

ARISTIDES GARCIA FILHO

OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- *Neospora*
caninum EM REBANHOS BOVINOS LEITEIROS E
DE CORTE DA REGIÃO DE PRESIDENTE
PRUDENTE/SP

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus de Botucatu, como requisito para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Izidoro Francisco Sartor

Botucatu - SP

2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Garcia Filho, Aristides.

Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em rebanhos bovinos leiteiros e de corte da região de Presidente Prudente/SP / Aristides Garcia Filho. – Botucatu : [s.n.], 2008

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.

Orientador: Izidoro Francisco Sartor

Assunto CAPES: 50405004

1. Bovino - Criação - Presidente Prudente (SP)
2. Aborto em animais
3. *Neospora caninum*

CDD 636.2082

Palavras-chave: Abortamento; Bovino; Holandesa; Nelore; Neosporose

**Aos meus pais, Aristides e Judith,
à minha família,
à minha esposa Claudia
e aos meus filhos João Pedro e Mateus,
dedico.**

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, ao onipotente, Deus, por me manter com saúde para as atividades do dia a dia.

Ao meu orientador Prof. Izidoro Francisco Sartor, por um ato de arrojo e confiança, buscou-me na atividade de campo e mostrou o caminho para o aperfeiçoamento técnico, assim como, permitiu uma oportunidade única de contatos novos e principalmente de uma amizade concreta.

À minha esposa e mulher Claudia, que com paciência soube compreender os momentos de ausência transferidos para este objetivo e pela grande ajuda na elaboração e digitação desta.

Ao amigo e colega Marcelo Piagentini que muito contribuiu nas discussões técnicas, colheita de materiais e alertando os caminhos a serem percorridos.

Ao Prof. Lúcio Benedicto Kroll, pelo desempenho e boa vontade no auxílio das análises estatísticas.

À equipe do Instituto Biológico, que sem dúvida, tem muito na conclusão deste trabalho, principalmente Dra. Edviges Maristela Pituco que, apesar da sua notoriedade, sempre me colocou em situação de conforto e coleguismo, também a Dra. Claudia Del Fava, com as mesmas qualidades precedentes, me cederam espaço e material para realização dos exames em momentos importantes e cruciais. A participação delas foi fundamental para concretização da tese.

Aos estagiários do Instituto Biológico e à veterinária Fernanda pela recepção e paciência destinados à minha pessoa.

Ao colega Luís Carlos Viana, pela sua contribuição e boa vontade no processamento das amostras, assim como o casal de professores Dr. Vamilton Santarém Alvares e Cecília Laposy, pela simpatia, deixando-me à vontade para o uso do Laboratório da UNOESTE.

Aos professores e à Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp-Botucatu que muito aprendi em suas aulas e me ajudaram em assuntos profissionais, pela amizade, suporte científico e vínculo criado.

Às funcionárias da pós-graduação, Denise e Maria, pela compreensão, cobranças devidas e avisos oportunos, também à bibliotecária Rosemary Cristina da Silva, pelas orientações.

Ao amigo Mauro Sérgio Rodrigues pela ajuda na colheita do material, disposição e companheirismo.

Aos amigos Alexandre Reis e Felipe Moura pela ajuda no texto em inglês.

Agradeço a todos da UNOESTE – Presidente Prudente e FMVZ UNESP – Botucatu pelo vínculo e apoio.

A todos proprietários que cederam os animais ao estudo e a todas as pessoas que de uma forma direta ou indireta colaboram para o trabalho desta tese e que, por falha minha, não os lembrei.

SUMÁRIO

Páginas

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Histórico.....	5
2.2. Ciclo Biológico.....	8
2.3. Neosporose no Brasil.....	10
2.4. Neosporose em outros países.....	12
2.5. Neosporose em cães.....	14
2.6. Epidemiologia.....	15
2.7. Diagnóstico.....	16
2.8. Controle.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. Local de estudo.....	20
3.2. Amostras.....	20
3.3. A técnica de ELISA.....	21
3.4. Análise Estatística.....	22
4. RESULTADOS.....	23
5. DISCUSSÃO.....	25
6. CONCLUSÕES.....	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

GARCIA FILHO, A. “**Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em rebanhos bovinos leiteiros e de corte da região de Presidente Prudente/SP**”. Botucatu, 2004. 48p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, 2004. Universidade Estadual Paulista – UNESP.

RESUMO

Neospora caninum é um protozoário reconhecido como agente causador de abortamentos em bovinos, descrito em várias áreas do mundo e presente em várias regiões do Brasil, o que justificou a abordagem da ocorrência de *N. caninum* na região de Presidente Prudente, um importante polo pecuário. O objetivo do estudo é fornecer subsídios, em rebanhos leiteiros e de corte, para o estudo epidemiológico da neosporose nessa região. Pelo método de ELISA foram testados 505 soros de bovinos de corte da raça Nelore, pertencentes a seis propriedades e 408 de bovinos leiteiros procedentes de 11 propriedades. A ocorrência de anticorpos anti-*N.caninum* entre propriedades leiteiras variou de 19,23% a 74,28%, com uma média aritmética de 35,53%, enquanto para o gado de corte essa variação foi de 11,40% a 34,29% com uma média aritmética de 20,0%. A ocorrência de anticorpos anti-*N.caninum* foi significativamente maior em gado de leite quando comparada com o rebanho de corte.

Palavras chave: *N.caninum*; Nelore; Holandesa; Abortamento; Bovino.

GARCIA FILHO, A. “**Occurrence of antibodies anti- *Neospora caninum* in bovines of Presidente Prudente/SP region.**” Botucatu, 2004. 48p. A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements to obtain the Master’s Degree in Veterinary Clinical Science. School Veterinary Medicine and Animal Husbandry, São Paulo State University.

ABSTRACT

Neospora caninum have been recognized as a protozoa that causes bovine abortion, being cosmopolitan and present in many brazilian regions, which has justify these analysis of *N. caninum* occurrence in Presidente Prudente region, an important bovine breeding center. The objective of this study was to get subsidy, in dairy and beef cattle, for *N.caninum* epidemiology and comporment at this place. ELISA test method was used in 505 beef cattle serums of Nelore from six different ranches and 408 dairy cattle serums from 11 other ones. The antibodies anti-*N.caninum* occurrence, among dairy ranches, ranged between 19,23% up to 74,28% with a arithmetic average of 35,53%, meanwhile for the beef cattle, through this variance, ranged from 11,40% up to 34,29%, with a arithmetic average of 20,0%. The antibodies anti-*N. caninum* occurrence were significant larger in the dairy cattle than the beef cattle, when compared.

Keywords: *N. caninum*; Nelore; Holstein; Abortion; Bovine.

1. INTRODUÇÃO

Existem várias causas de perdas embrionárias e abortamentos em bovinos, por isso a identificação do agente etiológico é importante para sanear e definir medidas de controle de uma doença.

Até 1988, *Neospora caninum* era confundido com *Toxoplasma gondii*, posteriormente, ambos parasitos foram diferenciados em sua microestrutura (Dubey *et al.*, 1988), onde percebeu-se a importância do *N.caninum* no meio ambiente e na interação entre cães e bovinos.

O cão é considerado hospedeiro definitivo por eliminar oocistos nas fezes devido a reprodução sexuada do parasito que ocorre em sua mucosa e submucosa intestinal (McAllister *et al.*,1998). Pastagens e alimentos contaminados são considerados como fonte de infecção do *N. caninum* por transmissão horizontal. Outras vias de transmissão, na horizontal, seriam o colostro e o leite (Uglla *et al.*,1998), a placenta e o líquido amniótico (McAllister *et al.*,1998). Por outro lado, infectando-se com os próprios oocistos esporulados, os cães se tornam também hospedeiros intermediários.

A transmissão horizontal foi apontada como responsável pela epidemia de abortamentos em bovinos, nos quais, a maioria das vacas que abortaram, haviam sido infectadas no período pós-natal, evidenciando a contaminação do meio ambiente (Thurmond *et al.*,1997b). Também rebanhos com alta prevalência e a presença de cães entre eles, evidenciou-

se a infecção horizontal (Dijkstra *et al.*,2002). Estes carnívoros são considerados um fator de alto risco, pois infectam-se com restos de placentas e fluídos fetais contaminados.

Entre as vias de transmissão, a vertical assume um papel primordial na manutenção da doença, pois a maioria das infecções congênitas resulta em bezerros clinicamente normais, porém persistentemente infectados. Posteriormente, quando estes animais congenitamente infectados alcançarem a idade de reprodução, irão perpetuar a doença na propriedade (Björkman *et al.*, 1996).

Matrizes infectadas e suas descendências congenitamente infectadas, podem transmitir o parasita durante gestações subseqüentes, caracterizando a transmissão vertical como a mais importante via de infecção em alguns rebanhos (Bjorkman *et al.* ,1996; Paré *et al.*,1996; Anderson *et al.*,1995).

A determinação ou não do abortamento está condicionada a fase de gestação em que o feto é exposto. Assim, se a exposição ao parasito for feita no primeiro trimestre gestacional, haverá grandes chances de ocorrer o abortamento, entretanto, se tal exposição ocorrer no terço final de gestação, provavelmente ocorrerá o nascimento de um bezerro congenitamente infectado (Willians *et al.*, 2000).

O prejuízo econômico causado pelo *N. caninum* tem sido evidente em muitos países. Nos Estados Unidos, as perdas com abortamentos alcançaram as cifras de US\$ 35 milhões (Barr *et al.*, 1997),

havendo um custo por abortamento em torno de US\$ 500, 00(Dubey, 1999). Na Califórnia, foi considerado a maior causa de abortamentos em bovinos leiteiros (Anderson *et al.*,1991), no mesmo estado, foi encontrada uma ocorrência de 42,5% em animais leiteiros (133/266), com histórico de abortamento (Anderson *et al.*, 1995).

Na indústria leiteira há decréscimos dos índices produtivos, tais como aumento do intervalo de parto, queda da média de lactação e taxa de nascimentos, interferindo negativamente na produtividade do rebanho e redução na produção leiteira de 01 Kg de leite / dia nos animais infectados (Thurmond & Hietala, 1997b). Na pecuária de corte, o prejuízo foi estimado entre US\$15 e US\$ 24 milhões em rebanhos do Texas (Kasari *et al.*, 1999).

A infecção causada pelo *N. caninum* em bovinos, estimula uma resposta com anticorpos séricos. Esta resposta, por sua vez, indica que em alguma fase da vida, este bovino teve contato com o parasita. Para a detecção desses anticorpos, vários testes são empregados, tais como: reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o teste imunoenzimático (ELISA) e o teste de aglutinação direta (Björkman & Uglla,1999). Segundo Guimarães (2003), o teste de aglutinação direta se mostrou menos sensível quando comparado com a RIFI, pois possui sensibilidade de 38,2% e especificidade de 95,1%, com concordância global de 82,8% em relação a RIFI, não servindo assim, seu emprego, como método de eleição para triagens em rebanhos. Já com o método de ELISA, considerado mais sensível (Schaes *et al.*,1998), foram encontrados índices de 16,3% de

soropositivos com a RIFI e 30,13% de soropositivos pelo ELISA, este trabalho de levantamento epidemiológico que visava determinar ocorrências do *N.caninum* em rebanhos e comparar os dois métodos (Sartor *et al.*,1999).

No Brasil, vários levantamentos sorológicos, pela técnica de ELISA, vem apontando a importância do *N. caninum*. Ocorrências que variam de 7,7% (Andreotti *et al.*,1999) a 67,8% (Belo,1999), são extremos de dados de rebanhos nacionais. Um número grande de trabalhos de ocorrências do *N.caninum*, com o método de ELISA, no Brasil, foram feitos, tais como, Brautigam *et al.* (1996) que encontrou 17,5% e Pituco *et al.*(2001)* com 3.085 amostras feitas dos estados de São Paulo, Paraná, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, resultando em 31,5%, sendo 17,9% em gado de corte e 35,9% em gado leiteiro. Outros trabalhos nacionais sob a técnica de ELISA foram: Melo e Leite (1999) com 7,7%; Locatelli-Dittrich *et al.* (2001b) com 34,8%; Melo (2001) com 20% ; Melo *et al.*(2001) com 18,6% e Munhoz *et al.*(2002a) , Munhoz *et al.*(2002b) com 23,8% e 33,5% respectivamente.

Pela extensão do território nacional, com sua variabilidade de clima, costumes regionais que podem influenciar na difusão da doenças, isto é, o manejo dos criatórios, o mapeamento de um país, para uma determinada doença, antecede qualquer outra medida que visa a prevenção da mesma. Assim, o objetivo da pesquisa é verificar a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum*, em rebanhos de corte e de leite, pertencentes à região de Presidente Prudente, São Paulo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico

Na Noruega, Björkas *et al.*,(1984), relacionaram o quadro de paralisia em filhotes da raça Boxer com miosite e encefalite, com a presença de cistos no tecido nervoso semelhantes ao *Toxoplasma gondii*. No entanto, alguns cães não apresentaram anticorpos anti-*Toxoplasma*.

Este fato, veio despertar a curiosidade de Dubey *et al.*,(1988), que fizeram um estudo retrospectivo utilizando tecidos fixados de cães, cuja suspeita diagnosticada era de toxoplasmose. De 23 cães estudados, 10 apresentaram diferenciação do *Toxoplasma gondii* quando este material foi submetido aos exames histopatológicos, imunohistoquímicos e à observação ultraestrutural por microscopia eletrônica. Concluiu-se então, que havia um novo parasita a qual foi denominado de *Neospora caninum*.

Quanto à taxonomia, foi classificado no reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Sporozoasida, sub-classe Coccidiasina, ordem Eucoccidiorida, família Sarcocystidae (Cox, 1991; Ellis *et al.*, 1994).

Ainda em 1988, foram identificados os três estágios de desenvolvimento do parasita; os taquizoítos, os cistos contendo em seu interior bradizoítos e também o terceiro estágio, esporozoítos contidos nos

oocistos (Dubey e Lappin, 1988). Logo depois ocorreu o primeiro isolamento do parasita, oriundo de tecido nervoso de cães com alterações neurológicas, sendo os taquizoítos mantidos em cultivo celular. A partir do isolamento, houve o desenvolvimento da técnica de RIFI para detecção de anticorpos séricos (Dubey *et al.*,1988).

No ano seguinte, através dos taquizoítos obtidos por cultivo celular, foi possível produzir anticorpos específicos contra *N. caninum* e elaborar uma técnica de imunohistoquímica para detecção do agente em tecidos infectados (Lindsay & Dubey, 1989). Ainda neste ano, foi realizada a primeira identificação do *N. caninum* por imunohistoquímica como agente de abortamento em bovinos (Thilsted & Dubey, 1989).

Nos Estados Unidos, Anderson *et al.*,(1991) examinando 213 fetos abortados constataram, pelo método de imunohistoquímica, cistos teciduais em 89 deles.

A transmissão transplacentária entre bovinos foi demonstrada por Dubey *et al.*,(1992) que infectaram três vacas , pelas vias intramuscular e subcutânea, utilizando taquizoítos e cistos do *N. caninum*. Uma vaca foi submetida à eutanásia, onde foram encontradas lesões teciduais fetais associadas ao parasito tais como: necrose multifocal e infecção não supurativa. Confirmou-se a neosporose por exame imunohistoquímico. As outras duas vacas, apesar de clinicamente normais, abortaram.

No ano posterior, Dubey e Lindsay (1993) observaram taquizoítos do parasita em diferentes tecidos ao passo que, cistos teciduais foram identificados, por imunohistoquímica, em tecido do Sistema Nervoso Central. Neste mesmo ano, foi realizado pela primeira vez, sorologia em bovinos e, pelo método da RIFI, anticorpos foram encontrados em 55 vacas abortadas. Os títulos variaram entre 320 e 5.120 no momento do abortamento, caindo para os patamares de 160 e 640 em 150 dias. Isto significa que o animal eliminou o parasita ou que este se encistou nos tecidos (Conrad *et al.*, 1993).

Dubey *et al.*(1996), fizeram uma avaliação entre a RIFI e o ELISA. Concluíram que ambas as técnicas podem ser utilizadas para a pesquisa de anticorpos anti-*Neospora*, embora ocorressem algumas reações cruzadas com *Sarcocystis spp* no método de ELISA.

Björkman *et al.*(1996), na Suécia, observaram abortamentos esporádicos numa fazenda implantada desde 1980, em 58 vacas, 17 (29%) apresentaram soropositividade para *N. caninum* pelo método ELISA.

E finalmente, após inúmeras tentativas, descobriu-se ser o cão, o hospedeiro definitivo por eliminar em suas fezes, os oocistos, por reprodução sexuada na mucosa e submucosa intestinal (McAllister *et al.*, 1998).

2.2. Ciclo Biológico

A partir da descoberta do hospedeiro definitivo, estabeleceu-se o ciclo biológico do *N.caninum*, o qual pode infectar várias espécies além de caninos e bovinos, eqüinos, ovinos, caprinos e cervídeos (Dubey & Lindsay, 1996), tendo também alguns animais como reservatórios naturais, como raposas, cachorro do campo e lobo-Guará.

O cão elimina em suas fezes, por reprodução sexuada, os oocistos (McAllister *et al.*, 1998) e pode se infectar pelos três estágios de desenvolvimento do *N. caninum*, os esporozoítos, os taquizoítos e os bradizoítos contidos nos cistos (Dubey & Lappin, 1988).

Esses oocistos das fezes dos cães, só esporulam após 24 a 72 horas no ambiente, tornando-se então, infectantes, esporulados, contendo dois esporocistos com quatro esporozoítos cada. Os oocistos medem de 10 a 11 µm. No meio ambiente, nas pastagens, estes oocistos são ingeridos por um hospedeiro intermediário e os esporozoítos são liberados no trato intestinal deste, onde penetram nas células, transformando-se em taquizoítos que se multiplicam por endodiogenia, uma forma de multiplicação assexuada extremamente rápida, causando as maiores lesões teciduais e distribuindo a infecção por todos os tecidos do corpo do hospedeiro intermediário, no caso, o bovino (Dubey *et al.*, 1988b). Assim, a fase mais patogênica prejudicando os tecidos, é a fase de multiplicação dos taquizoítos atingindo células neurais, macrófagos,

fibroblastos, células do endotélio vascular, miócitos, células do epitélio tubular renal e hepatócitos, através da corrente sanguínea e linfática (Dubey *et al.*, 1988).

Os taquizoítos ao penetrarem nas células se transformam em bradizoítos, sob influência do sistema imune, sendo encontrados no interior dos cistos (Wouda,2000), os quais possuem tropismo para sistema nervoso central e muscular cardíaco do hospedeiro intermediário. De morfologia oval, medem 107 µm de diâmetro, em média, possuem uma cápsula, são encontrados geralmente em tecidos nervosos, são resistentes à solução de pepsina ácida do estômago, sobrevivendo a 4°C por 14 dias, tornando-se inativas a -20°C por 24 horas (Lindsay *et al.*, 1992). Possuem característica de latência, confundindo o sistema imune, dificultando a defesa do organismo e provocando a reativação da neosporose quando o animal está sob estresse e/ou imunodepressão, explicando a razão pela qual as vacas apresentam abortamentos repetidos.

O cão, hospedeiro definitivo, completa o ciclo ao ingerir cistos ou taquizoítos de fetos abortados, restos placentários e líquidos fetais, ou mesmo outros tecidos contaminados (McAllister *et al.*,1998). Bezerra nascida infectada, ao atingir a idade reprodutiva poderá abortar, gerar um produto persistentemente infectado com sintomatologia clínica normal ou ainda com quadro de sintomatologia nervosa, geralmente encefalite, que culminará em morte ao redor de 60 dias após o nascimento.

Pouco se sabe sobre os estágios dos epitélios intestinais e suas estruturas, porém o período pré-patente situa-se por volta de cinco a oito dias (Lindsay;Dubey,2000).

2.3. Neosporose no Brasil

No Brasil, os primeiros relatos foram feitos por Brautigam *et al.*,(1996) e Gondim e Sartor (1997). Estes autores, no município de Botucatu/ SP, detectaram títulos que variavam de 800 a 3.200 em rebanho leiteiro com histórico de abortamento. Gondim *et al.*,(1999b), por imunohistoquímica, identificaram cistos de *N.caninum* no tecido nervoso de feto abortado nesta mesma propriedade. Na região de Avaré/ SP, Sartor *et al.*,(1999), fizeram um levantamento sorológico no qual puderam avaliar as técnicas de RIFI e ELISA nos mesmos rebanhos, tendo como soroprevalência, respectivamente 16,3% e 30,13%. Na mesma região, Hasegawa *et al.*,(1999) detectaram em 777 amostras sangüíneas de gado de corte, pela RIFI, um valor de 15,5% nos títulos. Já Piagentini (2002), em estudo retrospectivo comparando os mesmos rebanhos leiteiros dessa região, constatou a ocorrência de anticorpos anti-*N.caninum* de 21,6% em 1997 passou para 38,9% em 2000.

Concomitantemente às sorologias, os pesquisadores conseguiram os primeiros isolamentos através de cultura celular *in vitro*.

Gondim *et al.*,(2000) isolaram o *N.caninum* de um cão com neuropatia, Pituco *et al.*, (2000) isolaram o parasita em bezerros e após um ano em cérebro de fetos abortados. Esses isolamentos por cultura celular usaram células da linhagem VERO, acrescida de 2% de soro equino mais 1% de antibiótico e inoculação em camundongos.

Outros trabalhos brasileiros mostram a importância que o *N.caninum* vem ocupando em regiões brasileiras. Os quadros 1 e 2 resumem a maioria desses trabalhos realizados.

AUTOR	ESTADO	N. AMOSTRAS	OCORRÊNCIA (%)
Brautigam <i>et al.</i> ,(1996)	MS	40	17,50
Andreotti <i>et al.</i> ,(1999)	MS	91	7,70
Sartor <i>et al.</i> ,(1999)	SP	521	30,13
Melo e Leite.,(1999)	MG	39	7,70
Pituco* <i>et al.</i> ,(2001)	SP	3085	35,90
Melo <i>et al.</i> , (2001)	MG	584	18,66
Locatelli-ditrich <i>et al.</i> ,(2001a)	PR	147	42,00
Locatelli-Ditrich <i>et al.</i> (2001b)	PR	172	34,80
Corbellini <i>et al.</i> (2002)	RS	29	65,50
Munhoz <i>et al.</i> ,(2002a)	RJ	140	33,57
Munhoz <i>et al.</i> ,(2002b)	RJ	126	23,81
Andreotti <i>et al.</i> ,(2002)	MS	151	16,56
Piagentini (2002)	SP	615	32,00

Quadro 01 – Ocorrência de anticorpos anti-*N.caninum* detectados pela técnica de ELISA em diversos estados do Brasil.

* Pituco, E.M. (Instituto Biológico – São Paulo) Comunicação Pessoal, 2001.

AUTOR	ESTADO	NºAMOSTRAS	OCORRENCIA %	P.C*
Gondim e Sartor (1997)	SP	10	60,0	200
Gondim (1999)	BA	391	15,60	200
Belo <i>et al.</i> ,(1999)	SP	28	67,85	100
Hasegawa <i>et al.</i> ,(1999)	SP	150	24,67	200
Sartor <i>et al.</i> ,(1999)	SP	521	16,30	200
Stobbe e Cortes(1999)	SP	84	53,60	200
Rezende <i>et al.</i> ,(1999)	SP	171	22,20	200
Stobbe (1999)	SP	188	36,70	200
Ogawa <i>et al.</i> ,(1999)	PR	385	11,69	200
Hasegawa (2000)	SP	777	15,50	200
Santos (2000)	PR	35	14,50	200
Corbellini <i>et al.</i> ,(2001)	RS	223	11,20	200
Costa <i>et al.</i> , (2001)	MG	88	6,81	200
Costa <i>et al.</i> , (2001)	SP	411	23,11	200
Jesus <i>et al.</i> , (2002)	BA	391	10,29	200
Silva <i>et al.</i> ,(2002)	PE	469	34,75	200
Ragozo <i>et al.</i> , (2002)	vários	802	28,00	25
Guimarães Jr. (2003)	PR	623	21,55	25

*PC = ponto de corte

Quadro 2 – Ocorrência de anticorpos anti-*N.caninum* detectados pela técnica de RIFI em diversos estados do Brasil.

2.4 Neosporose em outros países

A Neosporose em bovinos apresenta distribuição mundial, seguem alguns trabalhos relatando soroprevalências , no Japão (*Ogino et al.*,1992), no México (*Abbit et al.*, 1993; *Morales et al.*, 2001; *Garcia-Vasquez*

et al., 2002), em Israel (Harmelin *et al.*, 1995), na Suécia (Holmdahl *et al.*, 1995), no Reino Unido (Otter *et al.*, 1995), na África (Jardine; Wells, 1995), na Austrália (Dubey; Lindsay, 1996), na Irlanda (McNamme *et al.*, 1994), na Holanda (Dijkstra *et al.*, 2001b), na Espanha (Pumarola *et al.*, 1996; Mainar-Jaime *et al.*, 1999; Quintanilla-Gonzalo *et al.*, 1999), na França (Ould Amrouche *et al.*, 1999), nos USA (Dyer *et al.*,2000; Sanderson *et al.*,2000) e na Argentina (Moore *et al.*, 2002).

Embora as primeiras pesquisas de impacto econômico causado pelo *N.caninum* terem sido direcionadas aos rebanhos leiteiros, existem hoje trabalhos importantes na pecuária de corte, sobretudo no descarte de fêmeas soropositivas, natimortos, abortamentos e decréscimo da taxa de natalidade, relatando assim uma queda na produção de carne bovina (Waldner *et al.*, 1998).

Os abortamentos podem acontecer ao longo do ano e foram encontradas as mesmas soroprevalências entre rebanhos confinados na Califórnia e em rebanhos criados a pasto na Holanda. A idade média do feto no abortamento gira em torno de 6 meses (Dubey; Lindsay, 1996). Atribui-se uma taxa de 25% dos abortamentos ocorridos no rebanho leiteiro da Califórnia, (Anderson *et al.*, 1991) e da Holanda (Wouda *et al.*, 1999) a infecção pelo *N. caninum*.

2.5 Neosporose em cães

A neosporose canina, assim como a bovina, também é cosmopolita. A importância dos canídeos está na transmissão horizontal para bovídeos. No Brasil há relatos do *N. caninum* em cães que variam de 4,3 a 59% (Gennari *et al.*, 2002). Em trabalho realizado com cães de propriedades de gado de corte, zona rural da região de Avaré, verificou-se um índice de 58,97% dos cães soropositivos para *N. caninum*, pela técnica de RIFI (Hasegawa, 2000). Na Nova Zelândia, foram examinados 200 cães sendo 22% de soropositivos (Reichel, 1998). Outro trabalho, realizado na Holanda, indicou uma maior prevalência em cães rurais do que nos urbanos, respectivamente 23,6% e 5,5% (Wouda *et al.*, 1999).

Os casos de cães com neosporose, na maioria são de filhotes congenitamente infectados que quando nascidos, desenvolvem uma paresia progressiva, principalmente nos membros posteriores, causando uma hiperextensão destes, provavelmente devido a miosite e paralisia do neurônio motor (Dubey & Lindsay, 1996).

Os cães adultos podem apresentar alterações neurológicas, polimiosites, encefalite, miocardite e dermatite (Perl *et al.*, 1998).

2.6 Epidemiologia

Em várias espécies de animais foram encontrados os anticorpos anti-*N. caninum*, além de bovinos e cães, também em ovinos, caprinos e búfalos, coiotes, camelos, cervídeos, raposas e gatos (Dubey, 1999).

Estudos epidemiológicos tem observado uma relação entre hospedeiro definitivo e intermediário, ou seja, a presença de cães em propriedades rurais, tem sugerido um fator de risco para o rebanho devido à infecção do *N. caninum* e abortamentos (Paré *et al.*, 1998; Bartels *et al.*, 1999).

A transmissão vertical foi relatada como importante por alguns autores (Bjorkman *et al.*, 1996; Paré *et al.*, 1996), onde a maioria das infecções congênicas resultam em nascimentos de bezerros aparentemente normais mas persistentemente infectados. Do outro lado, a transmissão horizontal é tida como importante em rebanhos com prevalência alta (Hietala & Thurmond, 1999; Dijkstra *et al.*, 2001b; Dijkstra *et al.*, 2002;). Há uma forte correlação com cães soropositivos para *N. caninum* e a alta prevalência de bovinos com anticorpo anti-*N.caninum* (Wouda *et al.*, 1999).

São considerados como fonte de infecção na transmissão horizontal o colostro e o leite de vacas infectadas (Uggla *et al.*, 1998), placenta, restos placentários e líquidos fetais infectados (Mc Allister *et al.*,

1998). Segundo Piagentini (2002) comparando-se mães e filhas de uma mesma propriedade, observou-se predominância de animais não reagentes no primeiro teste para reagentes no segundo teste, 3 anos mais tarde, e a presença abundante de cães nesta propriedade, atribuiu importante papel destes, na transmissão dessa enfermidade. As taxas foram de 21,6% em 1997 para 38,9% em 2000, portanto um aumento significativo da soroprevalência e a importância também da transmissão horizontal.

Em outro estudo envolvendo fatores de risco em propriedades leiteiras da região Norte do Paraná, observou-se a presença de cães em 91,3% destas. Embora tenha sido verificada a presença de cães, na maioria destas propriedades, constatou-se uma correlação positiva fraca em relação à ocorrência de anticorpos anti-*N.caninum* em bovinos (Guimarães Júnior, 2003).

2.7 Diagnóstico

2.7.1 – Anamnese

Geralmente em propriedades com relato de abortamentos, há bom controle preventivo para outras doenças abortivas, tais como, brucelose, leptospirose, IBR, BVD, Campilobacteriose, Trichomonose e outras. Animais com mais de um abortamento podem ser encontrados.

2.7.2 – Sorologia

Os sorodiagnósticos tem sido enfocados para mostrar os valores das ocorrências, através da detecção dos anticorpos anti-*N.caninum*. Esses diagnósticos medem a taxa de contato e passagem do *N.caninum* pelo corpo do hospedeiro. Assim, existem dois métodos mais usados para o sorodiagnóstico, são eles a RIFI e o ELISA. Segundo Guimarães Júnior (2003), o teste de aglutinação para *Neospora* (NAT), não se mostrou adequado para triagens.

2.7.3 – Identificação

Utiliza-se os métodos para confirmação do agente pela imunohistoquímica (IHQ) e a reação em cadeia da Polimerase (PCR). Esta técnica é baseada na amplificação do DNA ou de pequena subunidade do RNAr e tem excelente acurácia (Payne;Ellis,1996). Quando a amostra é oriunda de material bovino abortado, a IHQ tem se mostrado eficiente (Sundermann *et al.*,1997), porém depende da quantidade de parasitas nos tecidos e situação do material *post-mortem* (Osawa *et al.*, 1998).

2.7.4 – Isolamento

Geralmente não é simples, pois o material *post mortem* chega ao laboratório, muitas vezes, autolisado assim como os parasitos. O cultivo celular pode ser feito em células VERO e depende do grau de autólise da amostra, da quantidade de parasitos presentes nesta e o resultado levando o processo 20 dias a 2 meses (Pituco *et al.*, 2000). O PCR resolve tais problemas, além de apresentar elevada sensibilidade e especificidade (Ellis *et al.*, 1998).

A taxa de sucesso para isolamento, segundo Conrad *et al.*,(1993) gira em torno de 2% das amostras suspeitas de abortamento por *N. caninum*.

Os primeiros isolamentos e identificação, no Brasil, encontram-se no quadro abaixo.

Autores	Ano	Estado	Método	Espécie	Dados	Obs.
Gondim <i>et al.</i>	1999	SP	IHQ	Bovina	1	Feto
Gondim <i>et al.</i>	2000	SP	IHQ	Canina	1	Cão com Encefalite
Pituco* <i>et al.</i>	2000	SP	ICC/ME	Bovina	4/4	Bezerros com encefalite
Okuda <i>et al.</i>	2001	SP	ICC/PCR	Bovina	4/120	Fetos

IHC = Imunohistoquímica; ICC = Isolamento em cultivo celular; ME = Microscopia Eletrônica

Quadro 3: Isolamento e Identificação de *N. caninum* no Brasil.

* Pituco, E.M. (Instituto Biológico – São Paulo) Comunicação Pessoal, 2000.

A inoculação em animais de laboratório (bioensaio) também é outro método de isolamento (Lindsay, Dubey e Blagburn, 1996), sendo o camundongo e gerbil os animais de eleição (Dubey; Lindsay, 2000).

2.8 Controle

Já que a terapêutica é ineficaz, principalmente na redução do abortamento, existem vacinas para profilaxia. No entanto, por se tratar de um gênero pertencente à família Apicomplexa e suas características imunogênicas, a eficiência da vacina atua em patamares que não justificam seu uso. Assim, recomenda-se o descarte de fêmeas soropositivas, a não aquisição, principalmente, de fêmeas positivas, evitando assim a permanência de bezerros infectados congenitamente, que acarretam problemas tardiamente na idade de reprodução (Dubey, 1999).

Evitar o fornecimento de leite e colostro (Ugla, 1998) e placentofagia de outras vacas soropositivas (McAllister *et al.*, 1998). Controlar e fazer o monitoramento de água e alimentos de consumo bovino, limitar o acesso de cães em pastagens, evitando assim, com essas medidas, a transmissão horizontal (Paré *et al.*, 1998; Mc Allister *et al.*, 1998; Atkinson *et al.*, 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de Estudo

As amostras de soro bovino, tanto dos rebanhos de corte quanto nos de leite, foram procedentes da região de Presidente Prudente, oeste do estado de São Paulo, que envolve 21 municípios. Essa região possui um rebanho aproximado de 2.400.000 (dois milhões e quatrocentas mil) cabeças, sendo portanto, a área de maior concentração de bovinos do estado de São Paulo e do país.

3.2. Amostras

Todos os animais pertencentes ao ensaio eram fêmeas bovinas que estavam prenhes ou haviam parido pelo menos uma vez. Foram analisadas 408 amostras de soro oriundas de rebanhos leiteiros, mantidos em regime semi-extensivo, cuja principal diferença de manejo para os bovinos de corte, é o oferecimento de suplementação, particularmente no outono e inverno, entre os meses de abril e outubro.

Para o conhecimento da ocorrência dessa enfermidade em gado de corte foram testadas 505 amostras de soro. A diferença

mais significativa para os rebanhos leiteiros era o tipo de manejo pois, esses animais não viviam em sistema intensivo, possuindo uma menor lotação por área e recebiam apenas sal mineral ou proteinado.

3.3. A técnica de ELISA

Para a detecção de anticorpos anti- *Neospora*, foi usado o teste imunoenzimático (ELISA)* que é feito com taquizoítas rompidos e originalmente descrito por Björkman e Uggla (1999).

Os procedimentos laboratoriais foram de acordo com as instruções do fabricante e os resultados expressos como na relação S/P < 0,50 foram classificados como negativos e > 0,50 como positivos.

Todos os ensaios imunoenzimáticos foram realizados no Instituto Biológico de São Paulo, no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, laboratório de viroses de bovídeos.

* IDEXX do Brasil (11) 6345.7007 – São Paulo

3.4. Análise Estatística

As observações sobre as ocorrências dos anticorpos anti-*N.caninum* foram analisadas pelo teste do χ^2 (Qui-quadrado), de acordo com Pimentel Gomes (1976), para verificar se as ocorrências observadas para bovinos de corte diferem significativamente daquelas observadas para bovinos de leite.

4. RESULTADOS

As tabelas 1 e 2 mostram a ocorrência do *N.caninum* em várias propriedades leiteiras e de corte, pertencentes à região de Presidente Prudente – SP.

Tabela 1 - Ocorrência de anticorpos anti-*N.caninum* constatados pelo método de ELISA, em bovinos leiteiros de propriedades da região de Presidente Prudente.

Propriedade	Município	Total	Positivos	%
L01 – Viana	Pres. Prudente	78	38	48,72
L02 – Manoel de Oliveira	Região Pres. Prudente	40	10	25,00
L03 - Arlindo Redivo	Pres. Bernardes	26	5	19,23
L04 – Eduardo Celestino	Pres. Prudente	40	11	27,50
L05 – Joaquim A. Campos	Pirapó	22	7	31,82
L06 – Otávio Inague	Pres. Bernardes	24	5	20,83
L07 – Sítio Inague	Pres. Bernardes	35	26	74,28
L08 – Sto. Antonio Inague	Região Pres. Prudente	20	8	40,00
L09 – José Ricardo	Pres. Bernardes	9	3	33,33
L10 – Centro Zootecn.	Região Pres. Prudente	20	8	40,00
L11 – Santa Maria	Emilianópolis	94	24	25,53
TOTAL		408	145	
MÉDIA				35,11

Tabela 2 : Ocorrência de anticorpos anti-*N.caninum* constatados pelo método de ELISA em bovinos de corte pertencentes a propriedades da região de Presidente Prudente-SP.

Propriedade	Município	Total	Positivos	%
C1 – Viana	Pres. Prudente	149	32	21,48
C2 – Orlando Arikawa	Santo Inácio	71	16	22,54
C3 – Faz. Mandacaru	Anhumas	79	9	11,40
C4 – Orlando Arikawa	Santo Inácio	110	20	18,19
C5 – César O. Lima	Região Pres. Prudente	35	12	34,29
C6 – UNOESTE	Mirante do Paranapanema	61	12	19,68
TOTAL		505	101	
MÉDIA				21,26

Na aplicação do teste χ^2 , as ocorrências observadas nas tabelas 1 e 2, resultaram num valor de $\chi^2 = 25,24$, com 1 no grau de liberdade e significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Deste resultado pode-se concluir que a incidência do *N.caninum* difere significativamente entre o gado de corte e o de leite.

5. DISCUSSÃO

Optou-se pela técnica de ELISA, pelas inúmeras vantagens que esta oferece sobre outras, entre elas, a rapidez na determinação de titulação de anticorpos (Venkatesan; Wakeli,1993), a viabilidade de processamento de grande número de amostras em pouco tempo (Osawa *et al.*,1998), por possuir uma sensibilidade alta de até 98% e especificidade de até 100% (Schaes *et al.*,1998) e também por eliminar erros de interpretação técnica, como é no caso da reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

Diferenças significativas são observadas entre as diferentes técnicas para constatação de anticorpos anti-*N.caninum* em um mesmo rebanho. Sartor *et al.*, (1999), comparando as técnicas de ELISA e RIFI em soros procedentes de um mesmo rebanho, verificaram valores de ocorrência de anticorpos anti-*N.caninum* de 30,13% para ELISA e de 16,30% para RIFI. Verificação semelhante, foi citada por Guimarães Júnior (2003) quando da comparação da RIFI e NAT, encontrando valores 80% maiores no primeiro método em relação ao segundo. Partindo dessas premissas, deve-se observar quais os métodos que foram utilizados quando existe a comparação entre estudos epidemiológicos.

A diferença significativa da maior ocorrência de anticorpos anti-*N.caninum* em bovinos de leite (35,11%) em relação aos de corte (21,26%) pode ser observada em dois estudos realizados no estado de São

Paulo (Sartor *et al.*,1999 ; Hasegawa, 2000), no estado da Bahia, em trabalho realizado por Jesus *et al.*,(2001) e por Ragoso (2003), que em levantamento epidemiológico em seis estados brasileiros, nas amostras como um todo, constatou a maior ocorrência em bovinos de leite (26,2%) que nos de corte (19,1%). Nesse estudo foi verificado que nos estados do Paraná e no Mato Grosso do Sul, o maior número de soropositivos se encontrava no gado de corte, enquanto que no estado de Minas Gerais, houve uma maior ocorrência de anticorpos anti-*N.caninum* em gado leiteiro.

Diferenças entre a ocorrência desses anticorpos em favor do gado de corte são citadas na Argentina (Moore *et al.*,2002) e na Espanha (Quintanilla-Gonçalo *et al.*,1999). Entretanto, na Bélgica, uma maior soroprevalência de anticorpos anti-*N.caninum* foi constatada em bovinos de corte (Hemphill e Gottstein,2000). Os autores justificam essa diferença devido a raça e ao manejo dos animais.

Fica difícil uma conclusão quando comparamos raças e manejos com outros países pois, no Brasil, para corte, utiliza-se quase que exclusivamente, raças de *Bos indicus* em manejo extensivo enquanto outros países, criam raças de *Bos taurus* em sistema intensivo.

Comparando-se estudos que utilizaram o mesmo método, isto é, apenas ELISA, os valores médios de ocorrência de anticorpos anti-*N.caninum* de 35,11%, para o gado de leite, assemelham-se aos encontrados por Sartor *et al.*,(1999), Pituco *et al* (2001), Locatelli-Ditrich *et al.*,(2001b), Munhoz *et al.*,(2002a) e Piagentini (2002). São inferiores aos

achados por Locatelli-Diitrich *et al.*,(2001a) e o de Corbellini *et al.*,(2002), porém superiores aos encontrados por Melo *et al.*,(2001), Brautigam *et al.*,(1996), Mello e Leite.,(1999). Quando comparamos os estudos com a utilização do método da RIFI, o resultado do ensaio foi semelhante aos encontrados por Stobbe (1999), Silva *et al.*,(2002) e Ragozo *et al.*,(2002), inferiores aos citados por Gondim e Sartor (1997), Belo *et al.*,(1999) e Stobbe e Cortes (1999), porém superiores aos achados por Gondim *et al.*,(1999), Hasegawa (2000), Sartor *et al.*.,(1999), Guimarães Júnior (2003) e Ogawa *et al.*,(1999), evidenciando-se que Belo *et al.*,(1999), Guimarães (2003) e Ragozo (2002), utilizaram como ponto de corte 100, 25 e 25, respectivamente, enquanto os outros autores usaram como ponto de corte títulos de 200.

No gado de corte, pelo método de ELISA, ficaram no mesmo nível do resultado de 21,26%, os trabalhos de Melo *et al.*,(2001) e Munhoz *et al.*.,(2002b), são inferiores aos achados por Pituco *et al.*,(2001)* e Corbellini *et al.*.,(2002) , no entanto, são superiores aos encontrados por Andreotti *et al.*,(1999) e Melo e Leite(1999). Já no estudo comparativo com o método RIFI, os ensaios semelhantes foram o de Hasegawa (2000), Costa *et al.*, (2001) e Guimarães Júnior (2003), sendo inferiores aos citados por Corbellini *et al.*,(2002) e Pituco *et al.*,(2001), porém superiores aos de Andreotti *et al.*,(1999) e Melo e Leite (1999).

6. CONCLUSÕES

Considerando-se os resultados obtidos neste estudo podemos concluir que:

- Anticorpos anti-*N. caninum* encontra-se presente tanto no gado de corte como no gado leiteiro da região de Presidente Prudente, São Paulo;
- A ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* foi significativamente maior em bovinos de leite em relação aos bovinos de corte.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABBIT, B., CRAIG, T.M., JONES, L.P., HUEY, R.L., EUGSTER, K.
Protozoal abortion in a herd of cattle concurrently infect with
Hammondia pardalis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 203, p. 444-8,
1993.

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. **J. Am. Vet.
Med. Assoc.**, v.198, p.241-4, 1991.

ANDERSON, M.L., PALMER, C.W., THURMOND, M.C., PICANSO, J.P.,
BLANCHARD, P.C., BREITMEYER, R.E., 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. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.207,
p.1206-10, 1995.

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da UNESP**. São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: Referências Bibliográficas. BIOSIS. **Serial sources for de BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

ANDREOTTI, R., PINCKNEY, R., GOMES, A. Diagnóstico sorológico de *Neospora caninum* em rebanho bovino de corte de Mato Grosso do Sul. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA , 11, SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 2, 1999, Salvador. **Anais...** Salvador,1999.p.226.

ATKINSON, R., HARPER, P.A., REICHEL, M.P., ELLIS, J.T. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. **Parasitol.Today**, v. 16, p. 110-4, 2000.

BARR, B.C., BJERKAS, I., BUXTON, D., CONRAD, P.A., DUBEY, J.P., ELLIS, J.T., JENKINS, M.C., JOHNSTON, S.A., LINDSAY, D.S., SIBLEY, D., TREES, A.J., WOUDA, W. Neosporosis, Report of the International *Neospora* Workshop. **Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.**, v. 19, p. 120-6, 1997.

BARTELS, C.J.M., WOUDA, W., SCHUKKEN, Y.H. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 a 1997). **Theriogenology**, v. 52, p. 247-57, 1999.

BELO, M.A.A., REZENDE, P.C.B., SOUZA, L.M., COSTA, A.J. Presença de anticorpos contra *Neospora caninum* em bovinos com histórico de

abortos não diagnosticados etiologicamente. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11, 1999, Salvador. **Anais...** Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999. p. 229.

BJERKAS, I., MOHN, S.F., PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Z. Parasitenkd.**, v.70, p.271-4, 1984.

BJORKMAN, C., UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p. 1497-507, 1999.

BJORKMAN, C., JOHANSSON, O., STENLUND, S., HOLMDAHL, O.J.M., UGGLA, A. *Neospora* species infection in herd of dairy cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.208, p.1441-4, 1996.

BRAUTIGAM, F.E., HIETALA, S.K., GLASS, R. Resultados de levantamento sorológico para espécie *Neospora* em bovinos de corte e leite. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15, 1996, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Sociedade Matogrossense do Sul de Medicina Veterinária, 1996. p. 284.

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. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 5, p. 572-8, 1993.

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. **Vet. Parasitol.**, v. 103, p. 195-202, 2002.

COSTA, G.H.N., CABRAL, D.D., VARANDAS, N.P., SOBRAL, E.A., BORGES, F.A., CASTAGNOLLI, K.C. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*T. gondii* em soros de bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e de Minas Gerais. **Semina**, v. 22, p. 57-62, 2001.

COX, F.E.G. Systematics of parasitic protozoa. In: KRIER, J.P. **Parasitic Protozoa**. 2. ed. New York: Academic Press, 1991. v.1, p.55-67.

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

DIJKSTRA, T. H., BARKEMA, H. W., EYSKER, M., WOUDA, W. Evidence
of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds.
Int. J. Parasitol., v. 31, p. 209 –15, 2001b.

DUBEY, J. P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Vet.**
Parasitol., v.84, p.349-67, 1999.

DUBEY, J.P. , LAPPIN, M. Toxoplasmosis and neosporosis. In: GREENE,
G.E. **Infectious diseases of the dogs and cat.** 2.ed. Philadelphia:
W.B. Saunders Company, 1988. p.439-509.

DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. Neosporosis. **Parasitol. Today**, v. 9, p.
452-8, 1993.

DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and
neosporosis. **Vet. Parasitol.**, v.67, p.1-59, 1996.

DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly

susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts.

Parasitol. Res., v. 86, p. 165-8, 2000.

DUBEY, J.P., HATTEL, A.L., LINDSAY, D.S. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.193, p.1259-63,1988.

DUBEY, J.P., JANOVITZ, E.B., SKOWRONEK, A.J. Clinical neosporosis in a 4-week-old Hereford calf. **Vet. Parasitol.**, v. 43, p.137-41, 1992.

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*. **Am. J. Vet. Res.**, v. 57, p. 329-36, 1996.

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. **Vet. Parasitol.**, v. 90, p. 171-81, 2000.

ELLIS, J., AMOYAL, G., RYCE, C., HARPER, P.A., CLOUGH, K.A., HOMAN, W.L., BRINDLEY, P.J. Comparison of the large subunit ribosomal DNA of *Neospora* and *Toxoplasma* and development of a

new genetic marker for their differentiation based on the D2 domain.

Mol. Cell. P., v. 13, p. 1-12, 1998.

GARCÍA-VAZQUEZ, Z., CRUZ-VÁZQUEZ, C., MEDINA-ESPINOZA, L., GARCÍA-TAPIA, D., CHAVARRIA-MARTINEZ, B. Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, Mexico. **Vet. Parasitol.**, v. 2323, p. 1-6, 2002.

GENNARI, S.M., YAI, L.E., D'AURIA, S.N., CARDOSO, S.M., KWOK, O.C., JENKINS, M.C., DUBEY, J.P. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of São Paulo, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 106, p. 177-9, 2002.

GONDIM, L.F.P.; SARTOR, I.F. Detecção de anticorpos contra *Neospora caninum* em vacas leiteiras de uma propriedade com histórico de aborto. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 6, p.346,1997.

GONDIM, L.F.P., GUSMÃO, A.L., GUIMARÃES, J.E., ALMEIDA, A.M.O., SOUZA, R.M. Associação entre ocorrências de abortos e soropositividade para *Neospora caninum* em bovinos leiteiros em Cachoeira – Bahia. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11, SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 2, 1999, Salvador. **Anais...** Salvador,1999. p.228.

GONDIM, L.F.P., FERNANDES, H.S., PINHEIRO, A.M., JESUS, E.E.V., SANTOS, P.O.M., ALMEIDA, M.A.O., GUIMARÃES, J.E., SOUZA, R.M., RIBEIRO, M.B., FREIRE, S.M., MEYER, R. Um caso de neosporose canina no município de Salvador, Bahia: diagnóstico, isolamento e manutenção do agente. **Rev. Bras. Ciênc. Vet.**, v. 7, p. 102, 2000.

GUIMARÃES JR., J.S. **Neospora caninum em bovinos de exploração leiteira: soroprevalência, fatores de risco e comparação de técnicas sorológicas.** São Paulo, 2003. 119 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

HARMELIN, A., PERL, S., NYSKA, A., YAKOBSON, B., SHPIGEL, N., ORGAD, U., DUBEY, J.P. Neosporosis-associated bovine abortion in Israel. **Vet. Rec.**, v. 136, p. 80, 1995.

HASEGAWA, M.Y. **Soroprevalência de anticorpos contra Neospora caninum em bovinos de corte e em cães rurais da região de Avaré – SP.** Botucatu, 2000. 50 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

HASEGAWA, M.Y., SARTOR, I.F., GONDIM, L.F.P., PIAGENTINI, M.
Ocorrência de anticorpos contra *Neospora caninum* em vacas de corte na região de Avaré – São Paulo: Resultados preliminares. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11, SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 2, 1999, Salvador. **Anais...** Salvador, 1999. p.227.

HEMPHILL, A., GOTTSTEIN, B. A European perspective on *Neospora caninum*. **Int. J. Parasitol.**, v.30, p.1887-924, 2000.

HIETALA, S.K., THURMOND, M.C. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p. 1669-76, 1999.

HOLMDAHL, O.J.M., BJORKMAN, D., UGLLA, A. A case of *Neospora* associated bovine abortion in Sweden. **Acta Vet. Scand.**, v. 36, p. 279-81, 1995.

JARDINE, J.E., WELLS, B.H. Bovine neosporosis in Zimbabwe. **Vet. Rec.**, v. 137, p. 223, 1995.

JESUS, E.E.V., BARROS, S.L.B, SIMÃO, C.B., PINHEIRO, A.M., GONDIM, L.F.P., GUIMARÃES, J.E., ALMEIDA, M.A.O. Inquérito

sorológico *do Neospora caninum* em bovinos dos municípios Euclídes da Cunha e Uauá do semi-árido baiano. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA – CONBRAVET, 28, 2002, Salvador. **Anais...** Salvador: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2002. p. 189.

KASARI, R.T., BARLING, K., McGRANN, J.M. Estimated production and economic losses from *Neospora caninum* infection in Texas beef herds. **Bovine Pract.**, v. 33, p. 113-20, 1999.

LINDSAY, D.S., DUBEY, J.P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **Am. J. Vet. Res.**, v.50, p. 1981-3, 1989.

LINDSAY, D.S., BLAGBURN, B.L., DUBEY, J.P. Factors affecting the survival of *Neopora caninum* bradyzoites in murine tissues. **J. Parasitol.**, v. 78, p. 70-72, 1992.

LINDSAY, D.S., DUBEY, J.P., BLAGBURN, B.L. Finding the cause of parasite – induced abortions in cattle. **Vet. Med.**, v. 21, p. 64-71, 1996.

LOCATELLI-DITTRICH, R., SOCCOL, V.T., RICHARTZ, R.R., GASINO-JOINEAU, M.E., VINNE.R., PINCKNEY, R.D. Serological diagnosis of

neosporosis in a herd of dairy cattle in southern Brazil. **J. Parasitol.**, v. 87, p. 1493-4, 2001a.

LOCATELLI-DITTRICH, R., SOCCOL, V.T., RICHARTZ, R.R., GASINO-JOINEAU, M.E., VINNE.R., SILVA, R., LEITE, L.C., PINCKNEY, R.D. Detecção de anticorpos contra *Neospora caninum* em vacas leiteiras e bezerros no Estado do Paraná. **Arch. Vet. Sci.**, v. 6, p. 37-41, 2001b.

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

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*. **Int. J. Parasitol.**, v. 28, p. 1473-8, 1998.

McNAMEE, P. T., JEFFREY, M. *Neospora*-associated bovine abortion in Northern Ireland. **Vet. Rec.**, v. 134, p.48, 1994.

MELO, C.B. ***Neospora caninum* em Minas Gerais. Aspectos epidemiológicos.** Belo Horizonte, 2001. 131 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal – Escola de Veterinária, Universidade Federal de

Minas Gerais.

MELO, C.B., LEITE, R.C. *Neospora caninum* em Minas Gerais: Dados preliminares. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11, SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 2, 1999, Salvador. **Anais...** Salvador,1999. p.225-6.

MELO, C.B.C., LEITE, R.C., SOUZA, G.N., LEITE, R.C. *Neospora caninum*: Distribuição de anticorpos em três faixas etárias de rebanhos bovinos de leite em Minas Gerais. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.25, p. 250-1, 2001.

MOORE, D.P., CAMPERO, C.M., ODEON, A.C., POSSO, M.A., CANO, D., LUENDA, M.R., BASSO, W., VENTURINI, M.C., SPATH, E. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. **Vet. Parasitol.**, v. 107, p. 303-16, 2002.

MORALES, E., TRIGO, F.J., IBARRA, F., PUENTE, E., SANTACRUZ, M. Soroprevalence study of bovine neosporosis in México. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 13, p. 413-5, 2001.

MUNHOZ, A.D., SILVA, R.T., FLAUSINO, W., TEIXEIRA, M., ALBUQUERQUE, G.R., LOPES, C.W.G. Freqüência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas, no rebanho leiteiro do município de Resende, estado do Rio de Janeiro: dados preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12, 2002, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002. CD-ROMa.

MUNHOZ, A.D., FLAUSINO, W., ALMEIDA, C.R.R., LOPES, C.W.G. Freqüência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas, no rebanho leiteiro do município de Rio Claro, estado do Rio de Janeiro: dados preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12, 2002, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002. CD-ROMb.

OGAWA, L., SANTOS, A.P.M., NAVARRO, I.T., BRACARENSE, A.P.F.R.L., VIDOTO, O., OKANO, W., FALBO, M.K., ALFIERI, A.A., MEDICI, K.C., FREITAS, J.C., OLIVEIRA, R.C., FREIRE, R.L., GONDIM, L.F.P., MARAN, E.R.M., SHIMADA, M.T. Monitoramento sorológico no *Neospora caninum* em vacas leiteiras após abortamento, em Londrina, Paraná e região (Nota prévia). In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11, Salvador, 1999. **Anais...** Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999. p. 225.

- OGINO, H., WATANABE, E., WATANABE, S., AGAWA, H., NARITA, M., HARITANI, M., KAWASHIMA, K. Neosporosis in the aborted fetus and newborn calf. **J. Comp. Pathol.**, v. 107, p. 231-7, 1992.
- OSAWA, T., WASTLING, J., MALEY, S., BUXTON, D., INNES, E.A. A multiple antigen Elisa to detect *Neospora*-specific antibodies in bovine sera, bovine foetal fluids, ovine and caprine sera. **Vet. Parasitol.**, v. 79, p. 19-34, 1998.
- OTTER, A., JEFFREY, M., GRIFFITHS, I.B., DUBEY, J.P. A survey of the incidence of *Neospora caninum* infection in aborted and stillborn bovine fetuses in England and Wales. **Vet. Rec.**, v. 136, p. 602-6, 1995.
- OULD-AMROUCHE, A., KLEIN, F., OSDOIT, C., MOHAMMED, H.O., TOURATIER, A., SANAR, M., MIALOT, J.P. Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Normandy, France. **Vet. Res.**, v. 30, p. 531-8, 1999.
- PARÉ, J., THURMOND, M.C., HIETALA, S.K. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle an associated calfhood mortality. **Can. J. Vet. Res.**, v. 60, p. 133-9, 1996

PARÉ, J., FECTEAU, G., FORTIN, M., MARSOLAIS, G. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 213, p. 1595, 1998.

PAYNE, S., ELLIS, J. Detection of *Neospora caninum* DNA by the polymerase chain reaction. **Int. J. Parasitol.**, v. 26, p. 347-51, 1996.

PERL, S., HARRUS, S., SATUCHNE, C., YAKOBSON, B., HAINES, D. Cutaneous neosporosis in a dog in Israel. **Vet. Parasitol.**, v. 79, p. 257-61, 1998.

PIAGENTINI, M. **Dinâmica da infecção por *Neospora caninum* e propriedades leiteiras do município de Avaré/SP**. Botucatu, 2002. 37 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**, 6 ed. São Paulo: Livraria Nobel, 1976. 430 p.

PITUCO, E.M., SOARES, J.A.G., OKUDA, L.H., STEFANO, E. Ocorrência de neosporose bovina em rebanhos com histórico de abortamento no Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 2, 1998, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Biológico, 1998, p.70.

PUMAROLA, M., AÑOR, S., RAMIS, A.J., BORRÀS, D., GORRAIZ, J., DUBEY, J.P. *Neospora caninum* infection in a Napolitan mastif dog from Spain. **Vet. Parasitol.**, v. 64, p. 315-7, 1996.

QUINTANILLA-GOZALO, A., PEREIRA-BUENO, J., TABARÉS, E., INNES, E.A., GONZÁLES-PANIELLO, R., ORTEGA-MORA, L.M. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p. 1201-8, 1999.

RAGOZO, A.M.A., PAULA, V.S.O., SOUZA, S.L.P., GENNARI, S.M. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros de bovinos procedentes de seis estados brasileiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12, 2002, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002. CD-ROM.

REICHEL, M.P. Prevalence of *Neospora* antibodies in New Zeland dairy cattle and dogs. **N. Z. Vet. J.**, v. 46, p. 38, 1998.

REZENDE, P.C.B., BELO, M.A.A., MARCHIORI FILHO, M., COSTA, A.J., SILVEIRA, D.M. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros da região nordeste do estado de São Paulo, Brasil. In:

SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11, 1999, Salvador. **Anais...** Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999. p. 229.

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

SANTOS, A.P.M.E. **Diagnóstico imunohistoquímico do *Neospora caninum* em rebanho bovino leiteiro, da região norte do estado do Paraná.** Londrina, 2000. 87 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina.

SARTOR, I.F., HASEGAWA, M.Y., GONDIM, L.F.P., PIAGENTINI, M., VIEIRA, A., MEGID, J., CANAVESSI, A.M. Prevalência de anticorpos contra *Neospora caninum* em rebanhos leiteiros do município de Avaré, SP. Resultados preliminares. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11, SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 2, 1999, Salvador. **Anais...** Salvador, 1999. p.225.

SCHARES, G., PETERS, M., WURN, R., BARWALD, A., CONRATHS, F.J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in

dairy cattle analysed by serological techniques. **Vet. Parasitol.**, v. 80, p. 87-98, 1998.

SILVA, M.I.S., ALVES, L.C.A., FAUSTINO, M.A.G., ALMEIDA, M.A., PINHEIRO, M.A., JESUS, E.E.V., CUNHA, A.P., NASCIMENTO, E.S., LIMA, M.M. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros do município de Gravatá, Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12, 2002, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002. 1 CD-ROM.

STOBBE, N.S. **Estudo interativo entre a presença de anticorpos anti-*Neospora caninum* e a ocorrência de abortamentos em bovinos no Noroeste do Estado de São Paulo.** São Paulo, 1999. 33 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

STOBBE, N.S., CÔRTEZ, J.A. Estudo interativo entre a presença de anticorpos anti-*Neospora caninum* e a ocorrência de abortamentos em bovinos no noroeste do Estado de São Paulo – Brasil. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11, SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO

MERCOSUL, 2, 1999, Salvador. **Anais...** Salvador, 1999. p. 226-7.

SUNDERMANN, C.A., ESTRIDGE, B.H., BRANTON, M.S., BRIDGMAN, C.R., LINDSAY, D.S. Immunohistochemical diagnosis of *Toxoplasma gondii*: potential for cross-reactivity with *Neospora caninum*. **J. Parasitol.**, v. 83, p. 440-3, 1997.

THILSTED, J.P., DUBEY, J.P. Neosporosis – like abortions in herd of dairy cattle. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.1, p.205-9, 1989.

THURMOND, M.C., HIETALA, S.K. Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy cows. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 210, p. 672-4, 1997b.

UGGLA A., STENLUND, S., HOLMDAHL, O.J.M., JAKUBEK, E.B., THEBO, P., KINDAHL, H., BJORKMAN, C. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **Int. J. Parasitol.**, v.28, p.1467-72, 1998.

VENKASTEIN, P., WAKELI, D. ELISAs for parasitologist: or lies, damned lies and ELISASs. **Parasitol. Today**, v. 9, p. 228-32, 1993.

WALDNER, C.I., JANZEN, E.D., RIBBLE, C.S. Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproduce

performance in beef herds. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 213, p. 685-90, 1998.

WILLIAMS, D.J., 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**, p.347-58, 2000.

WOUDA, W. Diagnosis and epidemiology of bovine neosporosis: a review. **Vet. Q.**, v. 22, p. 71-74, 2000.

WOUDA W., DIJKSTRA, T.H., KRAMER, A.M.H., van MAANEM, C., BRINKHOF, J.M.A. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. **Int. J. Parasitol.**, v.29, p.1677-82, 1999.