

***Neospora caninum*: AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS E PROBLEMAS REPRODUTIVOS EM VACAS DE CORTE ATÉ 60 DIAS DE GESTAÇÃO**

Neospora caninum: EVALUATION OF ANTIBODIES AND REPRODUCTIVE PROBLEMS IN BEEF COWS WITH UP TO 60 DAYS OF PREGNANCY

**J. A. F. LEONEL¹; V. F. PEREIRA²; J. C. BENASSI¹; M. MATURANA FILHO³;
T. W. P. MINEO⁴; E. H. MADUREIRA³; T. M. F. S. OLIVEIRA^{1,2*}**

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo identificar anticorpos anti-*Neospora caninum* em fêmeas bovinas da raça Nelore pelos métodos sorológicos de Imunoabsorbância Ligada a Enzima (ELISA) e Imunofluorescência Indireta (RIFI) e buscar associação entre a soropositividade e o histórico reprodutivo até 60 dias de gestação. Adicionalmente, nas amostras positivas foram realizados testes de ELISA-Avidez e ELISA para anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*. Para isto, foi constituído um banco de 375 amostras de soros, categorizados em três grupos, de acordo com o histórico reprodutivo de cada fêmea até os 60 dias após a Inseminação Artificial (I.A). Para a análise estatística utilizou-se o teste de Qui-Quadrado de Pearson (X^2) e índice Kappa (k). Foram encontrados 8% (30/375) e 5,07% (19/375) de soros positivos para *N. caninum* pelo ELISA e RIFI, respectivamente, com o ELISA apresentando concordância alta com a RIFI (k = 0,67). A infecção encontrada nesse rebanho, revelado pelo ELISA-Avidez, foi considerada crônica. Nesse estudo, 9,08% das fêmeas soropositivas pela RIFI e 17,25% das fêmeas positivas pelo ELISA apresentaram algum problema reprodutivo. Entretanto, não foi encontrada associação significativa entre a soropositividade das vacas, com o retorno ao cio ou a ocorrência de aborto, observados até 60 dias de gestação ($p > 0,05$). Não foi observado nenhum animal co-infectado por *N. caninum* e *T. gondii*.

PALAVRAS-CHAVE: Abortamento. Bovino. ELISA. *Neospora caninum*. Neosporose. RIFI.

SUMMARY

This study aimed to identify anti-*Neospora caninum* antibodies in cows by serological methods Imunoabsorbância Linked Enzyme (ELISA) and Indirect Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) and seek association between seropositivity and the reproductive history up to 60 days of gestation. In addition, in positive samples were performed ELISA-Avidity and ELISA tests for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies. For this, was constituted a bank of 375 serum samples categorized in three groups according to the reproduction history of each female until 60 days after the Artificial Insemination (AI). Statistical we used the Pearson's Chi-square test (X^2) and Kappa index (k). Found 8% (30/375) and 5,07% (19/375) of positive sera for *N. caninum* by IFAT and ELISA, respectively, with the ELISA showing high correlation with IFAT (k = 0,67). The infection found in this flock, revealed by ELISA-Avidity was considered chronic. In this study, 9,08% of positive females by IFAT and 17,25% of females positive by ELISA showed some reproductive problem. However, there was no statistically significant association between seropositivity of cows, with the return to estrus or the occurrence of abortion, observed up to 60 days of gestation ($p > 0,05$). There was no co-infected animal by *N. caninum* and *T. gondii*.

KEY-WORDS: Abortion. Cattle. ELISA. *Neospora caninum*. Neosporosis. IFAT.

¹Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva Aplicada, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil

²Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil

³Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil

⁴Laboratório de Imunoparasitologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

*Autor correspondente. E-mail: tricia@usp.br

INTRODUÇÃO

A neosporose bovina é causada pelo protozoário *Neospora caninum*, pertencente ao filo Apicomplexa e à família Sarcocystidae (DUBEY et al., 2002), parasita intracelular obrigatório e que tem como seus principais hospedeiros os cães (MCALLISTER et al., 1998) e os bovinos (DUBEY; SCHARES, 2011). Segundo Pitel et al. (2003), a neosporose bovina é uma importante doença parasitária, de grande impacto econômico, por estar envolvida na origem de desordens reprodutivas como aborto e mortalidade neonatal. Estima-se que os prejuízos causados pela neosporose bovina, no Brasil, sejam superiores aos correlacionados a outras doenças abortivas como a leptospirose e brucelose (VIANNA et al., 2008).

A doença apresenta distribuição mundial, tendo os primeiros casos no Brasil relatados por Brautigam et al. (1996) em bovinos de corte e de leite dos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul. No Brasil, Gondim et al. (1999) foi o primeiro a determinar a soroprevalência de *N. caninum* em bovinos no estado da Bahia, ao encontrar uma taxa de 14,09% de animais soropositivos, sendo seguido por outros pesquisadores no estados do Rio Grande do Sul, Paraná, Minas Gérias, Rondônia, Goiás e Tocantins (CORBELLINI et al., 2002; RAGOZO et al., 2003; DE MELO et al., 2004; OGAWA et al., 2005; SARTOR et al., 2005; AGUIAR et al., 2006; MELO et al., 2006; JULIANO, 2006), o que mostra o agente disseminado pelo Brasil, acometendo rebanhos de bovinos de corte e leite (GENNARI, 2004).

A manifestação clínica mais importante da neosporose bovina é o abortamento (MELO et al., 2006). Contudo, quando o abortamento não ocorre, o bezerro pode nascer apresentando problemas neurológicos e de má formação, geralmente morrendo dentro das primeiras quatro semanas de vida (DUBEY; LINDSAY, 1996), ou mais comumente, ocorre o nascimento de um animal clinicamente normal, porém cronicamente infectado (DUBEY; SCHARES, 2006). Pode ainda, ocorrer a morte embrionária e reabsorção fetal, tendo com consequência a repetição do cio nas vacas infectadas (GHANEM et al., 2009; ANDREOTTI, 2010).

Dada à importância da neosporose bovina, esse estudo objetivou estabelecer a frequência de anticorpos anti-*N. caninum* em um grupo de fêmeas e buscar a associação entre a soropositividade e o histórico reprodutivo das fêmeas até 60 dias de gestação.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Constitui-se um banco de 375 amostras de soros de fêmeas bovinas de um rebanho de corte da raça Nelore. As amostras eram provenientes de um banco de soros formado por 2.100 amostras, coletadas durante 3 estações de monta sucessivas, com a idade dos animais variando de 15 meses a 10 anos, todos vacinados contra o complexo IBR/BVD, leptospirose e brucelose. As amostras utilizadas no presente estudo

foram coletadas durante a estação de monta de 2009/2010 e armazenadas a -20°C até o momento das análises. Assim, foram categorizadas em três grupos, de acordo com o histórico reprodutivo de cada fêmea, acompanhado até os 60 dias após a Inseminação Artificial (IA). Sendo os grupos: GRUPO A, fêmeas que retornaram o cio; GRUPO B, fêmeas que emprenharam e mantiveram a gestação e GRUPO C de fêmeas que depois de verificada a prenhez aos 30 dias não mantiveram a gestação até os 60 dias. O presente trabalho obteve a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o número de inscrição CEUA N° 13.1.498.74.7.

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A pesquisa de anticorpos para *N. caninum* foi realizada pelo teste de RIFI, realizado conforme o descrito por Benetti et al. (2009) com modificações, considerando um ponto de corte de 1:200 (DUBEY; LINDSAY, 1996). Os anticorpos foram detectados utilizando conjugado anti-IgG de bovino marcado com isotiocianato de fluoresceína (Sigma Aldrich®, catalog n-F7887), diluído em 1:300, conforme orientação do fabricante. A leitura ocorreu em microscópio de imunofluorescência (ZEISS® Scope-A1), em lâmina coberta com glicerol tamponado e lamínula. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram reação de fluorescência periférica total do parasito fixado na lâmina, do contrário foram consideradas negativas, sempre comparando com os controles positivo e negativo. Posteriormente, as amostras positivas pela RIFI, foram submetidas à titulação em diluições seriadas.

Ensaio de Imunoabsorbância Ligada a Enzima (ELISA)

Adicionalmente, foi realizado o diagnóstico por ELISA, conforme descrito por Björkman et al. (1997) com modificações, utilizando controles sabidamente positivos, determinados através de infecção experimental, e negativos. A placa de poliestireno de baixa afinidade foi sensibilizada com antígenos do parasita (*N. caninum*) diluídos em solução tampão carbonato pH 9,6 na concentração de 10 µg/mL. A placa então foi incubada a 4°C por 14 horas. Após isso, foi submetida a um ciclo de três lavagens com PBST 20 0,05% em lavadora própria (AquaMax® 2000 & 4000 Microplate Washers). Os soros foram então diluídos na concentração de 1:200 em PBST pH 7,2 + leite em pó 5%. Em seguida 50 µL/well de cada soro e controles, diluídos, foram transferidos para a placa, em duplicata. O conjunto foi então incubado em estufa a 37°C por 1 hora e ao fim desse período, submetido a dois ciclos de quatro lavagens/cada. Assim, 50 µL/well do conjugado anti-IgG de bovino marcado com peroxidase (Sigma Aldrich®, 1:20000) foi adicionado e o conjunto incubado a 37°C por 1 hora novamente, seguindo ainda, de nova lavagem. Por fim, 50 µL/well de solução de revelação ABTS (KPL®) foi adicionada. A leitura foi realizada a 405 nm em máquina de espectrofotometria (Molecular Device® Mod. M-2) usando o software SoftMax Pro (Molecular Device®).

O ponto de corte foi determinado pela média dos valores de densidade óptica (DO) dos soros controles negativos acrescido de três desvios padrões. Os títulos de anticorpos foram expressos em Índice ELISA (IE), de acordo, com a seguinte fórmula: $IE = DO \text{ da amostra} \div DO \text{ do ponto de corte}$. Valores de $IE > 1,2$ foram considerados positivos.

As amostras positivas encontradas no ELISA foram testadas quanto a avidéz dos anticorpos anti-*N. caninum* pelo ELISA-Avidéz conforme Björkman et al. (1999), com modificações. A reação é igual à descrita para o ELISA, porém nesse teste, especificamente, os soros foram diluídos em série a partir da concentração de 1:200 (1:200, 1:400, 1:800, 1:1600), também em duplicatas. Além disso, antes da incubação com o conjugado, parte das diluições das amostras (meia placa) foi tratada com 150 µL de solução de Uréia 6M a 37°C por 10 minutos. A absorbância foi medida nos poços tratados e não tratados com Uréia 6M. O ponto de corte também foi determinado como descrito para o ELISA. O IgG Avidéz foi calculado e expresso em porcentagem (%), relacionando o IE positivo obtido em dada diluição da amostra tratada com a mesma diluição não tratada, exemplificado na fórmula: $IgG \text{ Avidéz} = IE \text{ positivo com uréia} \div IE \text{ na mesma diluição sem uréia}$. Valores de IgG avidéz só poderiam ser calculados, para diluições $\geq 1:200$.

Na tentativa de identificar animais co-infectados por *Toxoplasma gondii*, as amostras positivas para *N. caninum* pelo ELISA, foram submetidas ao ELISA para detecção de anticorpos anti-*T. gondii*, conforme

descrito por Silva et al. (2007), com modificações, utilizando diluição de 1:200.

Análise de dados

Foi realizado o teste estatístico de Qui-Quadrado de Pearson com 95% de confiança, utilizando o programa computacional Epi Info™ 7.1.3. Os testes foram comparados pelo índice Kappa, onde para Landis e Koch (1977), valores de $\kappa < 0$, sem concordância; κ entre 0 – 0,20 concordância leve; κ entre 0,21 – 0,40 concordância baixa; κ entre 0,41 – 0,60 concordância moderada; κ entre 0,61 – 0,80 concordância alta; e κ entre 0,81 – 0,99 representa concordância excelente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, para a RIFI, foram encontradas 5,07% (19/375) de amostras soropositivas para *N. caninum*, distribuídas em: 5,33% (8/150) positivos pertencente ao grupo A, 5,52% (8/145) do grupo B e 3,75% (3/80) do grupo C (Tabela 1). Já para o ELISA, foram encontrados 8,00% (30/375) de soros positivos para *N. caninum*, sendo 6,00% (9/150) soros provenientes de fêmeas do grupo A, 8,28% (12/145) soros de fêmeas do grupo B e 11,25% (9/80) soros de fêmeas categorizado no grupo C (Tabela 1). O teste de ELISA apresentou alta concordância com a RIFI na detecção de anticorpos anti-*N. caninum* com índice Kappa de 0,67. Dados epidemiológicos de neosporose são baseados no diagnóstico indireto, através de exames sorológicos de RIFI e ELISA (ROSSI et al., 2011).

Tabela 01 - Frequência absoluta e relativa de fêmeas positivas para *N. caninum* discriminada por técnica e grupo avaliado onde, fêmeas que retornaram ao cio (A), fêmeas prenhas (B) e fêmeas que perderam a gestação (C).

TESTES	GRUPO A (n = 150)	GRUPO B (n = 145)	GRUPO C (n = 80)	TOTAL (n = 375)
RIFI	8 (5,33%) ^{n.s}	8 (5,52%)	3 (3,75%) ^{n.s}	19 (5,07%)
ELISA	9 (6,00%) ^{n.s}	12 (8,28%)	9 (11,25%) ^{n.s}	30 (8,00%)

n.s= não significativo estatisticamente (p>0,05)

Para o Estado de São Paulo, Costa et al. (2001) e Ragozo et al. (2003) observaram 23,1% e 23,6% de soropositivos pela RIFI, respectivamente. Hasegawa (2004) ao analisar 777 bovinos de corte da região de Avaré-SP, determinou uma ocorrência de 15,57% de infectados por *N. caninum* pela RIFI. Já pelo ELISA, Brautigam et al. (1996), Pituco et al. (1998) e Sartor et al. (2003) observaram 15,0%, 34,3% e 30,5% de animais positivos para *N. caninum*, respectivamente. A frequência encontrada nesse trabalho é relativamente baixa, quando comparada com esses inquéritos sorológicos no estado, entretanto, estudos de ocorrência do *N. caninum* apresentam resultados variados, devido às diferenças na metodologia empregada, região em estudo, métodos, ponto de corte, além do histórico da propriedade ou animais examinados, assim as comparações devem ser

realizadas com cuidado (RAGOZO et al., 2003; GENNARI, 2004). Além disso, para Sartor et al. (2005) há evidências de que a neosporose seja mais prevalente nos bovinos leiteiros do que nos bovinos de corte, o que também pode explicar a baixa frequência encontrada nesse estudo.

Stobbe (1999) encontrou uma frequência de 36,7% de animais soropositivos pela RIFI, em propriedades leiteiras do noroeste do Estado de São Paulo, demonstrou ainda que 53,6% (45/84) dos animais com histórico de abortamento eram positivos para *N. caninum*. Da mesma forma, Langoni et al. (2013) encontrou 54,5% (6/22) dos animais positivos para *N. caninum* apresentando casos de aborto. Nesse estudo, 9,08% das fêmeas soropositivas para *N. caninum* pela RIFI e 17,25% das fêmeas positivas pelo ELISA apresentaram algum problema reprodutivo,

desde o retorno ao cio (grupo A) ao aborto (grupo C). Entretanto, pela análise estatística, não foi encontrada associação significativa entre a soropositividade das vacas, pela RIFI e ELISA, com o retorno ao cio ou a ocorrência de aborto ($p>0,05$). Sabe-se que a manifestação clínica mais importante da neosporose bovina é o aborto, que ocorre entre 3º e o 9º mês de gestação (MELO et al., 2006; INNES, 2007), sendo mais frequente em torno do 4º e 6º mês (LINDSAY et al., 1996; ANDERSON et al., 2000). Nesse trabalho as fêmeas foram observadas até o 2º mês de gestação, não foram observadas nos meses seguintes. Fato que pode explicar a não associação entre abortos e soropositividade para *N. caninum* nesse estudo. Além disso, Lópes-Gatius et al. (2004) encontrou forte associação entre o status sorológico positivo da fêmea para *N. caninum* e a ocorrência de abortos após 90 dias de gestação.

Além do abortamento, a neosporose bovina pode levar a morte embrionária e a mumificação fetal (GHANEM et al., 2009; ANDREOTTI et al., 2010). Define-se como morte embrionária a perda do embrião durante a fase embrionária, que se inicia com a concepção até cerca de 40 dias de gestação nos bovinos (LÓPES-GATIUS et al., 2004). Após esse período, ocorre a fase fetal e a interrupção da gestação, nessa fase, é definida como aborto (STENLUND, 2000). A morte embrionária leva a regressão estrutural e funcional do corpo lúteo, dando-se o início de um novo ciclo estral, e o animal manifesta o cio novamente (MARQUES et al., 2007). Nesse estudo, 5,33% (8/150) e 6,00% (9/150) das fêmeas que apresentaram retorno ao cio (grupo A), foram positivas pela RIFI e ELISA, respectivamente. Em seu estudo, Langoni et al. (2013), observou que, 69,6% das fêmeas positivas para *N. caninum* apresentavam retorno ao cio. Tal fato pode ser explicado por Macaldowie et al. (2004) ao observarem que um aumento do índice de retorno ao cio nos animais, pode estar relacionado a morte embrionária na fase inicial da gestação causada pela infecção por *N. caninum*, uma vez que, segundo Andreotti et al. (2010) existe uma correlação positiva entre a presença de anticorpos anti-*N. caninum* e a não concepção. Também foi verificado por Kamga-Waladjo et al. (2010) que vacas infectadas por *N. caninum* necessitavam de um maior número de inseminações, aumentando em aproximadamente 29 dias o intervalo

entre partos. Para Dubey e Schares (2011) o intervalo entre partos e o retorno para cobertura são importantes prejuízos econômicos recorrentes em rebanhos infectados. Um inquérito sorológico realizado no Estado do Mato Grosso por Justo et al. (2013) encontrou associação positiva entre soropositividade das fêmeas bovinas e a repetição de cio. Entretanto, no presente trabalho as desordens reprodutivas observadas não foram associadas estatisticamente à soropositividade para *N. caninum* ($p>0,05$).

A titulação das amostras positivas pela RIFI revelou títulos variando de 1:200 a 1:3.200 (Tabela 2). Variação menor foi observada por Sartor et al. (2003), que encontrou, pela RIFI, títulos variando de 1:200 a 1:1.600, tendo nessa faixa de diluição, 14 fêmeas com casos de abortos constatados. Nesse estudo, 3,75% (3/80) das fêmeas que apresentaram casos de abortos tinham títulos variando de 1:400 a 1:3.200, das quais, duas tinham títulos ≥ 1.600 (Tabela 2). Títulos esses, superiores ao encontrado por Conrad et al. (1993) ao observar que das 25 fêmeas que abortaram fetos positivos para *N. caninum*, com títulos variando de 1:320 a 1:5.120, em sua maioria apresentavam títulos de anticorpos ≥ 1.280 no momento do abortamento. Também observamos que 5,33% (8/150) das fêmeas que apresentaram retorno ao cio, tiveram títulos variando de 1:200 a 1:3200, com uma fêmea apresentando título de 1:3200 (Tabela 2). Embora Dubey et al. (1997) afirme que somente a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em soros de vacas que abortaram não revela a causa do aborto, a detecção de altos títulos em casos de abortamento, como 1.280 (CONRAD et al., 1993; TREES et al., 1994) e 4.096 (BUXTON et al., 1997), são altamente sugestivos como diagnóstico de aborto por *N. caninum*. Oito fêmeas soropositivas, que mantiveram a gestação até os 60 dias, tiveram títulos de anticorpos variando de 1:200 a 1:1.600 (Tabela 2). Conforme observado por Lópes-Gatius et al. (2004) vacas soropositivas para *N. caninum* possuem 18,9 vezes mais chances de abortamentos após 90 dias de gestação, que vacas soronegativas. Além disso, Buxton et al. (1997), observou que fêmeas com títulos de anticorpos $\geq 1:512$ são mais propensas a conceberem um bezerro congenitamente infectado. Tal fato, não pode ser avaliado nesse estudo, uma vez que as fêmeas foram acompanhadas apenas até o segundo mês de gestação.

Tabela 02 – Frequência dos títulos encontrados na detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* pela RIFI, discriminadas por grupo avaliado onde, fêmeas que retornaram ao cio (A), fêmeas prenhas (B) e fêmeas que perderam a gestação (C)

TÍTULOS DE ANTICORPOS	N	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C
Negativos	356	142	137	77
1:200	6	3	3	0
1:400	4	2	1	1
1:800	5	2	3	0
1:1600	2	0	1	1
1:3200	2	1	0	1
TOTAL	375	150	145	80

As amostras positivas para *N. caninum* pelo ELISA, foram analisadas quanto à avidéz dos anticorpos IgG. Segundo Dubey (2003) com o objetivo de determinar o perfil da infecção, discriminando infecções recentes de infecções crônicas. Assim o ELISA-Avidéz tem sido considerado uma importante ferramenta nos estudos epidemiológicos de neosporose bovina e abortos a ela relacionados (SAGER et al., 2003; BJÖRKMAN et al., 2005; FRÖSSLING et al., 2005). No presente trabalho, os valores encontrados para IgG-Avidéz nas amostras positivas, ficaram em média, acima de 70%, caracterizando uma alta avidéz dos soros positivos. Björkman et al. (1999; 2003) classifica IgG avidéz em baixo (< 35,00), intermediário (35,00 - 50,00) e alto (> 50,00). Os ensaios de avidéz baseiam-se no fato de que os primeiros anticorpos produzidos após o primeiro contato com o antígeno têm uma menor afinidade a ele do que os produzidos mais tarde (BJÖRKMAN et al., 1999). Para Dubey e Schares (2006), animais que apresentam, infecção primária recente apresentam IgG com baixa avidéz, enquanto que animais infectados há mais de seis meses possuem IgG de alta avidéz. Com isso, a infecção por *N. caninum*, diagnosticada nos animais do presente trabalho, é crônica. Alguns estudos de campo demonstraram uma associação entre epidemias de aborto e infecção recente por *N. caninum*, com IgG de baixa avidéz (DUBEY; SCHARES, 2006). Já outros autores citam um risco aumentado de aborto em vacas cronicamente infectadas por *N. caninum* (BJÖRKMAN et al., 2003), fato não observado no presente trabalho.

Para Dubey e Lindsay (1996) o *N. caninum* e *Toxoplasma gondii* são importantes causas de problemas reprodutivos. Contudo, nos bovinos, o *T. gondii* não é considerado um importante agente causador de abortos (DUBEY, 1986). Porém, com o objetivo de determinar a ocorrência no rebanho de co-infecção entre esses protozoários e buscar uma associação com os problemas reprodutivos encontrados, as amostras positivas para *N. caninum* pelo ELISA foram testadas para anticorpos anti-*T. gondii* pela mesma técnica. Não foram encontrados animais soropositivos para *N. caninum* e *T. gondii*, simultaneamente. Diferente do encontrado por Ogawa et al. (2005) e Costa et al. (2001) onde 4 e 54 animais, respectivamente, foram soropositivos para ambos os parasitas, em propriedades rurais nos estados do Paraná, São Paulo e Minas Gerais. Contudo, Cabral et al. (2013) ao não encontrar DNA para *T. gondii* em fetos abortados com lesões sugestivas de protozoários, sugerem que apesar dos abortos em bovinos não serem frequentemente correlacionado com *T. gondii*, sua investigação é tão importante quanto para outros agentes infecciosos.

CONCLUSÃO

O diagnóstico sorológico pelo ELISA identificou maior número de animais positivos, tendo alta concordância com a RIFI. A infecção do rebanho possui caráter crônico, como revelado no ELISA-Avidéz. Não houve correlação estatística entre

soropositividade para *Neospora caninum* e perdas reprodutivas até os 60 dias de gestação, nesse estudo.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro ao projeto Processo Nº 2012-22183-7.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; RODRIGUES, A. A.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M.; CAMARGO, E. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of anti-*Neospora caninum* in cattle and dogs from western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 142, n. 1-2, p. 71-77, 2006.

ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61, n. 2, p. 417-431, 2000.

ANDREOTTI, R.; BARROS, J. C.; PEREIRA, A. R.; OSHIRO, L. M.; CUNHA, R. C.; FIGUEIREDO NETO, L. F. Association between seropositivity for *Neospora caninum* and reproductive performance of beef heifers in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 2, p. 119-123, 2010.

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

BJÖRKMAN, C.; GONDIM, L. F. P.; NÄSLUND, K.; TREES, A. J.; MCALLISTER, M. IgG avidity pattern in cattle after ingestion of *Neospora caninum* oocysts. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 128, p. 195-200, 2005.

BJÖRKMAN, C.; HOLMDAHL, O. J. M.; UGGLA, A. An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 68, p. 251-260, 1997.

BJÖRKMAN, C.; MCALLISTER, M. M.; FRÖSSLING, J.; NÄSLUND, K.; LEUNG, F.; UGGLA, A. Application of the *Neospora caninum* IgG avidity ELISA in assessment of chronic reproductive losses following an outbreak of neosporosis in a herd of beef cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia MO, v. 15, p. 3-7, 2003.

- BJÖRKMAN, C.; NÄSLUND, K.; STENLUND, S.; MALEY, S. W.; BUXTON, D.; UGGLA, A. An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia MO, v. 11, p. 41-44, 1999.
- BUXTON, O.; CALDOW, G. L.; MALEY, S. W. Neosporosis and bovine abortion in Scotland. **Veterinary Record**, Londres, v. 141, p. 649-651, 1997.
- CABRAL, A. D.; CAMARGO, C. N.; GALLETI, L. H.; OKUDA, E. M.; PITUCO, C.; DEL FAVA, C. Screening for *Toxoplasma gondii* in aborted bovine fetuses in Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.80, p.103-105, 2013.
- CONRAD, P. A.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M.; ROWE, J.; BONDURANT, R.; TUTER, G.; BREITMEYER, R.; PALMER, C.; THURMOND, M.; ARDANS, A.; DUBEY, J. P.; DUHAMEL, G.; BARR, B. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia MO, v. 5, p. 572-578, 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. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam v. 103, p. 195-202, 2002.
- COSTA, G. H. N.; CABRAL, D. D.; VARANDAS, N. P.; SOBRAL, E. A.; BORGES, F. A.; CASTAGNOLLI, K. L. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em soros de bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 22, n. 1, p. 61-66, 2001.
- DE MELO, C. B.; LEITE, R.C.; LOBATO, Z. I.; LEITE, R. C. Infection by *Neospora caninum* associated with bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in cattle from Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 119, n. 2-3, p. 97-105, 2004.
- DUBEY, J.P. A review of toxoplasmosis in cattle. **Veterinary Parasitology**, v.22, n.3/4, p.177-202, 1986.
- DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Korean Journal Parasitology**, Seoul, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2003.
- DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERKAS, I.; BJÖRKMAN, C.; BLAGBURN, B. L.; BOWMAN D. D.; BUXTON D.; ELLIS, J. T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL A.; HILL D. E.; HOWE D. K.; JENKINS, M. C.; KOBAYASHI Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A. E.; MATTSSON J. G.; MCALLISTER, M. M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L. D.; SPEER, C. A.; TREES, A. J.; UGGLA, A.; UPTON, S. J.; WILLIAMS, D. J.; LINDSAY, D. S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 32, p. 929-946, 2002.
- DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; ADAMS, D. S.; MCALLISTER, M. M.; ANDERSON-SPRECHER, R.; BASZLER, T. V.; KWOK, O. C.; LALLY, N. C.; BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Antibody responses of cows during na outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and diferente enzyme-linked immunosorbent assays. **Journal of Parasitology**, Lawrence KS, v. 83, n. 6, p. 1063-1069, 1997.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 67, p. 1-59, 1996.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; ADAMS, D. S.; GAY, J. M.; BASZLER, T. V.; BLAGBURN, B. L.; THULLIEZ, P. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.57, p.329-336, 1996.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of Bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 140, p. 1-34, 2006.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals-The last five years. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 180, p. 90-108, 2011.
- FRÖSSLING, J.; UGGLA, A.; BJÖRKMAN, C. Prevalence and transmission of *Neospora caninum* within infected Swedish dairy herds. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 128, p. 209-218, 2005.
- GENNARI, S. M. *Neospora caninum* no Brasil, situação atual da pesquisa. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 13, suplemento 1, p. 23-28, 2004.
- GHANEM, M. E.; SUZUKI, T.; AKITA, M.; NISHIBORI, M. *Neospora caninum* and complex vertebral malformation as possible causes of bovine fetal mummification. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v.50, p. 389-92, 2009.
- GONDIM, L. F. P.; SARTOR, I. F.; HASEGAWA, M.; YAMANE I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, n. 86, n. 1, p. 71-75, 1999.
- HASEGAWA, M. Y.; SARTOR, I. F.; CANAVESSI, A. M. O.; PINCKNEY, R. D. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in beef cattle and in farm dogs from Avaré Region of São Paulo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 1, p. 45-50, 2004.

- INNES, E. A. The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. **Parasitology**, Londres, v. 134, p. 1903-1910, 2007.
- JULIANO, R. S. **Aspectos sanitários e do sistema de fagócitos de bovinos da raça Curraleiro**. 2006, 125p. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2006.
- STENLUND, S. ***Neospora caninum* in cattle in Sweden: Isolation of the parasite and studies of its transmission**. 2000, 40p. Tese (Doutorado) – Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 2000.
- JUSTO, R. V.; MANFIO, J. B.; GALHARDO, J. A.; GARCIA, J. L.; CAMPOS, A. K. Inquérito soropidemiológico sobre neosporose bovina no norte do estado de Mato Grosso, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, suplemento 2, p. 3897-3902, 2013.
- KAMGA-WALADJO, A. R.; GBATI, O. B.; KONE, P.; LAPO, R. A.; CHATAGNON, G.; BAKOU, S. N.; PANGUI, L. J.; DIOP PEL, H.; AKAKPO, J. A.; TAINURIER, D. Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies and its consequences for reproductive parameters in dairy cows from Dakar-Senegal, West Africa. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 9, p. 953-959, 2010.
- LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. **The measurement of observer agreement for categorical data**. *Biometrics*, Arlington, v. 33, n. 1, p. 159-174, 1977.
- LANGONI, H.; SILVA, A. V.; KATAGIRI, S.; CAGNINI, F.; RIBEIRO, C. M. Avaliação sorológica para *Neospora caninum* em propriedades de bovinos leiteiros com alterações reprodutivas. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 20, p.124-130, 2013.
- LINDSAY, D. S.; STEINBERG, H.; DUBIELZIG, R. R.; SEMRAD, S. D.; KONKLE, D. M.; MILLER, P. E.; KONKLE, D. M.; MILLER, P. E.; BLAGBURN, B. L. Central nervous system neosporosis in a foal. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 8, n. 4, p. 507-510, 1996.
- LÓPEZ-GATIUS, F.; PABÓN, M.; ALMERÍA S. *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 62, p. 606-13, 2004.
- MACALDOWIE, C.; MALEY, S. W.; WRIGHT, S.; BARTLEY, P.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON D.; INNES, E. A. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 131, p. 142-156, 2004.
- MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; MCGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 28, p. 1473-1478, 1998.
- MARQUES, V. B.; BERTAN, C. M.; ALMEIDA, A. B.; MEIRELLES, F. V.; PAPA, P. C.; BINELLI, M. Interferon-tau and pregnancy recognition in cattle. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, p. 479-88, 2007.
- MELO, D. P. G.; SILVA, A. C.; ORTEGA-MORA, L. M.; BASTOS, S. A.; BOAVENTURA, C. M. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos das microrregiões de Goiânia e Anápolis, Goiás, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 15, n. 3, p. 105-109, 2006.
- OGAWA, L.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O.; GONDIM, L. F. P.; NAVARRO, I. T. Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 3, p. 312-316, 2005.
- PITEL, P. H.; ROMAND, S.; PRONOST, S.; FOUCHER, N.; GARGALA, G.; MAILLARD, K. Investigation of *Neospora* sp. antibodies in aborted mares from Normandy, France. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 118, p. 1-6, 2003.
- PITUCO, E. M.; SOARES, J. A. G.; OKUDA, L. H.; STEFANO, E. Ocorrência de neosporose bovina em rebanhos com histórico de abortamento no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 65, n. 1, p. 70, 1998.
- RAGOZO, A. M. A.; PAULA, V. S. O.; SOUZA, S. L. P.; BERGAMASCHI, D. P.; GENNARI, S. M. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis estados brasileiros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 12, n. 1, p. 33-37, 2003.
- ROSSI, G. F.; CABRAL, D. D.; RIBEIRO, D. P.; PAJUABA, A. C. A. M.; CORRÊA, R. R.; MOREIRA, R. Q. Evaluation of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Uberlândia, Minas Gerais State, Brazil, by different serological methods. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 175, p. 252-259, 2011.
- SAGER, H.; GLOOR, M.; BJÖRKMAN, C.; KRITZNER, S.; GOTTSSTEIN, B. Assessment of antibody avidity in aborting cattle by a somatic *Neospora caninum* tachyzoite antigen IgG avidity ELISA. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 112, p. 1-10, 2003.

SARTOR, I. F.; HASEGAWA, M. Y.; CANAVESSI, A. M. O.; PINCKNEY, R. D. Occurrence of *Neospora caninum* antibody in dairy cows assayed by ELISA and IFAT from Avaré county, SP. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 3-10, 2003.

SARTOR, I. F.; GARCIA-FILHO, A.; VIANNA, L. C.; PITUCO, E. M.; DALPAI, V.; SARTOR, R. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros e de corte da região de Presidente Prudente, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 413-418, 2005.

SILVA, D. A.; LOBATO, J.; MINEO, T. W.; MINEO, J. R. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 143, n. 3-4, p. 234-244, 2007.

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**. 1999, 44p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

TREES, A. J.; GUY, F.; LOW, J. C.; ROBERTS, L.; BUXTON, D.; DUBEY, J. P. Serological evidence implicating *Neospora* species as a cause of abortion in British cattle. **Veterinary Record**, Londres, v. 134, p. 405-407, 1994.

VIANNA, L. C.; SARTOR, I. F.; PITUCO, E. M.; OKUDA, L. H.; CAMARGO, C. N.; KRONKA, S. N. Incidence and transplacental transmission of *Neospora caninum* in primiparous females from *Bos indicus* slaughtered in Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 2, p.387-392, 2008.