

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

3
4 ***Neospora caninum*: EVALUATION OF ANTIBODIES AND REPRODUCTIVE**
5 **PROBLEMS IN BEEF COWS WITH UP TO 60 DAYS OF PREGNANCY**

6
7 **RESUMO**

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

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

3

4 **ABSTRACT**

5 This study aimed to identify anti-*Neospora caninum* antibodies in cows by serological
6 methods Imunoabsorbância Linked Enzyme (ELISA) and Indirect Immunofluorescence
7 Antibody Test (IFAT) and seek association between seropositivity and the reproductive
8 history up to 60 days of gestation. In addition, in positive samples were performed ELISA-
9 Avidity and ELISA tests for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies. For this, was constituted a
10 bank of 375 serum samples categorized in three groups according to the reproduction history
11 of each female until 60 days after the Artificial Insemination (AI). Statistical we used the
12 Pearson's Chi-square test (X^2) and Kappa index (k). Found 8% (30/375) and 5,07% (19/375)
13 of positive sera for *N. caninum* by IFAT and ELISA, respectively, with the ELISA showing
14 high correlation with IFAT (k = 0,67). The infection found in this flock, revealed by ELISA-
15 Avidity was considered chronic. In this study, 9,08% of positive females by IFAT and
16 17,25% of females positive by ELISA showed some reproductive problem. However, there
17 was no statistically significant association between seropositivity of cows, with the return to
18 estrus or the occurrence of abortion, observed up to 60 days of gestation ($p>0,05$). There was
19 no co-infected animal by *N. caninum* and *T. gondii*.

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

21

22

23 **INTRODUÇÃO**

24 A neosporose bovina é causada pelo protozoário *Neospora caninum*, pertencente ao filo
25 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

1 o bovinos (DUBEY & SCHARES, 2011). Segundo Pitel et al. (2003), a neosporose bovina é
2 uma importante doença parasitária, de grande impacto econômico, por estar envolvida na
3 origem de desordens reprodutivas como aborto e mortalidade neonatal. Estima-se que os
4 prejuízos causados pela neosporose bovina, no Brasil, sejam superiores aos correlacionados a
5 outras doenças abortivas como a leptospirose e brucelose (VIANNA et al., 2008).

6 A doença apresenta distribuição mundial, tendo os primeiros casos no Brasil relatados
7 por Brautigam et al. (1996) em bovinos de corte e de leite dos estados de São Paulo e Mato
8 Grosso do Sul. No Brasil, Gondim et al. (1999) foi o primeiro a determinar a soroprevalência
9 de *N. caninum* em bovinos no estado da Bahia, ao encontrar uma taxa de 14,09%, sendo
10 seguido por outros pesquisadores no estados do Rio Grande do Sul, Paraná, Minas Gérias,
11 Rondônia, Goiás e Tocantins (CORBELLINI et al., 2002; RAGOZO et al., 2003; DE MELO
12 et al., 2004; OGAWA et al., 2005; SARTOR et al., 2005; AGUIAR et al., 2006; MELO et al.,
13 2006; JULIANO, 2006), o que mostra o agente disseminado pelo Brasil, acometendo
14 rebanhos de bovinos de corte e leite (GENNARI, 2004).

15 A manifestação clínica mais importante da neosporose bovina é o aborto (MELO et al.,
16 2006). Contudo, quando o aborto não ocorre, o bezerro pode nascer apresentando problemas
17 neurológicos e de má formação, geralmente morrendo dentro das primeiras quatro semanas de
18 vida (DUBEY & LINDSAY, 1996), ou mais comumente, ocorre o nascimento de um animal
19 clinicamente normal, porém cronicamente infectado (DUBEY & SCHARES, 2006). Pode
20 ainda, ocorrer a morte embrionária e reabsorção fetal, tendo com consequência a repetição do
21 cio nas vacas infectadas (GHANEM et al., 2009; ANDREOTTI, 2010).

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

25

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 são 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 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 engravidaram 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. 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,

1 sempre comparando com os controles positivo e negativo. Posteriormente, as amostras
2 positivas pela RIFI, foram submetidas à titulação em diluições seriadas.

3

4 **Ensaio de Imunoabsorbância Ligada a Enzima (ELISA)**

5 Adicionalmente, foi realizado o diagnóstico por ELISA, conforme descrito por
6 Björkman et al. (1997) com modificações, utilizando controles sabidamente positivos,
7 determinados através de infecção experimental, e negativos. A placa de poliestireno de baixa
8 afinidade foi sensibilizada com antígenos do parasita (*N. caninum*) diluídos em solução
9 tampão carbonato pH 9,6 na concentração de 10 µg/mL. A placa então foi incubada a 4°C por
10 14 horas. Após isso, foi submetida a um ciclo de três lavagens com PBST 20 0,05% em
11 lavadora própria (AquaMax® 2000 & 4000 Microplate Washers). Os soros foram então
12 diluídos na concentração de 1:200 em PBST pH 7,2 + leite em pó 5%. Em seguida 50 µL/*well*
13 de cada soro e controles, diluídos, foram transferidos para a placa, em duplicata. O conjunto
14 foi então incubado em estufa a 37°C por 1 hora e ao fim desse período, submetido a dois
15 ciclos de quatro lavagens/cada. Assim, 50 µL/*well* do conjugado anti-IgG de bovino marcado
16 com peroxidase (Sigma Aldrich®, 1:20000) foi adicionado e o conjunto incubado a 37°C por
17 1 hora novamente, seguindo ainda, de nova lavagem. Por fim, 50 µL/*well* de solução de
18 revelação ABTS (KPL®) foi adicionada. A leitura foi realizada a 405 nm em máquina de
19 espectrofotometria (Molecular Device® Mod. M-2) usando o software SoftMax Pro
20 (Molecular Device®). O ponto de corte foi determinado pela média dos valores de densidade
21 óptica (DO) dos soros controles negativos acrescido de três desvios padrões. Os títulos de
22 anticorpos foram expressos em Índice ELISA (IE), de acordo, com a seguinte fórmula: IE =
23 DO da amostra ÷ DO do ponto de corte. Valores de IE > 1,2 foram considerados positivos.

24 As amostras positivas encontradas no ELISA foram testadas quanto a avidéz dos
25 anticorpos anti-*N.caninum* pelo ELISA-Avidéz conforme Björkman et al. (1999), com

1 modificações. A reação é igual à descrita para o ELISA, porém nesse teste, especificamente,
2 os soros foram diluídos em série a partir da concentração de 1:200 (1:200, 1:400, 1:800,
3 1:1600), também em duplicatas. Além disso, antes da incubação com o conjugado, parte das
4 diluições das amostras (meia placa) foi tratada com 150 µL de solução de Uréia 6M a 37°C
5 por 10 minutos. A absorbância foi medida nos poços tratados e não tratados com Uréia 6M. O
6 ponto de corte também foi determinado como descrito para o ELISA. O IgG Avidéz foi
7 calculado e expresso em porcentagem (%), relacionando o IE positivo obtido em dada
8 diluição da amostra tratada com a mesma diluição não tratada, exemplificado na fórmula: IgG
9 Avidéz = IE positivo com uréia ÷ IE na mesma diluição sem uréia. Valores de IgG avidéz só
10 poderiam ser calculado, para diluições $\geq 1:200$.

11 Na tentativa de identificar animais co-infectados por *Toxoplasma gondii*, as amostras
12 positivas para *N. caninum* pelo ELISA, foram submetidas ao ELISA para detecção de
13 anticorpos anti-*T. gondii*, conforme descrito por Silva et al. (2007), com modificações,
14 utilizando diluição de 1:200.

15

16 **Análise de dados**

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

23

24

25

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1
2 No presente trabalho, para a RIFI, foram encontradas 5,07% (19/375) de amostras
3 soropositivas para *N. caninum*, distribuídas em: 5,33% (8/150) positivos pertencente ao grupo
4 A, 5,52% (8/145) do grupo B e 3,75% (3/80) do grupo C (Tabela 1). Já para o ELISA, foram
5 encontrados 8,00% (30/375) de soros positivos para *N. caninum*, sendo 6,00% (9/150) soros
6 provenientes de fêmeas do grupo A, 8,28% (12/145) soros de fêmeas do grupo B e 11,25%
7 (9/80) soros de fêmeas categorizado no grupo C (Tabela 1). O teste de ELISA apresentou alta
8 concordância com a RIFI na detecção de anticorpos anti-*N. caninum* com índice Kappa de
9 0,67. Dados epidemiológicos de neosporose são baseados no diagnóstico indireto, através de
10 exames sorológicos de RIFI e ELISA (ROSSI et al., 2011).

11 Para o Estado de São Paulo, Costa et al. (2001) e Ragozo et al. (2003) observaram
12 23,1% e 23,6% de soropositivos pela RIFI, respectivamente. Hasegawa (2004) ao analisar 777
13 bovinos de corte da região de Avaré-SP, determinou uma ocorrência de 15,57% de infectados
14 por *N. caninum* pela RIFI. Já pelo ELISA, Brautigam et al. (1996), Pituco et al. (1998) e
15 Sartor et al. (2003) observaram 15,0%, 34,3% e 30,5% de animais positivos para *N. caninum*,
16 respectivamente. A frequência encontrada nesse trabalho é relativamente baixa, quando
17 comparada com esses inquéritos sorológicos no estado, entretanto, estudos de ocorrência do
18 *N. caninum* apresentam resultados variados, devido às diferenças na metodologia empregada,
19 região em estudo, métodos, ponto de corte, além do histórico da propriedade ou animais
20 examinados, assim as comparações devem ser realizadas com cuidado (RAGOZO et al.,
21 2003; GENNARI, 2004). Além disso, para Sartor et al. (2005) há evidências de que a
22 neosporose seja mais prevalente nos bovinos leiteiros do que nos bovinos de corte, o que
23 também pode explicar a baixa frequência encontrada nesse estudo.

24 Stobbe (1999) encontrou uma frequência de 36,7% de animais soropositivos pela RIFI,
25 em propriedades leiteiras do noroeste do Estado de São Paulo, demonstrou ainda que 53,6%

1 (45/84) dos animais com histórico de abortamento eram positivos para *N. caninum*. Da
2 mesma forma, Langoni et al. (2013) encontrou 54,5% (6/22) dos animais positivos para *N.*
3 *caninum* apresentando casos de aborto. Nesse estudo, 9,08% das fêmeas soropositivas para *N.*
4 *caninum* pela RIFI e 17,25% das fêmeas positivas pelo ELISA apresentaram algum problema
5 reprodutivo, desde o retorno ao cio (grupo A) ao aborto (grupo C). Entretanto, pela análise
6 estatística, não foi encontrada associação significativa entre a soropositividade das vacas, pela
7 RIFI e ELISA, com o retorno ao cio ou a ocorrência de aborto ($p>0,05$). Sabe-se que a
8 manifestação clínica mais importante da neosporose bovina é o aborto, que ocorre entre 3º e o
9 9º mês de gestação (MELO et al., 2006; INNES, 2007), sendo mais frequente em torno do 4º
10 e 6º mês (LINDSAY et al., 1996; ANDERSON et al., 2000). Nesse trabalho as fêmeas foram
11 observadas até o 2º mês de gestação, não foram observadas nos meses seguintes. Fato que
12 pode explicar a não associação entre abortos e soropositividade para *N. caninum* nesse estudo.
13 Além disso, Lópes-Gatius et al. (2004) encontrou forte associação entre o status sorológico
14 positivo da fêmea para *N. caninum* e a ocorrência de abortos após 90 dias de gestação.

15 Além do abortamento, a neosporose bovina pode levar a morte embrionária e a
16 mumificação fetal (GHANEM et al., 2009; ANDREOTTI et al., 2010). Define-se como morte
17 embrionária a perda do embrião durante a fase embrionária, que se inicia com a concepção até
18 cerca de 40 dias de gestação nos bovinos (LÓPES-GATIUS et al., 2004). Após esse período,
19 ocorre a fase fetal e a interrupção da gestação, nessa fase, é definida como aborto
20 (STENLUND, 2000). A morte embrionária leva a regressão estrutural e funcional do corpo
21 lúteo, dando-se o início de um novo ciclo estral, e o animal manifesta o cio novamente
22 (MARQUES et al., 2007). Nesse estudo, 5,33% (8/150) e 6,00% (9/150) das fêmeas que
23 apresentaram retorno ao cio (grupo A), foram positivas pela RIFI e ELISA, respectivamente.
24 Em seu estudo, Langoni et al. (2013), observou 69,6% das fêmeas positivas para *N. caninum*
25 apresentavam retorno ao cio. Tal fato pode ser explicado por Macaldowie et al. (2004) ao

1 observarem que um aumento do índice de retorno ao cio nos animais, pode estar relacionado a
2 morte embrionária na fase inicial da gestação causada pela infecção por *N. caninum*, uma vez
3 que, segundo Andreotti et al. (2010) existe uma correlação positiva entre a presença de
4 anticorpos anti-*N. caninum* e a não concepção. Também foi verificado por Kamga-Waladjo et
5 al. (2010) que vacas infectadas por *N. caninum* necessitavam de um maior número de
6 inseminações, aumentando em aproximadamente 29 dias o intervalo entre partos. Para Dubey
7 e Schares (2011) o intervalo entre partos e o retorno para cobertura são importantes prejuízos
8 econômicos recorrentes em rebanhos infectados. Um inquérito sorológico realizado no Estado
9 do Mato Grosso por Justo et al. (2013) encontrou associação positiva entre soropositividade
10 das fêmeas bovinas e a repetição de cio. Entretanto, no presente trabalho as desordens
11 reprodutivas observadas não foram associadas estatisticamente à soropositividade para *N.*
12 *caninum* ($p>0,05$).

13 A titulação das amostras positivas pela RIFI revelou títulos variando de 1:200 a 1:3.200
14 (Tabela 2). Variação menor foi observada por Sartor et al. (2003), que encontrou, pela RIFI,
15 títulos variando de 1:200 a 1:1.600, tendo nessa faixa de diluição, 14 fêmeas com casos de
16 abortos constatados. Nesse estudo, 3,75% (3/80) das fêmeas que apresentaram casos de
17 abortos tinham títulos variando de 1:400 a 1:3.200, das quais, duas tinham títulos ≥ 1.600
18 (Tabela 2). Títulos esses, superiores ao encontrado por Conrad et al. (1993) ao observar que
19 das 25 fêmeas que abortaram fetos positivos para *N. caninum* com títulos variando de 1:320 a
20 1:5.120, a maioria das fêmeas apresentavam títulos de anticorpos ≥ 1.280 no momento do
21 abortamento. Também observamos que 5,33% (8/150) das fêmeas que apresentaram retorno
22 ao cio, tiveram títulos variando de 1:200 a 1:3200, com uma fêmea apresentado título de
23 1.3200 (Tabela 2). Embora Dubey et al. (1997) afirme que somente a detecção de anticorpos
24 anti-*N. caninum* em soros de vacas que abortaram não revela a causa do aborto, a detecção de
25 altos títulos em casos de abortamento, como 1.280 (CONRAD et al., 1993; TREES et al.,

1 1994) e 4.096 (BUXTON et al., 1997), são altamente sugestivos como diagnóstico de aborto
2 por *N. caninum*. Oito fêmeas soropositivas, que mantiveram a gestação até os 60 dias, tiveram
3 títulos de anticorpos variando de 1:200 a 1:1.600 (Tabela 2). Observado por Lópes-Gatius et
4 al. (2004) vacas soropositivas para *N. caninum* possuem 18,9 vezes mais chances de
5 abortamentos após 90 dias de gestação, que vacas soronegativas. Além disso, Buxton et al.
6 (1997), observou que fêmeas com títulos de anticorpos $\geq 1:512$ são mais propensas a
7 conceberem um bezerro congenitamente infectado. Tal fato não pode ser avaliado nesse
8 estudo, uma vez que as fêmeas foram acompanhadas apenas até o segundo mês de gestação.

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

1 outros autores citam um risco aumentado de aborto em vacas cronicamente infectadas por *N.*
2 *caninum* (BJÖRKMAN et al., 2003), fato não observado no presente trabalho.

3 Para Dubey e Lindsay (1996) o *N. caninum* e *Toxoplasma gondii* são importantes
4 causas de problemas reprodutivos. Contudo, nos bovinos, o *T. gondii* não é considerado um
5 importante agente de causador de abortos (DUBEY, 1986). Porém, com o objetivo de
6 determinar a ocorrência no rebanho de co-infecção entre esses protozoários e buscar uma
7 associação com os problemas reprodutivos encontrados, as amostras positivas para *N.*
8 *caninum* pelo ELISA foram testadas para anticorpos anti-*T. gondii* pela mesma técnica. Não
9 foram encontrados animais soropositivos para *N. caninum* e *T. gondii*, simultaneamente.
10 Diferente do encontrado por Ogawa et al. (2005) onde 4 animais e, Costa et al. (2001) onde
11 54 animais foram soropositivos para ambos os parasitas, em propriedades rurais nos estados
12 do Paraná, São Paulo e Minas Gerais. Cabral et al. (2013) ao não encontrar DNA para *T.*
13 *gondii* em fetos abortados com lesões sugestivas de protozoários, sugere que apesar dos
14 abortos em bovinos não serem frequentemente correlacionado com *T. gondii*, sua investigação
15 é tão importante quanto para outros agentes infecciosos.

16

17

CONCLUSÕES

18 Não houve correlação estatística entre soropositividade para *Neospora caninum* e
19 perdas reprodutivas até os 60 dias de gestação, nesse estudo.

20

21

AGRADECIMENTOS

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

24

25

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1
- 2 AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; RODRIGUES, A. A.; LABRUNA, M. B.;
- 3 CAMARGO, L. M.; CAMARGO, E. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of anti-*Neospora*
- 4 *caninum* in cattle and dogs from western Amazon, Brazil, in association with some possible
- 5 risk factors. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 142, n. 1-2, p. 71-77, 2006.
- 6
- 7 ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle.
- 8 **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61, n. 2, p. 417-431, 2000.
- 9
- 10 ANDREOTTI, R.; BARROS, J. C.; PEREIRA, A. R.; OSHIRO, L. M.; CUNHA, R. C.;
- 11 FIGUEIREDO NETO, L. F. Association between seropositivity for *Neospora caninum* and
- 12 reproductive performance of beef heifers in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil.
- 13 **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 2, p. 119-123, 2010.
- 14
- 15 BENETTI, A. H.; SCHEIN, F. B.; SANTOS, T. R.; TONIOLLO, G. H.; COSTA, A. J.;
- 16 MINEO, J. R.; LOBATO, J.; SILVA, D. A. O.; GENNARI, S. M. Pesquisa de anticorpos
- 17 anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais da região Sudoeste
- 18 do Estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.
- 19 18, n. 1, p. 29-33, 2009.
- 20
- 21 BJÖRKMAN, C.; GONDIM, L. F. P.; NÄSLUND, K.; TREES, A. J.; MCALLISTER, M.
- 22 IgG avidity pattern in cattle after ingestion of *Neospora caninum* oocysts. **Veterinary**
- 23 **Parasitology**, Amsterdam, v. 128, p. 195–200, 2005.
- 24

1 BJÖRKMAN, C.; HOLMDAHL, O. J. M.; UGGLA, A. An indirect enzyme-linked
2 immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and
3 milk of cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 68, p. 251–260, 1997.
4

5 BJÖRKMAN, C.; MCALLISTER, M. M.; FRÖSSLING, J.; NÄSLUND, K.; LEUNG, F.;
6 UGGLA, A. Application of the *Neospora caninum* IgG avidity ELISA in assessment of
7 chronic reproductive losses following an outbreak of neosporosis in a herd of beef cattle.
8 **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia MO, v. 15, p. 3–7, 2003.
9

10 BJÖRKMAN, C.; NÄSLUND, K.; STENLUND, S.; MALEY, S. W.; BUXTON, D.;
11 UGGLA, A. An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora*
12 *caninum* infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia MO, v. 11, p.
13 41-44, 1999.
14

15 BUXTON, O.; CALDOW, G. L.; MALEY, S. W. Neosporosis and bovine abortion in
16 Scotland. **Veterinary Record**, Londres, v. 141, p. 649-651, 1997.
17

18 CABRAL, A. D.; CAMARGO, C. N.; GALLETI, L. H.; OKUDA, E. M.; PITUCO, C.; DEL
19 FAVA, C. Screening for *Toxoplasma gondii* in aborted bovine fetuses in Brazil. **Arquivos do**
20 **Instituto Biológico**, São Paulo, v.80, p.103-105, 2013.
21

22 CONRAD, P. A.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M.; ROWE, J.; BONDURANT, R.;
23 TUTER, G.; BREITMEYER, R.; PALMER, C.; THURMOND, M.; ARDANS, A.; DUBEY,
24 J. P.; DUHAMEL, G.; BARR, B. Detection of serum antibody responses in cattle with natural

1 or experimental Neospora infections. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**,
2 Columbia MO, v. 5, p. 572-578, 1993.

3

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

7

8 COSTA, G. H. N.; CABRAL, D. D.; VARANDAS, N. P.; SOBRAL, E. A.; BORGES, F. A.;
9 CASTAGNOLLI, K. L. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma*
10 *gondii* em soros de bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Semina:**
11 **Ciencias Agrárias**, Londrina, v. 22, n. 1, p. 61-66, 2001.

12

13 DE MELO, C. B.; LEITE, R.C.; LOBATO, Z. I.; LEITE, R. C. Infection by *Neospora*
14 *caninum* associated with bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in cattle from
15 Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 119, n. 2-3, p. 97-105,
16 2004.

17

18 DUBEY, J.P. A review of toxoplasmosis in cattle. **Veterinary Parasitology**, v.22, n.3/4,
19 p.177-202, 1986.

20

21 DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Korean Journal**
22 **Parasitology**, Seoul, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2003.

23

24 DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERKAS, I.; BJÖRKMAN, C.; BLAGBURN,
25 B. L.; BOWMAN D. D.; BUXTON D.; ELLIS, J. T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL A.;

1 HILL D. E.; HOWE D. K.; JENKINS, M. C.; KOBAYASHI Y.; KOUDELA, B.; MARSH,
2 A. E.; MATTSSON J. G.; MCALLISTER, M. M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L.
3 D.; SPEER, C. A.; TREES, A. J.; UGGLA, A.; UPTON, S. J.; WILLIAMS, D. J.; LINDSAY,
4 D. S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia.
5 **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 32, p. 929-946, 2002.
6
7 DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; ADAMS, D. S.; MCALLISTER, M. M.; ANDERSON-
8 SPRECHER, R.; BASZLER, T. V.; KWOK, O. C.; LALLY, N. C.; BJÖRKMAN, C.;
9 UGGLA, A. Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by
10 indirect fluorescent antibody test and different enzyme-linked immunosorbent assays. **Journal**
11 **of Parasitology**, Lawrence KS, v. 83, n. 6, p. 1063-1069, 1997.
12
13 DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary**
14 **Parasitology**, Amsterdam, v. 67, p. 1-59, 1996.
15
16 DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; ADAMS, D. S.; GAY, J. M.; BASZLER, T. V.;
17 BLAGBURN, B. L.; THULLIEZ, P. Serologic responses of cattle and other animals infected
18 with *Neospora caninum*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.57, p.329-
19 336, 1996.
20
21 DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of Bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**,
22 Amsterdam, v. 140, p. 1-34, 2006.
23
24 DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals-The last five years. **Veterinary**
25 **Parasitology**, Amsterdam, v. 180, p. 90-108, 2011.

1

2 FRÖSSLING, J.; UGGLA, A.; BJÖRKMAN, C. Prevalence and transmission of *Neospora*
3 *caninum* within infected Swedish dairy herds. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 128, p.
4 209–218, 2005.

5

6 GENNARI, S. M. *Neospora caninum* no Brasil, situação atual da pesquisa. **Revista**
7 **Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 13, suplemento 1, p. 23-28, 2004.

8

9 GHANEM, M. E.; SUZUKI, T.; AKITA, M.; NISHIBORI, M. *Neospora caninum* and
10 complex vertebral malformation as possible causes of bovine fetal mummification. **Canadian**
11 **Veterinary Journal**, Ottawa, v.50, p. 389-92, 2009.

12

13 GONDIM, L. F. P.; SARTOR, I. F.; HASEGAWA, M.; YAMANE I. Seroprevalence of
14 *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, n.
15 86, n. 1, p. 71-75, 1999.

16

17 HASEGAWA, M. Y.; SARTOR, I. F.; CANAVESSI, A. M. O.; PINCKNEY, R. D.
18 Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in beef cattle and in farm dogs from Avaré
19 Region of São Paulo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 1, p. 45-50,
20 2004.

21

22 INNES, E. A. The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora*
23 *caninum*. **Parasitology**, Londres, v. 134, p. 1903-1910, 2007.

24

1 JULIANO, R. S. **Aspectos sanitários e do sistema de fagócitos de bovinos da raça**
2 **Curraleiro**. 2006, 125p. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de
3 Goiás, Goiás, 2006.

4

5 STENLUND, S. **Neospora caninum in cattle in Sweden: Isolation of the parasite and**
6 **studies of its transmission**. 2000, 40p. Tese (Doutorado) – Faculty of Veterinary Medicine,
7 Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 2000.

8

9 JUSTO, R. V.; MANFIO, J. B.; GALHARDO, J. A.; GARCIA, J. L.; CAMPOS, A. K.
10 Inquérito soro-epidemiológico sobre neosporose bovina no norte do estado de Mato Grosso,
11 Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, suplemento 2, p. 3897-3902, 2013.

12 .

13 KAMGA-WALADJO, A. R.; GBATI, O. B.; KONE, P.; LAPO, R. A.; CHATAGNON, G.;;
14 BAKOU, S. N.; PANGUI, L. J.; DIOP PEL, H.; AKAKPO, J. A.; TAINTURIER, D.
15 Seroprevalence of Neospora caninum antibodies and its consequences for reproductive
16 parameters in dairy cows from Dakar-Senegal, West Africa. **Tropical Animal Health and**
17 **Production**, Edinburgh, v. 9, p. 953-959, 2010.

18

19 LANDIS, J. R; KOCH, G. G. **The measurement of observer agreement for categorical**
20 **data**. *Biometrics*, Arlington, v. 33, n. 1, p. 159-174, 1977.

21

22 LANGONI, H.; SILVA, A. V.; KATAGIRI, S.; CAGNINI, F.; RIBEIRO, C. M. Avaliação
23 sorológica para Neospora caninum em propriedades de bovinos leiteiros com alterações
24 reprodutivas. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 20, p.124-130, 2013.

25

1 LINDSAY, D. S.; STEINBERG, H.; DUBIELZIG, R. R.; SEMRAD, S. D.; KONKLE, D.
2 M.; MILLER, P. E.; KONKLE, D. M.; MILLER, P. E.; BLAGBURN, B. L. Central nervous
3 system neosporosis in a foal. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.
4 8, n. 4, p. 507-510, 1996.

5

6 LÓPEZ-GATIUS, F.; PABÓN, M.; ALMERÍA S. *Neospora caninum* infection does not
7 affect early pregnancy in dairy cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 62, p. 606-13, 2004.

8

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

13

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

17

18 MARQUES, V. B.; BERTAN, C. M.; ALMEIDA, A. B.; MEIRELLES, F. V.; PAPA, P. C.;
19 BINELLI, M. Interferon-tau and pregnancy recognition in cattle. **Revista Brasileira de**
20 **Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, p. 479-88, 2007.

21

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

1

2 OGAWA, L.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O.; GONDIM, L. F. P.; NAVARRO, I. T.

3 Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from

4 the northern region of the Paraná State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**

5 **e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 3, p. 312-316, 2005.

6

7 PITEL, P. H.; ROMAND, S.; PRONOST, S.; FOUCHER, N.; GARGALA, G.; MAILLARD,

8 K. Investigation of *Neospora* sp. antibodies in aborted mares from Normandy, France.

9 **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 118, p. 1-6, 2003.

10

11 PITUCO, E. M.; SOARES, J. A. G.; OKUDA, L. H.; STEFANO, E. Ocorrência de

12 neosporose bovina em rebanhos com histórico de abortamento no Brasil. **Arquivos do**

13 **Instituto Biológico**, São Paulo, v. 65, n. 1, p. 70, 1998.

14

15 RAGOZO, A. M. A.; PAULA, V. S. O.; SOUZA, S. L. P.; BERGAMASCHI, D. P.;

16 GENNARI, S. M. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos

17 procedentes de seis estados brasileiros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**,

18 Jaboticabal, v. 12, n. 1, p. 33-37, 2003.

19

20 ROSSI, G. F.; CABRAL, D. D.; RIBEIRO, D. P.; PAJUABA, A. C. A. M.; CORRÊA, R. R.;

21 MOREIRA, R. Q. Evaluation of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in

22 sheep from Uberlândia, Minas Gerais State, Brazil, by different serological methods.

23 **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 175, p. 252-259, 2011.

24

1 SAGER, H.; GLOOR, M.; BJÖRKMAN, C.; KRITZNER, S.; GOTTSTEIN, B. Assessment
2 of antibody avidity in aborting cattle by a somatic *Neospora caninum* tachyzoite antigen IgG
3 avidity ELISA. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 112, p. 1–10, 2003.
4

5 SARTOR, I. F.; HASEGAWA, M. Y.; CANAVESSI, A. M. O.; PINCKNEY, R. D.
6 Occurrence of *Neospora caninum* antibody in dairy cows assayed by ELISA and IFAT from
7 Avaré county, SP. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 3-10, 2003.
8

9 SARTOR, I. F.; GARCIA-FILHO, A.; VIANNA, L. C.; PITUCO, E. M.; DALPAI, V.;
10 SARTOR, R. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros e de
11 corte da região de Presidente Prudente, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.
12 72, n. 4, p. 413-418, 2005.
13

14 SILVA, D. A.; LOBATO, J.; MINEO, T. W.; MINEO, J. R. Evaluation of serological tests
15 for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and
16 inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**,
17 Amsterdam, v. 143, n. 3-4, p. 234-244, 2007.
18

19 STOBBE, N. S. **Estudo interativo entre a presença de anticorpos anti-Neospora caninum**
20 **e a ocorrência de abortamentos em bovinos no noroeste do Estado de São Paulo**. 1999,
21 44p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de
22 São Paulo, São Paulo, 1999.
23

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

4

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

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

1 **Tabelas**

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)

2

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

3

4