão vertical como principal via de infecção da neosporose (HEIN et al., 2012), assim como ocorre nas vacas do Norte Fluminense avaliadas na presente pesquisa. Um maior número de fetos positivos avaliados pela PCR do que pela sorologia (Tabela 1), assim como verificado nos trabalhos de Santos et al. (2010) e Marques et al. (2011), pode ser atribuída à inadequada resposta humoral do feto (MOORE et al., 2002).

O aborto é a principal evidência clínica da neosporose podendo ocorrer do terceiro mês ao término da gestação, mas principalmente, no quinto e sexto mês (DUBEY 1999^a), pode ser por isso que a incidência no último trimestre foi maior na presente pesquisa (Tabela 1), provavelmente por alguns fetos infectados nos dois primeiros trimestres, que poderiam ser dados como positivos, terem sido abortados e por tanto não avaliados.

Dubey e Schares, (2006) afirmam que a grande maioria das vacas que abortaram por neosporose tinham altos níveis de anticorpos anti-*Neosporacanium* em seus soros. González-warleta et al.(2008),assim como outros autores (PARÉ et al.,1997; QUINTANILLA-GONZALO et al., 2000), observaram um aumento significativo dos níveis de anticorpos no terceiro trimestre de gestação, o que ocorreu também em nossa pesquisa (Tabela 1), desta forma a transmissão vertical pode ser favorecida, como evidenciado através da alta frequência de infecção (92%) no último trimestre de gestação do nosso trabalho.

7. CONCLUSÕES

- Os rebanhos de vacas da região Norte Fluminense estão infectados de forma endêmica por *N. caninum* independentemente da aptidão, idade ou estado gestacional
- A transmissão vertical é uma importante via de infecção no rebanho do Norte fluminense, e pode ser caracterizada como a principal via, devido aos altos índices de infecção congênita detectada na presente pesquisa e à não significativa diferença observada entre as faixas etárias
- A PCR parece ser uma melhor ferramenta que o Teste de ELISA para o estudo de infecção congênita da neosporose.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AGUIAR, D. M.; LACERDA, D. P.; ORLANDELLI, R. C.; MEDINA, A. O.; AZEVEDO, S. S.; OKUDA, L. H.; CASTRO, V.; GENOVEZ, M. E.; PITUCO, E. M. Seroprevalence and risk factors associated to *Neosporacanicum* in females bovines from the western São Paulo state, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 78, n. 2, p. 183-189, 2011.
- ANDERSON, M. L.; BLANCHARD, P. C.; BARR, B. C. *Neospora*-like protozoan infection as major cause of abortion in California dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 198, n. 2, 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. M.; DAFT, B. M.; 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. 1206-1210, 1995.
- ANDERSON, M. L.; REYNOLDS, J. P. ROWE, J. D. 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.
- ATKINSON, R. A.; HARPER, P. A. W.; REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. Progress in the serodiagnosis of *Neosporacanicum* infections of cattle. **Parasitology Today**, v. 16, n. 3, p. 110-114, 2000.
- BARR, B. C., ANDERSON, M. L., DUBEY, J. P., CONRAD, P. A. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. **Veterinary Pathology**, v. 28, n. 2, p. 110-116, 1991.
- BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; BREITMEYER, R. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 202, n. 1, p.

113-117, 1993.

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, n. 32 p. 611-613, 1995.

BARTELS, C. J. M.; ARNAIZ-SECO, J. I.; RUIZ-SANTA-QUITERA, A.; BJÖRKMAN, C.; FRÖSSLING, J.; VON BLUMRÖDER, D.; CONRATHS, F. J.; SCHARES, G.; VAN MAANEM, C.; WOUDA, W.; ORTEGA-MORA, L. M. Supranacional comparison of *Neospora Caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. **Veterinary Parasitology** V. 137, n. 25 p. 17-27, 2006.

BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M. C.; HILL, D. E.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K. DUBEY, J. P. First isolation of *Neosporacanium* from the feces of a naturally infected dog. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 3, p. 612-618, 2001.

BASZLER, T. V., LAWRENCE, J. C., MAUREENT, T. L., MATHISON, B. Detection by PCR of *Neosporacanium* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 4059-4064, 1999.

BENETTI, A. H.; SCHEIN, F. B.; SANTOS, T. R.; TONOLLO, G. H.; COSTA, A. J.; MINEO, J. R. LOBATO, J.; SILVA, D. A. O.; GENNARI, S. M. Pesquisa de anticorpos anti-*neosporacanium* em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais da região sudoeste do estado do Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 29-33, 2009.

BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zentralblatt für Parasitenkunde**, v. 70, n. 2, p. 271-274, 1984.

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, n. 9, p. 1441-1444, 1996.

BJÖRKMAN, C.; NASLUND, K.; STENLUND, S.; MALEY, S. W.; BUXTON, D.; UGGLA, A. An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neosporacanium*

infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n. 1, p. 41-44, 1999.

BRICKELL, J. S.; MCGOWAN, M. M.; WATHES, D. C. Association between *Neosporacanium* seropositivity and perinatal mortality in dairy heifers at first calving. **The Veterinary Record** n. 167, p. 82-85, 2010.

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. *Neosporacanium* infection in breeder bulls: seroprevalence and comparison of serological methods used for diagnosis. **Veterinary Parasitology**, v. 124, n. 1-2, p. 19-24, 2004.

CAVALIER-SMITH, T. Kingdom Protozoa and Its 18 Phyla. **Microbiology Review**, v. 57, n. 4, p. 953-994, 1993.

CIDE **Fundação Centro de informações e Dados do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://200.156.34.70/cide/banco_municipais.php> Acesso em: 12 jul. 2007.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ZABALLOS, A.; ÁLVAREZ-GARCIA, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Quantitative detection of *Neosporacanium* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, 1194-1198, 2002.

CORBELLINI, L. G.; PESCADOR, C. A.; FRANTZ, F.; WUNDER, E.; STEFFEN, D.; SMITH, D. R.; DRIEMEIER, D. Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neosporacanium* infection: importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 172, n. 1, p. 114-120, 2006.

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

CURRENT, W. L.; UPTON, S. J.; LONG, P. L. Chapter 1: Taxonomy and life cycles. In: **Coccidiosis of man and domestic animals**. LONG, P. L. (Ed). Boca Raton: CRC Press, 1990, p. 2-16.

- DAVISON, H. C.; OTTER, A.; TREES, A. J. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neosporacanium* infection in dairy cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1683-1689, 1999.
- DE MAREZ, T.; LIDDELL, S.; DUBEY, J. P. JENKINS, M. C.; GASBARRE, L. Oral infection of calves with *Neosporacanium* oocysts from dogs: Humoral and cellular immune responses. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1647-1657, 1999.
- DE MEERSCHMAN, F.; RETTIGNER, C.; FOCANT, C.; BOREUX, R.; PINSET, C.; LECLIPTEUX, T.; LOSSON, B. Use of a serum-free medium to produce in vitro *Neosporacanium* and *Toxoplasma gondii* tachyzoites on Vero cells. **Veterinary Research**, v. 33, n. 2, p. 159-168, 2002.
- DIJKSTRA, T; BARKEMA, H. W.; EYSKER, M.; WOUDA, W. Evidence of post-natal transmission of *Neosporacanium* in Dutch dairy herds. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 2, p. 209-215, 2001 a.
- DIJKSTRA, T; EYSKER, M.; SCHARES, G.; CONRATHS, F. J.; WOUDA, W.; BARKEMA, H. W. Dogs shed *Neosporacanium* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neosporacanium* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 8, p. 747-752, 2001 b.
- DIJKSTRA, T; BARKEMA, H. W.; HESSELINK, J. W.; WOUDA, W. Point source exposure of cattle to *Neosporacanium* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. **Veterinary Parasitology**, v. 105, n. 2, p. 89-98, 2002.
- DIJKSTRA, Th.; LAM, T. J. G. M.; BARTELS, C. J. M.; EYSKER, M.; WOUDA, W. Natural postnatal *Neosporacanium* infection in cattle can persist and lead to endogenous transplacental infection. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 220-225, 2008.
- DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H-D.; GRUNERT, E.; KRAUSE, D.; STÖBER, M. **Rosenberger. Exame Clínico dos Bovinos**, 3^a ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 419, 1993.

- DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, 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.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neosporacanthium* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 67, n. 1-2, p. 1-59, 1996.
- 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.; BJORKMAN, 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, n. 6, p. 1063-1069, 1997.
- DUBEY, J. P.; DOROUGH, K. R.; JENKINS, M.C.; LIDDELL, S.; SPEER, C. A.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neosporacanthium* in mice and cell culture. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 8, p. 1293-1304, 1998.
- DUBEY, J. P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 84, n. 3-4, p. 349-367, 1999 a.
- DUBEY, J. P. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 214, n. 8, p. 1160-1163, 1999^b.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Gerbils (*Merionesunguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neosporacanthium* oocysts. **Parasitology Research**, v. 86, n. 2, p. 165-168, 2000.
- DUBEY, J. P. Review of *Neosporacanthium* and neosporosis in animals. **Korean Journal of Parasitology**, v. 41, n. 1., p. 1-16, 2003.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1-2, p. 1-34, 2006.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of

neosporosis and *Neosporacanium*. **Clinical Microbiology Review**, v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007.

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

FRENCH, N.P.; CLANCY, D.; DAVISON, H.C.; TREES, A.J. Mathematical models of *Neosporacanium* infection in dairy cattle: Transmission and options for control. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1691-1704, 1999.

GALVÃO, G. S., GONDIM, L. F. P., PEREIRA, M. J. S., OIVEIRA, U. V., MUNHOZ, A. D. Soropositividade para *Neosporacanium* e associação ao abortamento e natimortos em rebanhos leiteiros da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 33, n.4, p. 234-237, 2011.

GARCIA-VAZQUEZ, Z.; ROSARIO-CRUZ, R.; MEJIA-ESTRADA, F.; RODRIGUEZ-VIVAS, I.; ROMERO-SALAS, D.; FERNANDEZ-RUVALCABA, M.; CRUZ-VAZQUEZ, C. Seroprevalence of *Neosporacanium* antibodies in beef in three southern states of Mexico. **Tropical animal health and production**, v. 41, p. 749-753, 2009.

GONDIM, L. F. P.; SAEKI, S.; ONAGA, H.; HARITANI, M.; YAMANE, I. Maintenance of *Neosporacanium* tachyzoites using Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). **New Zealand Veterinary Journal**, v. 47, n. 1, p. 36, 1999.

GONDIM, L. F. P., MCALLISTER, M.M., ANDERSON-SPRECHER, R. C. BJORKMAN, C., LOCK, T. F., FIRKINS, L. D., GAO, L., FISCHER, W. R. Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neosporacanium* oocysts. **The Journal of Parasitology**, v. 90, n. 6, p. 1394-1400, 2004 a.

GONDIM, L. F., MCALLISTER, M.M., PITT, W. C., ZEMLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neosporacanium*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 159-161, 2004 b.

GONDIM, L. S. Q., ABE-SANDES, K., UZÊDA, R. S., SILVA, M. S. A., SANTOS, S. L., MOTA, R. A., VIELA, S. M. O., GONDIM, L. F. P., *Toxoplasma gondii* and

Neosporacanthium in sparrows (*Passer domesticus*) in the northeast of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.168, p. 121-124, 2010.

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. 243-247, 2008.

GONZÁLEZ-WARLETA, M., CASTRO-HERMIDA, J. A., CARRO-CORRAL, C. MEZO, M. Anti-*Neosporacanthium* antibodies in milk in relation to production losses in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 101, p. 58-64, 2011.

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

HALL, C. A., REICHEL, M. P., ELLIS, J. T. *Neospora* abortion in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. **Veterinary Parasitology**, v. 128, n. 3-4, p. 231-241, 2005.

HEIN, H. E.; MACHADO, G.; MIRANDA, I. C. S.; COSTA, E. F.; PELLEGRINI, D. C. P.; DRIEMEIER, D.; CORBELLINI, L. G. Neosporose bovina: avaliação da transmissão vertical e fração atribuível de aborto em uma população de bovinos no estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**.v. 32, n. 5, p. 396-400, 2012.

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B. A European Perspective on *Neosporacanthium*. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 8, p. 877-924, 2000.

HIETALA, S. K.; THURMOND, M. C. Postnatal *Neosporacanthium* transmission and transient serologic responses in two dairies. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1669-1676, 1999.

IBGE. **Instituto Brasileiro Geografia e Estatística**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2004>> Acesso em 12 jul.

2007.

- INNES, E. A., ANDRIANARIVO, A. G., BJORKMAN, C. WILLIAMS, D.J., CONRAD, P. A. Immune responses to *Neosporacanium* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, v. 18, p.497-504, 2002.
- JENKINS, M. C.; CAVER, J. A.; BJORKMAN, C.; ANDERSON, T. C.; ROMAND, S.; VINYARD, B.; UGLLA, A.; THULLIEZ, P.; DUBEY, J. P. Serological Investigation of an outbreak of *Neosporacanium*-associated abortion in a dairy herd in southeastern United States. **Veterinary Parasitology**, v. 94, n. 1-2, p. 17-26, 2000.
- KING, J. S., SLAPETA, J., JENKINS, D. J., AL-QASSAB, S. E., ELLIS, J. T., WINDSOR, P. A. Australian dingoes are definitive hosts of *Neosporacanium*. **International Journal of Parasitology**, [No prelo], 2010.
- KUL, O.; KABAKCI, N.; YILDIZ, K.; ÖCAL, N.; KALENDER, H.; ILKME, N. A. *Neosporacanium* associated with epidemic abortions in dairy cattle: the first clinical neosporosis report in Turkey. **Veterinary Parasitology**. v. 159, n. 1, p. 69-72, 2009.
- LANDMANN, J. K.; GUNN, A. A.; DONOGHUE, P. J.; TRANTER, W. P.; MCGOWAN, M. R. Epidemiology and Impact of *NeosporaCaninum* Infection in three Queensland Tropical Dairy Herds. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 734-737, 2011.
- LINDSAY, D.S.; DUBEY, J. P. Immunohistochemical diagnosis of *Neosporacanium* in tissue sections. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 11, p. 1981-1983, 1989^a.
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Neosporacanium* (Protozoa: Apicomplexa) infections in mice. **Journal of Parasitology**, v. 75, n. 5, p. 772-779, 1989^b.
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neosporacanium* (Protozoa: Apicomplexa). **Journal of Parasitology**, v. 76, n. 3, p. 410-413, 1990.

- LINDSAY, D. S.; LENZ, S. D.; COLE, R. A.; DUBEY, J. P.; BLAGBURN, B. L. Mouse model for central nervous system *Neosporacanium* infections. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 2, p. 313-315, 1995.
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that dogs are a definitive hosts for *Neosporacanium*. **Veterinary Parasitology**, v. 82, n. 4, p. 327-333, 1999^a.
- LINDSAY, D. S.; UPTON, S. J.; DUBEY, J. P. A structural study of the *Neosporacanium* oocyst. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1521-1523, 1999^b.
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Canine neosporosis. **Journal of Veterinary Parasitology**, v. 14, n. 1, p. 1-11, 2000.
- LÓPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; ALMERÍA, S. *Neosporacanium* infection does not affect the fertility of dairy cows in herds high incidence of *Neospora*-associated abortions. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 52, p. 51-53, 2005.
- LYONS, R. E.; McLEOD, R.; ROBERTS, C. W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 5, p. 198-201, 2002.
- MARQUES, F. A. C.; HEADLEY, A. S.; FIGUEREDO-PEREIRA, V.; TARODA, A.; BARROS, L. D.; CUNHA, I. A. L.; MUNHOZ, K.; BUGNI, F. M.; ZULPO, D. L.; IGARASHI, M.; VIDOTTO, O.; GUIMARÃES-JÚNIOR, J. S.; GARCIA, J. L. *Neosporacanium*: evaluation of vertical transmission in slaughtered beef cows (*Bos indicus*). **Parasitology Research**, v. 108, p. 1015-1019, 2011.
- McALLISTER, M. M.; HUFFMAN, E. M.; HIETALA, S. K.; CONRAD, P. A. ANDERSON, M. L.; SALMAN, M. O. 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.
- McALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.;

McGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neosporacanium*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, 1998.

McALLISTER, M. M.; BJORKMAN, C.; ANDERSON-SPRECHER, R.; ROGER, D. Evidence of a point source outbreak to *Neosporacanium* and protective immunity in a herd of beef cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 217, n. 6, p. 881-887, 2000.

McALLISTER, D.; LATHAM, S. *Neospora* 2001. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 1, p. 4-5, 2002.

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. *Neosporacanium* 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, n. 14, p. 1631-1639, 2007.

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, México. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 3-4, p. 187-191, 2006.

MELO, D.P.G.; SILVA, A.C.; ORTEGA-MORA, L.M.; BASTOS, S.A.; BOAVENTURA, C.M. Prevalência de anticorpos anti-*Neosporacanium* em bovinos das microrregiões de Goiânia e Anápolis, Goiás, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 3, p. 105-109, 2006.

MOORE, D.P.; REGIDOR-CERRILO, J.; MORRELL, E.; POSO, M.A.; CANO, D.B.; LEUNDA, M.R.; LINSCHINKY, L.; ODEÓN, A.C.; ODRIOZOLA, 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, n. 3-4, p. 163-167, 2002.

- 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* spp. and *Neosporacanthium* in dairy cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 51-54, 2009.
- MUNHOZ, A. D. **Distribuição da infecção por *Neosporacanthium* em rebanhos bovinos dos municípios de Rio Claro e Resende, estado do Rio de Janeiro.** 2004. 98p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- MUNHOZ, A. D. ; FLAUSINO, W.; SILVA, R. T.; ALMEIDA, C. R. R.; LOPES, C. W. G. . Distribuição de anticorpos contra *Neosporacanthium* em vacas leiteiras dos municípios de Resende e Rio Claro, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 3, p. 101-104, 2006.
- OGAWA, I.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O.; GONDIM, L. F. P.; , NAVARRO, I. T. Occurrence of antibodies to *Neosporacanthium* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, p. 312-316, 2008.
- PABÓN, M.; LÓPEZ-GATIUS, F.; GARCÍA-ISPIERTO, I.; BECH-SÀBAT, G.; NOGAREDA, C.; ALMERÍA, S. Chronic *Neosporacanthium* infection and repeat abortion in Dairy cows: a 3-year study. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 1-2, p. 40-46, 2007.
- PACKHAM, A. E.; SVERLOW, K. W.; CONRAD, P. A.; LOOMIS, E. F.; ROWE, J. D.; ANDERSON, M. L.; MARSH, A. E.; CRAY, C.; BARR, B.C. A modified agglutination test for *Neosporacanthium*: Development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent antibody test, a comparison to the indirect fluorescent antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, n. 4, p. 467-473, 1998.
- PARÉ, J., HIETALA, S. K., THURMOND, M. C. An enzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, n. 3, p. 352-359, 1995.

PARÉ, j., THURMOND, M. C., HIETALA, S. K. *Neosporacanium* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. **The Journal of Parasitology**, v. 83, p. 82-87, 1997.

PASQUALI, P.; MANDARA, M. T.; ADAMO, F.; RICCI, G.; POLIDORI, G. A.; DUBEY, J. P. Neosporosis in a dog in Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 77, n. 4, p. 297-299, 1998.

QUINTANILLA-GONZALO, A., PEREIRA-BUENO, J., SEIJAS-CARBALLEDO, A., COSTA, E., ORTEGA-MORA, L. A. Observational studies in *Neosporacanium* infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 901-906, 2000.

RAGOZO, A. M. A.; PAULA, V. S. O.; SOUZA, S. L. P.; BERGSMASCHI, D. P.; GENNARI, S. M. Ocorrência de anticorpos anti-*Neosporacanium* em soros bovinos procedentes de seis estados brasileiros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 1 p. 33-37, 2003.

REITEROVÁ, K.; SPILOVSKÁ, S.; ANTOLOVÁ, D.; DUBINSKÝ, P. *Neosporacanium* potential cause of antibodies in dairy cows: the current serological follow-up in Slovakia. **Veterinary Parasitology**, v. 159, n. 1, p. 1-6, 2009.

ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; DUBEY, J. P. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neosporacanium* infection. **Parasitology Research**, v. 84, n. 1, p. 50-53, 1998.

ROMERO, J. J. E FRANKENA, K. The effect of the dam-calf relationship on serostatus to *Neosporacanium* on 20 Costa Rican dairy farms. **Veterinary Parasitology** v. 114, p. 159-171, 2003.

SANCHEZ, G. F., MORALES, S. E., MARTINEZ, M. J., TRIGO, J. F. Determination and

correlation of anti-*Neosporacanium* antibodies in dogs and cattle from Mexico. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 2, p. 142-145, 2003.

SANTOS, S. L.; COSTA, K. S.; GONDIM, L. Q.; SILVA, M. S. A.; UZÊDA, R. S.; ABE-SANDES, K.; GONDIM, L. F. P. Investigation of *Neosporacanium*, *Hammondiasp.*, and *Toxoplasma gondii* in tissues from slaughtered beef cattle in Bahia, Brazil. **Parasitology Research**.v. 106, p. 457-461, 2010.

SCHARES, G., PETERS, M., WURM, R., BÄRWALD, A., CONRATHS, F. J. The efficiency of vertical transmission of *Neosporacanium* in dairy cattle analyzed by serological techniques. **Veterinary Parasitology**, v. 80, n. 2, p. 87-98, 1998.

SCHARES, G.; BARWALD, A.; STAUBACH, C.; SONDGEN, P.; RAUSER, M.; PETERS, M.; WURM, R.; SELHORST, T.; CONRATHS, F. J. p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neosporacanium* –associated bovine abortion. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 4, p. 293-305, 2002.

SCHOCK, A., BUXTON, D., SPENCE, J.A., LOW, J.C., BAIRD, A. Histopathological survey of aborted bovine fetuses in Scotland with special reference to *Neosporacanium*. **Veterinary Record**, v. 147, n. 24, p. 687-688, 2000.

TEIXEIRA, W. C.; UZÊDA, R. S.; GONDIM, L. F. P.; SILVA, M. I. S.; PEREIRA, H. M.; ALVES, L. C.; FAUSTINO M. A. G. Prevalência de anticorpos anti-*Neosporacanium* (apicomplexa: Sarcocystidae) em bovinos leiteiros de propriedades rurais em três microrregiões no estado do Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 30, n.9, p. 729-734, 2010.

THILSTED, J. P., DUBEY, J. P. Neosporosis like abortions in a herd of dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 1, n. 3, p. 205-209, 1989.

THURMOND, M. C.; HIETALLA, S. K.; BLANCHARD, P. C. Herd-based diagnosis of *Neosporacanium*-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, n. 1, p. 44-49, 1997^a.

- THURMOND, M. C.; HIETALLA, S. K. Effect of congenitally-acquired *Neosporacanium* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 12, p. 1381-1385, 1997^b.
- 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, n. 8, p. 1195-1200, 1999.
- XIA, H.; ZHOU, D.; JIA, K.; ZENG, X.; ZHANG, D.; SHE, L.; LIN, R.; YUAN, Z.; LI, S.; ZHU, X. Seroprevalence of *NeosporaCaninum* Infection in Dairy Cattle of Southern China. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 172-173, 2011.
- WOUDA, W.; DUBEY, J. P; JENKINS, M. C. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. **Journal of Parasitology**, v. 83, n. 3, p. 545-547, 1997.
- WOUDA, W.; BRINKHOF, J.; van MAANEN, C.; de GEE, A. L. W.; MOEN, A. R. Serodiagnosis of neosporosis in individual cows and dairy herds: a comparative study of three eenzyme-linked immunosorbent assays. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunnology**, v. 5, n. 5, p. 711-716, 1998.
- WOUDA, W.; DIJKSTRA, Th.; KRAMER, A. M. H.; MAANEN, C.; van BRINKHOF, J. M. A. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neosporacanium* infections in dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1677-1682, 1999.
- WU, J. T.; DREGER, S.; CHOW, E. Y.; BOWLBY, E. E. Validation of 2 commercial *Neosporacanium* antibody enzyme linked immunosorbent assays. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 4, p. 264-271, 2002.
- YAEGER, M. J.; SHAWD-WESSELS, S; LESLIE-STEEN, P. *Neospora* abortion storm in a midwestern dairy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, n. 4, p. 506-508, 1994.