

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA
DA TRANSMISSÃO VERTICAL DE *NEOSPORA CANINUM* NOS
REBANHOS BOVINOS CURRALEIRO E PANTANEIRO**

Marcelo Sales Guimarães
Orientadora: Andréa Caetano da Silva

GOIÂNIA

2011

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Marcelo Sales Guimarães				
E-mail:	marsalvet@gmail.com				
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim ☐ Não					
Vínculo empregatício do autor	Fiscal Estadual Agropecuário - Agrodefesa				
Agência de fomento:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior			Sigla:	CAPES
País:	Brasil	UF:	Goiás	CNPJ:	00889834/0001-08
Título:	DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DA TRANSMISSÃO VERTICAL DE NEOSPORA CANINUM NOS REBANHOS BOVINOS CURRALEIRO E PANTANEIRO				
Palavras-chave:	Raças locais, transmissão transplacentária, neosporose bovina, imunofluorescência indireta, ELISA				
Título em outra língua:	SEROLOGICAL DIAGNOSIS AND EVALUATION OF OCCURRENCE OF VERTICAL TRANSMISSION OF NEOSPORA CANINUM IN CURRALEIRO AND PANTANEIRO CATTLE				
Palavras-chave em outra língua:	Local breeds, transplacental transmission, bovine neosporosis, indirect immunofluorescence, ELISA				
Área de concentração:	Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos				
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	24/02/2011				
Programa de Pós-Graduação:	Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal				
Orientadora:	Profa. Dra. Andréa Caetano da Silva – IPTSP/UFG				
E-mail:	andrea@iptsp.ufg.br				
Co-orientadora: *	Dra. Débora Pereira Garcia Melo – PNPD/EVZ/UFG				
E-mail:	dpgvet@hotmail.com				
Co-orientador: *	Prof. Dr. Abraão Garcia Gomes – IPTSP/UFG				
E-mail:	gomesag@uol.com.br				

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ ☒ **total** ☐ **parcial**

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

☐ Capítulos. Especifique: _____ ☐ Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.


 Marcelo Sales Guimarães

Goiânia, 24 de junho de 2011

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

MARCELO SALES GUIMARÃES

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA
DA TRANSMISSÃO VERTICAL DE *NEOSPORA CANINUM* NOS
REBANHOS BOVINOS CURRALEIRO E PANTANEIRO**

Dissertação apresentada para obtenção
do grau de Mestre em Ciência Animal
junto à Escola de Veterinária e Zootecnia
da Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:

Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia
de Alimentos

Orientadora:

Profa. Dra. Andréa Caetano da Silva – IPTSP/UFG

Comitê de orientação:

Dra. Débora Pereira Garcia Melo – PNPd/EVZ/UFG

Prof. Dr. Abraão Garcia Gomes – IPTSP/UFG

GOIÂNIA

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG

Guimarães, Marcelo Sales.
G963d Diagnóstico sorológico e avaliação da ocorrência da transmissão vertical de *Neospora caninum* nos rebanhos bovinos Curraleiro e Pantaneiro [manuscrito] / Marcelo Sales Guimarães. - 2011.
xiv, 105 f. : il., figs., tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréa Caetano da Silva; Co-orientadores: Dr^a. Débora Pereira Garcia Melo e Dr. Abraão Garcia Gomes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2011.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, tabelas e quadros.

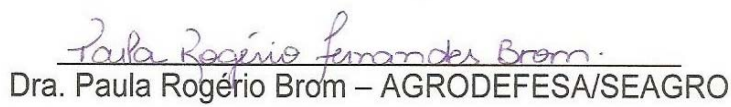
1. Neosporose bovina 2. IFI/ELISA – Diagnóstico 3. *Neospora caninum* – Transmissão transplacentária 4. Raças locais – Curraleiro e Pantaneiro I. Título.

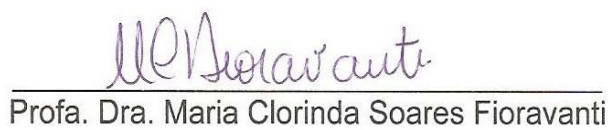
CDU: 619:616:636.2

MARCELO SALES GUIMARAES

Dissertação defendida e aprovada em **24/02/2011**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:


Profa. Dra. Andréa Caetano da Silva
(ORIENTADOR (A))


Dra. Paula Rogério Brom – AGRODEFESA/SEAGRO


Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti

A quem me abriu portas e mostrou caminhos, capazes de renunciar aos próprios sonhos para que eu possa realizar os meus. Onde eu encontro amor verdadeiro e segurança: meu pai Sérgio e minha mãe Ilná.

Dedico

AGRADECIMENTOS

“Gratidão é uma sensação tão agradável... Cresce onde sementes são lançadas, floresce sob o sol. De um coração caloroso e bom, cresce mais quando é cuidada. Quase todos temos motivos para a gratidão, quando pessoas em nossas vidas têm tempo para partilhar e nos fazer saber por bons atos que nós estamos em seus pensamentos e que elas se importam.”

Ao Pai, pela oportunidade de mais uma conquista, me concedendo coragem para seguir, mesmo diante dos desafios encontrados pelo caminho árduo. Obrigado meu Deus, por colocar em minha vida tantas pessoas amigas.

À minha família, em especial meus pais Antonio Sérgio Gomes Guimarães e Ilná de Sousa Sales Guimarães e meu irmão Renato Sales Guimarães, por tudo que fazem e sempre fizeram por mim! Sem medo de cair em um clichê, afirmo que as palavras não conseguem expressar o quanto os amo.

À professora Dra. Andréa Caetano da Silva, amiga e orientadora. Sua confiança em minha capacidade foi de extrema importância em meu caminho para o sucesso. Obrigado por ter paciência nas minhas dúvidas, e me mostrar caminhos que sozinho não imaginaria. Fez da relação orientador-aluno uma parceria agradável que gerou (e ainda vai gerar) ótimos frutos.

À professora Dra. Lígia Miranda Ferreira Borges e ao professor Dr. Abraão Garcia Gomes, por estarem presentes nesses anos de pós-graduação, oferecendo amizade e apoio nas dúvidas (especialmente no estágio de docência).

À Dra. Débora Pereira Garcia Melo, que nestes anos me ofereceu muito mais que sua co-orientação neste trabalho. Ofereceu companheirismo, conselhos, direcionamentos e uma amizade que levarei comigo sempre.

À minha segunda família, à equipe do Centro de Parasitologia Veterinária, com quem passei bons momentos, muitos deles memoráveis. Carla Cristina Braz Louly, Paula Rogério Fernandes Brom, Vanessa Silvestre Ferreira de Oliveira, Sabrina Castilho Duarte, Sara Fernandes Soares, Lorena Alessandra Dias de Sousa, Lorena Lopes Ferreira, Carolina da Silva Barbosa, grandes amigas de sempre! Também ao meu companheiro Kennedy Kiriira Gachoka, que

junto comigo compôs a minoria masculina deste laboratório. A amizade de todos vocês tornou minha vida de pós-graduando muito mais prazerosa.

Às alunas de iniciação científica Rebeka Cristine de Bastos Costa e Ludmylla Teles Bombonate, pela valorosa ajuda nas análises sorológicas.

À professora Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti, por sua importante colaboração, disponibilizando os contatos dos criadores dos rebanhos Curraleiros.

Aos proprietários criadores dos rebanhos Curraleiros: Antonio Joaquim Matias de Paula (Fazenda Sítio Novo – Mimoso de Goiás), Hermes Ricardo Matias de Paula (Fazenda Garganta da Serra – Pilar de Goiás), João Pereira de Oliveira (Fazenda Santa Maria Nepomuceno – Porangatu/Goiás), Comunidade Quilombola Kalunga (Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga – Cavalcante/Goiás), Salviano Antonio Guimarães Borges (Fazenda Arara Fundão – Sobradinho/DF) por sua colaboração, nos recebendo em suas propriedades, disponibilizando seus animais e funcionários nas colheitas.

À Dra. Raquel Soares Juliano, pesquisadora da Embrapa Pantanal, que com sua colaboração possibilitou o estudo no rebanho Pantaneiro, colhendo e nos enviando as amostras e informações do rebanho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG, por oferecer a mim um curso de qualidade. Aos professores participantes do Programa, em especial aos da Sanidade Animal.

Aos meus colegas de pós-graduação, companheiros de disciplinas agradáveis (maioria), e outras nem tanto.

À CAPES, pelo suporte financeiro ao projeto e concessão da bolsa, tão importantes na realização do trabalho.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

Chico Xavier

“Se antes de cada ato nosso, pudéssemos prever todas as consequências dele, e pensar nelas a sério, primeiro as imediatas, depois as prováveis, depois as possíveis, depois as imagináveis, não chegaríamos sequer a mover-nos de onde o primeiro pensamento nos tivesse feito parar.”

José Saramago

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

“Completo-se uma jornada. Chegar é cair na inércia de um ponto final. Na euforia da chegada, há um convite irrecusável para uma nova partida.”

Helena Kolody

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 <i>Neospora caninum</i>	4
2.1.1 Histórico e situação taxonômica	4
2.1.2 Características estruturais e biológicas	5
2.1.3 Neosporose bovina	11
2.1.4 Diagnóstico da neosporose bovina	23
2.1.5 Importância econômica	31
2.1.6 Estratégias de controle	32
2.2 Raças bovinas locais	34
2.2.1 Bovino Curraleiro	35
2.2.2 Bovino Pantaneiro	37
3 OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo geral	40
3.2 Objetivos específicos	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Local e período de realização do estudo	41
4.2 Animais envolvidos no estudo	41
4.3. Colheita de amostras	42
4.4 Detecção de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i>	42
4.5 Avaliação da transmissão vertical	44
4.6 Tratamento estatístico dos dados	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 Características dos rebanhos	47
5.2 Ocorrência de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i>	48

5.3 Avaliação da transmissão vertical	55
5.4 Associação entre títulos das fêmeas e ocorrência de transmissão vertical....	60
5.5 Associação entre raça e ocorrência de transmissão vertical.....	61
5.6 Nível de concordância entre as técnicas sorológicas	63
6 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Formas biológicas de <i>N. caninum</i> . (A) Taquizoítos no interior de vacúolo parasitóforo (Pv) em cultura de fibroblastos de pele humana (linhagem HS68). Taquizoíto no citoplasma da célula hospedeira sem vacúolo visível (seta). (B) Cisto tissular em cérebro de gerbil experimentalmente infectado, 99 dias p.i., com destaque para espessura da parede cística (cabeças de seta) (DUBEY et al., 2002). (C) Oocisto não esporulado, com massa central. (D) Oocisto esporulado com dois esporocistos (seta), e contendo esporozoítos (cabeças de seta) (McALLISTER et al., 1998).....	7
FIGURA 2 – Ciclo biológico de <i>Neospora caninum</i>	10
FIGURA 3 – Animais da raça Curraleiro.	37
FIGURA 4 – Animais da raça Pantaneiro (JULIANO et al., 2007b).	39
FIGURA 5 – Reação de imunofluorescência indireta para anticorpos anti- <i>N. caninum</i> em soro bovino. (A) Reação positiva, apresentando fluorescência consistente em toda a superfície do taquizoíto (40x). (B) Reação negativa (40x).	43
FIGURA 6 – Placa de ELISA indireto. Em A1 e A2, controles negativos; em A3 e A4, controles positivos. Amostras positivas apresentam coloração azul escuro.	44
FIGURA 7 – Títulos de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> obtidos por imunofluorescência indireta (título $\geq$ 1:200) em bovinos das raças Curraleiro e Pantaneiro, provenientes de unidades de criação em Goiás e Mato Grosso do Sul, respectivamente, 2010.....	55

LISTA DE TABELAS E QUADROS

QUADRO 1 – Levantamento de soroprevalências para anticorpos anti- <i>N. caninum</i> em bovinos no território nacional, de acordo com unidade federativa, aptidão de produção dos animais, técnica utilizada e referência consultada	13
TABELA 1 – Ocorrência de anticorpos anti- <i>N. caninum</i> em bovinos Curraleiros e Pantaneiros, provenientes de unidades de criação em Goiás e Mato Grosso do Sul, respectivamente, realizada por imunofluorescência indireta (título $\geq 1:200$) e ELISA (S/P $\geq 0,50$), 2010	49
TABELA 2 – Ocorrência de anticorpos anti- <i>N. caninum</i> por propriedade avaliada, em bovinos Curraleiros e Pantaneiros, provenientes de unidades de criação em Goiás e Mato Grosso do Sul, respectivamente, realizada por imunofluorescência indireta (título $\geq 1:200$) e ELISA (S/P $\geq 0,50$), 2010	49
TABELA 3 – Ocorrência de transmissão vertical de <i>N. caninum</i> em bovinos Curraleiros e Pantaneiros, provenientes de unidades de criação em Goiás e Mato Grosso do Sul, respectivamente, 2010	56
TABELA 4 – Ocorrência de transmissão vertical de <i>N. caninum</i> em bovinos Curraleiros, provenientes de unidades de criação em Goiás, 2010	57
TABELA 5 – Ocorrência de transmissão vertical de <i>N. caninum</i> em bovinos Pantaneiros, provenientes de unidade de criação em Mato Grosso do Sul, 2010	57
TABELA 6 – Associação entre título de anticorpos maternos anti- <i>N. caninum</i> e ocorrência de transmissão vertical em bovinos Curraleiros e Pantaneiros, provenientes de unidades de criação em Goiás e Mato Grosso do Sul, respectivamente, 2010	60
TABELA 7 – Comparação entre título de anticorpos na IFI e positividade no teste de ELISA em soros de bovinos Curraleiros, provenientes de unidades de criação em Goiás, 2010	65

LISTA DE ABREVIATURAS

BVDV	<i>Bovine Viral Diarrhea Virus</i> (vírus da Diarréia Viral Bovina)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
D.O.	Densidade óptica
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio Imunoenzimático de Adsorção em Fase Sólida)
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> (isotiocianato de fluoresceína)
IBR	<i>Infectious Bovine Rhinotracheitis</i> (Rinotraqueíte Infecciosa Bovina)
IC	Intervalo de confiança (CI, em inglês)
IFI	Imunofluorescência Indireta
IL	Interleucina
INF γ	Interferon-Gamma
κ	Índice Kappa
kDa	Quilodalton
NK	Células <i>Natural Killer</i>
OR	Intervalo de Odds Ratio
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Solução Salina Tamponada Fosfatada)
p.i.	Pós-inoculação
TCD4 ⁺ /Th	Linfócitos T auxiliares
TCD8 ⁺	Linfócitos T citotóxicos
TGF β	<i>Transforming Growth Factor beta</i> (Fator Transformador de Crescimento beta)
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> (Fator de Necrose Tumoral alfa)
χ^2	Qui-quadrado

RESUMO

A neosporose bovina é uma enfermidade parasitária causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Neospora caninum* (filo Apicomplexa, família Sarcocystidae), formador de cistos. Enfermidade de distribuição cosmopolita, a neosporose apresenta forte associação com o abortamento bovino, sendo *N. caninum* considerado o protozoário mais importante para essa espécie. A principal rota de transmissão é a vertical determinando a neosporose do tipo endêmica nos rebanhos. Raças locais brasileiras como o gado Curraleiro e Pantaneiro apresentam como características preponderantes a rusticidade e resistência às condições adversas tais como carência nutricional e desafios microbiológicos. O programa de conservação destas raças incentivou estudos que visam o maior conhecimento das particularidades destes animais. A proposta deste trabalho foi avaliar a soropositividade destas raças para *N. caninum* e a ocorrência de transmissão vertical nos rebanhos, permitindo determinar a importância da neosporose bovina nestes rebanhos. Cinco propriedades criadoras de Curraleiro (estado de Goiás) e uma criadora de Pantaneiro (estado de Mato Grosso do Sul) foram acompanhadas. Foi colhido sangue das fêmeas em idade reprodutiva e de suas crias antes da ingestão do colostro, quando possível. Quando não, foi colhido sangue das crias periodicamente (cinco colheitas) até em torno dos dez meses de idade. Um total de 358 animais foi analisado, sendo 249 (198 fêmeas e 51 bezerras) Curraleiros e 109 (62 fêmeas e 47 bezerras) Pantaneiros. Avaliou-se a soropositividade para *N. caninum* por meio das técnicas de imunofluorescência indireta (ponto de corte $\geq 1:200$) e ELISA indireto (HerdChek® IDEXX Laboratories) (ponto de corte S/P $\geq 0,50$). A ocorrência total de soropositivos foi 47,49% (170/358), com 51% (127/249) do gado Curraleiro e 39,45% (43/109) do gado Pantaneiro soropositivo. Cem por cento das propriedades acompanhadas apresentaram animais positivos. O maior título encontrado foi de 1:25600. A taxa de transmissão vertical geral observada nos rebanhos foi de 51% (95%, IC 37%-64%), sendo de 48% (95%, IC 30%-66%) no gado Curraleiro e de 54% (95%, IC 35%-73%) no Pantaneiro. Não houve associação estatisticamente significativa entre título ou raça das mães e ocorrência de transmissão vertical (OR 0,79; IC 0,27-2,34 95%). Uma concordância moderada-baixa foi verificada entre as duas técnicas de diagnóstico utilizadas ($\kappa = 0,34$). Assim, *N. caninum* está presente nos rebanhos bovinos das raças Curraleiro e Pantaneiro, com consideráveis taxas de soropositividade e transmissão vertical. Embora amplamente distribuído, *N. caninum* parece não representar problema nos rebanhos Curraleiro e Pantaneiro, visto que problemas de abortamento são raros e as fêmeas apresentam boa fertilidade, dentro das limitações das raças.

Palavras-chave: raças locais, transmissão transplacentária, neosporose bovina, imunofluorescência indireta, ELISA

ABSTRACT

Bovine neosporosis is a parasitic disease of cosmopolitan distribution, caused by the obligatory intracellular cyst forming protozoan *Neospora caninum* (Phylum Apicomplexa, family Sarcocystidae). It has a strong association with bovine abortion, being *N. caninum* protozoan considered the most important for this species. The main route of transmission is vertical, determining the endemic-type neosporosis in cattle. Brazilian local breeds as Curraleiro and Pantaneiro present hardiness and resistance to adverse conditions, e.g. poor nutrition and microbiological challenges, as predominant characteristics. The conservation program of such breeds has encouraged studies aiming at a greater knowledge of these animals' peculiarities. The purpose of this study was to assess the seroprevalence of these breeds for *N. caninum* and the occurrence of vertical transmission in herds, evaluating the importance of bovine neosporosis for these herds. Five farms in the state of Goiás and one in the state of Mato Grosso do Sul, with Curraleiro and Pantaneiro herds, respectively, were observed. Blood was collected from females at reproductive age and their offspring before colostrum intake, if possible. If it was not possible, blood was periodically collected from the offspring (five collections) until about ten months of age. A total of 358 animals was examined, 249 (198 females and 51 calves) Curraleiros and 109 (62 females and 47 calves) Pantaneiros. Seropositivity to *N. caninum* was evaluated by using the indirect immunofluorescence (cutoff $\geq 1:200$) and ELISA (HerdChek[®] IDEXX Laboratories) (cutoff S/P ≥ 0.50). The total incidence of seropositives was 47,49% (170/358), 51% (127/249) Curraleiro and 39,45% (43/109) Pantaneiro. One hundred percent of the farms observed presented seropositive animals. The highest titer was 1:25600. The overall vertical transmission rate observed in herds was 51% (95%, CI 37%-64%), being 48% (95%, CI 30%-66%) in Curraleiro and 54% (95%, CI 35%-73%) in Pantaneiro. There was no statistically significant association between breed or titer of the cows and the occurrence of vertical transmission (OR 0,79; CI 0,27-2,34 95%). A low-moderate agreement was found between the two diagnostic techniques used ($\kappa = 0.34$). Thus, *N. caninum* is present in Curraleiro and Pantaneiro cattle breeds, with significant rates of seropositivity and vertical transmission. Although widely distributed, *N. caninum* does not seem to cause problems in Curraleiro and Pantaneiro herds, as abortion problems are rare and females have good fertility, within the constraints of the breed.

Keywords: local breeds, transplacental transmission, bovine neosporosis, indirect immunofluorescence, ELISA

1 INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário coccídio, intracelular obrigatório, do filo Apicomplexa e família Sarcocystidae. Foi primeiramente identificado e isolado de cão doméstico, um de seus hospedeiros definitivos, que apresentou sintomatologia neuromuscular. Entretanto, por provocar maiores danos à espécie bovina, especialmente no campo reprodutivo, os estudos têm se concentrado nesta espécie, no intuito de ampliar o conhecimento acerca deste parasito, principalmente sob aspectos de patogenia, virulência, infectividade, diversidade genética, dentre outros.

Paralelamente, estudos de prevalência são conduzidos em diversas partes do mundo, revelando o caráter cosmopolita da distribuição de *N. caninum* nos rebanhos. Trabalhos focando a epidemiologia do parasito nos bovinos concluíram que as taxas de soropositividade sofrem influências diversas, desde o tipo de manejo adotado até a presença ou não do hospedeiro definitivo na propriedade.

Este último fator chama a atenção para outra característica da neosporose bovina: suas variadas formas de transmissão. Desde a identificação do cão doméstico como primeiro hospedeiro definitivo, capaz de eliminar oocistos nas fezes e contaminar o ambiente, identificou-se a forma horizontal de transmissão, que consiste na ingestão por parte dos hospedeiros intermediários, do oocisto maduro (esporulado) do parasito, a exemplo de outros indivíduos do mesmo filo. Entretanto, foi observado por estudiosos que, mesmo onde não é identificada a presença de hospedeiro definitivo, sugerindo que a transmissão horizontal não ocorra, altas taxas de soropositividade são observadas. Este fato chamou a atenção para outra via de transmissão: a via vertical, caracterizada pela exposição intra-uterina do feto ao parasito. A importância desta via é tamanha que é considerada o principal modo de manutenção da enfermidade no rebanho bovino.

Assim, a avaliação desta rota de transmissão dentro do rebanho passou a ser importante para o conhecimento do status de infecção de uma população bovina. A partir desses estudos, outros fatores de risco associados à neosporose bovina foram identificados, como a reposição de rebanho com

fêmeas da própria fazenda, sem o devido monitoramento sorológico destes animais. Foi possível então a adoção de estratégias de controle que visam, não somente a interrupção da via horizontal, mas também a quebra da transmissão de mãe para filho.

Mais recentemente, diante da identificação de animais silvestres como hospedeiros naturais de *N. caninum*, foi questionada a existência de um ciclo silvestre, e que este provavelmente interfere na soroepidemiologia nos rebanhos domésticos. Estudos nesta área têm reforçado a teoria da existência deste ciclo silvestre da neosporose, porém sua interferência nos bovinos domésticos permanece não esclarecida.

Apesar de todo o conhecimento acumulado sobre *N. caninum* e a neosporose bovina, muito ainda precisa ser estudado. Em diversas partes do mundo, se desconhece a real situação dos animais em relação ao parasito (nível de soropositividade e transmissão vertical, além de prejuízos na esfera reprodutiva). Mesmo onde a enfermidade é bem estudada, como é o caso do Brasil, em populações específicas de bovinos os dados são escassos e insuficientes para a determinação do impacto da enfermidade. Rebanhos de raças locais, como o Curraleiro e o Pantaneiro são exemplos.

As raças bovinas locais, trazidas ao continente americano pelos colonizadores, sofreram ao longo das décadas cruzamentos não controlados e seleção ambiental que resultaram em animais extremamente adaptados às particularidades edafoclimáticas de biomas brasileiros. Apresentam como características preponderantes a rusticidade e resistência às condições adversas tais como carência nutricional e desafios microbiológicos. Criadores ressaltam que estes animais são de fácil criação, sendo baixas as ocorrências de problemas sanitários. Por esse motivo, são ideais para a criação em sistema familiar, requerendo menor investimento por parte do criador, indicadas para muitas das propriedades rurais brasileiras. Mesmo diante destas vantagens, estas raças estão ameaçadas de extinção, devido à busca de indivíduos mais produtivos (especializados). Assim, reconhecida a importância dos animais de raças locais brasileiras, núcleos de conservação foram implantados visando impedir o seu desaparecimento.

Com os objetivos de conservação e utilização desses animais, adaptados e indicados aos biomas da região Cento-Oeste, diversos projetos foram e estão sendo desenvolvidos, destacando-se “Raças bovinas naturalizadas: uma alternativa para o desenvolvimento sustentável de Cerrado e Pantanal”, “Preservação e Utilização do Gado Curraleiro e Pantaneiro” e “Caracterização, Conservação e Uso das Raças Bovinas Locais Brasileiras: Curraleiro e Pantaneiro”, desenvolvidos por uma rede multidisciplinar e interinstitucional de pesquisadores, gerando dissertações e teses e envolvendo também criadores destas raças.

Neste cenário está inserida a proposta deste trabalho, que pretendeu avaliar a soropositividade destas raças para *N. caninum* e a ocorrência de transmissão vertical nos rebanhos. Estão aqui apresentados dados obtidos no acompanhamento realizado em cinco propriedades criadoras da raça Curraleiro no estado de Goiás e da propriedade Nhumirim, pertencente à Embrapa Pantanal, que é um núcleo de conservação da raça Pantaneiro, no estado de Mato Grosso do Sul.



2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Neospora caninum*

2.1.1 Histórico e situação taxonômica

A primeira descrição de um agente, identificado como protozoário esporozoário e formador de cistos, associado com lesões no sistema nervoso central e musculatura esquelética de cães ocorreu na Noruega, no ano de 1984. BJERKÄS et al. (1984) identificaram um parasito coccídio, estruturalmente semelhante ao *Toxoplasma gondii* e *Besnoitia*. Porém os animais acometidos não apresentaram anticorpos ao *Toxoplasma*, levantando a possibilidade de tratar-se de um novo parasito.

Anos mais tarde, DUBEY et al. (1988a) relataram nos Estados Unidos, a ocorrência de cães com quadro clínico de meningoencefalomielite e miosite, acometidos por um parasito que, embora semelhante ao *Toxoplasma*, apresentava claras diferenças estruturais e antigênicas. Indicaram a criação de um novo gênero e espécie para denominar este agente, surgindo então *Neospora caninum*. Nesse mesmo ano, DUBEY et al. (1988b) isolaram *N. caninum* em cultura de células e em camundongos, a partir de tecidos de cães jovens que apresentavam paresia de membros, sendo este o primeiro isolado do parasito.

No ano seguinte, também nos Estados Unidos, um novo relato contribuiu para elucidar o ciclo biológico de *N. caninum*, indicando um novo hospedeiro susceptível. DUBEY et al. (1989) identificaram o protozoário como causador de mielite em bezerros recém nascidos, com consequente paralisia. Foi ainda no ano de 1989 que o parasito foi responsabilizado por causar desordens na esfera reprodutiva, diferentemente dos danos neuromusculares identificados até então. THILSTED & DUBEY (1989), no Novo México, apontaram *N. caninum* como causador de abortamentos e mortalidade neonatal em bovinos, fato que chamou a atenção para a importância deste parasito como agente de perdas na produção, resultando em grande impacto econômico.

A importância econômica de *N. caninum* foi reafirmada no momento em que este foi relatado como principal agente causador de abortamentos em rebanhos de exploração leiteira na Califórnia (ANDERSON et al., 1991; BARR et al., 1991).

DUBEY et al. (1992) relataram pela primeira vez, por meio de infecção experimental, a capacidade de transmissão vertical de *N. caninum* em bovinos da raça Jersey. No ano seguinte, foi descrita a obtenção do primeiro isolado de origem bovina, a partir de tecido nervoso de dois fetos bovinos abortados (CONRAD et al., 1993a).

No Brasil, a primeira identificação de *N. caninum* foi feita por BRAUTIGAM et al. (1996), que relataram bovinos de leite e corte soropositivos nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul, respectivamente. Posteriormente, GONDIM et al. (1999a; 1999b) identificaram animais soropositivos em gado de aptidão leiteira, além de identificarem o parasito em um feto bovino abortado, com aproximadamente oito meses, oriundo de uma propriedade com histórico de abortamentos recentes.

Neospora caninum é classificado sob a seguinte ordem taxonômica: filo Apicomplexa, subfilo Sporozoa, classe Conoidasida, subclasse Coccidia, ordem Eucoccida, subordem Eimeriina, família Sarcocystidae. Dentro desta mesma família estão incluídos os gêneros *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, *Hammondia*, *Besnoitia* (DUBEY et al., 1988a; ELLIS et al., 1994; SPEER et al., 1999; MUGRIDGE et al., 2000).



2.1.2 Características estruturais e biológicas

Neospora caninum é um protozoário esporozoário, não apresentando qualquer tipo de meio de locomoção (cílios ou flagelos), exceto os microgametócitos no seu ciclo sexuado. É um parasito intracelular obrigatório, e como os demais membros do filo Apicomplexa, apresenta a característica de possuir uma estrutura denominada complexo apical na região anterior, que contém organelas como roptrias, micronemas, anéis polares e conóide,

responsáveis pelo processo de reconhecimento, adesão e invasão de maneira ativa da célula hospedeira (SPEER et al., 1999; DUBEY et al., 2002).

Uma vez executado o processo de invasão, o parasito permanece no citoplasma da célula, envolto em um vacúolo parasitóforo. Esta característica permite que se multiplique sem sofrer ação das enzimas lisossomais. A multiplicação se dá por endodiogenia, podendo cada parasito dar origem a centenas de novos organismos, ocasionando a ruptura da membrana do vacúolo e também da célula, liberando os parasitos para iniciarem novo processo de reconhecimento, adesão e invasão de outras células susceptíveis (HEMPHILL et al., 1996).

O parasito apresenta três formas biológicas básicas, com características morfológicas e metabólicas distintas, conforme a etapa do seu ciclo de vida. A primeira delas, responsável pela maior parte dos efeitos deletérios aos hospedeiros, é o taquizoíto. Este é o estágio de multiplicação rápida de *N. caninum*. Possui forma variando de ovóide, lunar ou globular e tamanho que gira em torno de sete micrômetros de comprimento por dois micrômetros de largura. Tal variação depende de o parasito estar ou não em processo de multiplicação e em qual estágio se encontra. Taquizoítos podem parasitar uma variedade de células como macrófagos, hepatócitos, fibroblastos, endotélio vascular e dos túbulos renais, miócitos e células neuronais (DUBEY & LINDSAY, 1996; SPEER et al., 1999; DUBEY et al., 2002).

A segunda forma biológica é o bradizoíto, encontrado no interior de cistos teciduais do hospedeiro. É uma forma de multiplicação desacelerada de *N. caninum*, representando um mecanismo de resistência do parasito frente a uma resposta do sistema imunológico do hospedeiro no curso da infecção (COLLANTES-FERNÁNDEZ, 2003). Apresenta forma semelhante ao taquizoíto, com tamanho em torno de oito micrômetros de comprimento por dois micrômetros de largura. Permanecem com capacidade infectante por longos períodos no interior dos cistos, apresentando resistência ao ácido clorídrico e à pepsina, indicando a necessidade da ingestão destes por um hospedeiro carnívoro para a continuação do ciclo (LINDSAY & DUBEY, 1990). Os cistos tissulares apresentam predominantemente forma oval, com cerca de 107 micrômetros de comprimento. A parede é espessa, comparativamente aos cistos de *Toxoplasma*, com

aproximadamente quatro micrômetros de largura. São encontrados principalmente em tecido do sistema nervoso e muscular estriado (DUBEY & LINDSAY, 1996; SPEER et al., 1999; DUBEY et al., 2002).

A terceira forma biológica é o esporozoíto, presente no interior dos esporocistos, que por sua vez estão dentro do oocisto. Este apresenta forma ovóide e mede cerca de doze micrômetros de comprimento. Quando maduro (esporulado), contém dois esporocistos, de forma oval e medindo cerca de seis a oito micrômetros de comprimento cada. Ambos contêm quatro esporozoítos, que têm forma alongada e medem seis micrômetros de comprimento por dois micrômetros de largura. O oocisto está presente em fezes dos hospedeiros definitivos e, quando maduro, é a forma infectante que contamina o ambiente (DUBEY et al., 2002). As formas biológicas estão exemplificadas na Figura 1.

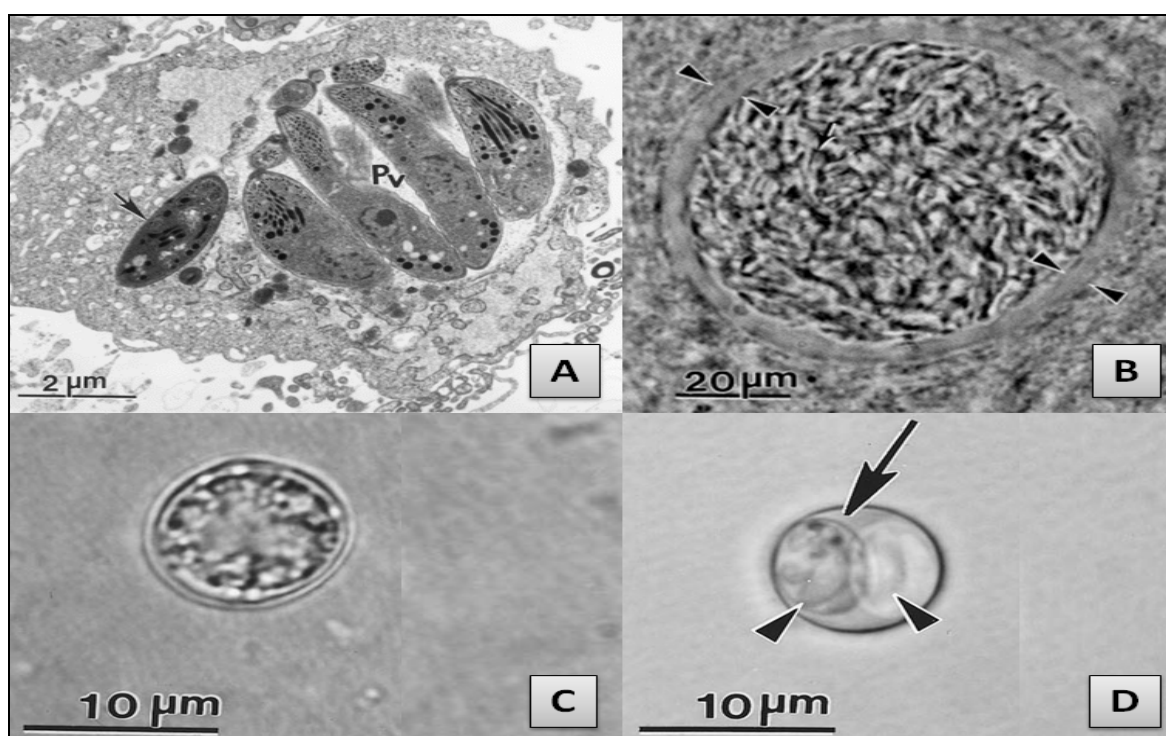


FIGURA 1 – Formas biológicas de *N. caninum*. **(A)** Taquizoítos no interior de vacúolo parasitóforo (Pv) em cultura de fibroblastos de pele humana (linhagem HS68). Taquizoíto no citoplasma da célula hospedeira sem vacúolo visível (seta). **(B)** Cisto tissular em cérebro de gerbil experimentalmente infectado, 99 dias p.i., com destaque para espessura da parede cística (cabeças de seta) (DUBEY et al., 2002). **(C)** Oocisto não esporulado, com massa central. **(D)** Oocisto esporulado com dois esporocistos (seta), e contendo esporozoítos (cabeças de seta) (McALLISTER et al., 1998).



a) Hospedeiros susceptíveis

É característica de *N. caninum* a capacidade de infectar uma variada gama de hospedeiros. Os definitivos são necessariamente carnívoros, sendo conhecidas e comprovadas quatro espécies de canídeos até o momento: o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999), o coiote (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004a), o dingo (cão silvestre australiano – *Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e o lobo cinzento (*Canis lupus*) (DUBEY et al., 2011). Quanto aos hospedeiros intermediários, além do cão e do bovino, existem relatos de infecção natural em cabra, ovelha, cavalo, búfalo, camelo, várias espécies de cervos, antílope, bisão, guaxinim, coiote, raposa, lobo, felinos selvagens, rinoceronte, roedores, lagomorfos, javali e mamíferos marinhos (ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003; DUBEY et al., 2003; DUBEY et al., 2007). Experimentalmente, foram relatadas infecções em ratos, camundongos, gerbil, gato doméstico, suíno, cão, raposa, coiote, bovinos, ovinos, caprinos, macaco rhesus e algumas espécies de aves, carnívoras ou não (ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003).

O potencial zoonótico do parasito ainda não foi completamente esclarecido. Entretanto, relatos de sorologia positiva em humanos com algum tipo de imunodeficiência ou não, associado ao fato do sucesso obtido na infecção experimental em primatas não-humanos, não permite afirmar que tal potencial não exista, sendo necessários estudos adicionais para elucidar esta questão (TRANAS et al., 1999; LOBATO et al., 2006; DUBEY et al., 2007; BENETTI et al., 2009).

b) Ciclo biológico

Neospora caninum apresenta ciclo biológico do tipo heteroxeno, com participação de hospedeiros definitivos e intermediários. Utiliza duas formas distintas de reprodução: assexuada, que acontece nos tecidos do organismo dos hospedeiros intermediários e definitivos, caracterizada pela multiplicação rápida dos taquizoítos, ou lenta dos bradizoítos; e sexuada, que embora não tenha sido

totalmente descrita, acontece no sistema digestivo dos hospedeiros definitivos. Acredita-se, pela semelhança que apresenta com *Toxoplasma*, que ocorra a invasão das células cilíndricas ciliadas do epitélio intestinal, formação de macro e microgametas, com posterior fecundação e produção de oocistos, caracterizando o chamado ciclo enteroepitelial, comum a outros membros da família Sarcocystidae (DUBEY et al., 2002; DUBEY et al., 2007).

Os hospedeiros definitivos se tornam infectados ao ingerirem tecidos dos hospedeiros intermediários que contenham cistos com bradizoítos. Dentro de cinco a 20 dias após a ingestão dos bradizoítos, oocistos imaturos (ainda não esporulados) começam a ser eliminados nas fezes. Estes se tornam maduros (esporulados) em 24 a 72 horas, dependendo de condições favoráveis de umidade, temperatura e concentração de dióxido de carbono no meio, tornando-se assim infectantes aos hospedeiros intermediários. Estes se tornam infectados ao ingerirem água e alimentos contaminados com oocistos maduros. Na luz intestinal, a parede do oocisto e dos esporocistos é digerida e os esporozoítos penetram no epitélio intestinal, diferenciando-se em taquizoítos e dando início ao processo de invasão das células hospedeiras. Diante da resposta do sistema imune do hospedeiro, como mecanismo de escape e manutenção no organismo parasitado, os taquizoítos se diferenciam em bradizoítos, desacelerando sua multiplicação e agrupando-se no interior dos cistos nos tecidos, principalmente do sistema nervoso (McALLISTER et al., 1998; DUBEY et al., 2002; DUBEY et al., 2007). A Figura 2 traz uma representação esquemática do ciclo biológico de *N. caninum*.

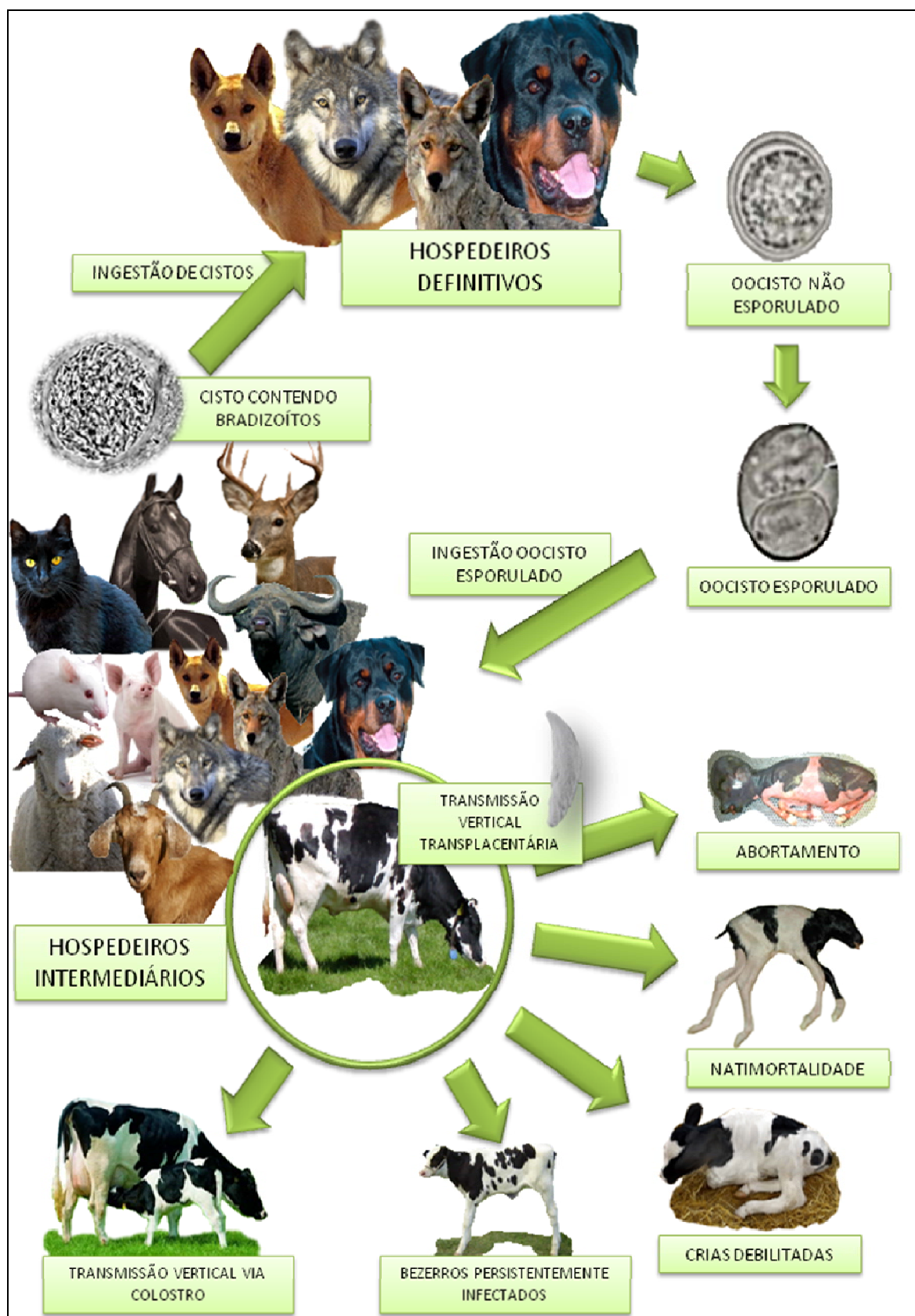


FIGURA 2 – Ciclo biológico de *Neospora caninum*.

c) Isolados e diversidade intra-específica

Até o momento, o parasito foi isolado a partir de cães, bovinos, cervídeos, búfalos e ovinos (GONDIM et al., 2001; RODRIGUES et al., 2004; VIANNA et al., 2005; PENA et al., 2007; GARCIA-MELO et al., 2009). Estudos têm sido realizados com o objetivo de conhecer mais detalhadamente estes isolados, sob diversos aspectos.

Camundongos de diversas linhagens, principalmente Balb/c e *Knockout* (KO) têm sido utilizados para demonstrar diferentes graus de susceptibilidade à infecção por diferentes isolados de *N. caninum* em todo o mundo. Caracterizações patogênicas, antigênicas e moleculares têm revelado que os diversos isolados já obtidos, embora pertençam à espécie *Neospora caninum*, apresentam particularidades no que diz respeito à sua virulência, invasividade, patogenicidade e capacidade de provocar manifestações clínicas em seus hospedeiros, principalmente abortamentos (ATKINSON et al., 1999; SHIBAHARA et al., 1999; SCHOCK et al., 2001; DUBEY et al., 2007; AL-QASSAB et al., 2009; GARCIA-MELO et al., 2009; ROJO-MONTEJO et al., 2009).

Avaliações moleculares, utilizando microssatélites demonstraram que existe uma diversidade de perfis genéticos entre as cepas circulantes de *N. caninum* (PEDRAZA-DÍAZ et al., 2009; BASSO et al., 2010). FERNANDES (2010), em estudo com fêmeas zebuínas de Goiás e utilizando marcadores microssatélites, identificou a presença de diferentes perfis genéticos no Estado, inclusive mais de um perfil diferente em uma propriedade de uma mesma região.



2.1.3 Neosporose bovina

Apesar de a primeira descrição da doença, que culminou na identificação de um novo agente, ter sido proveniente de cães, o maior impacto econômico e na saúde animal da neosporose ocorre em bovinos. A maior parte dos estudos no cenário mundial é concentrada no aprofundamento do conhecimento da neosporose bovina, buscando identificar novos aspectos da enfermidade que possam auxiliar na construção de estratégias de combate e

redução dos impactos negativos que vem causando nos rebanhos em todo o mundo (HEMPHILL & GOTTSTEIN, 2000; DUBEY et al., 2007).

a) Estudos de prevalência

A neosporose bovina é uma doença de distribuição cosmopolita, sendo relatada em muitos países como a principal causa de falhas reprodutivas nos rebanhos bovinos (DUBEY et al., 2007). Apesar de grande número de estudos de prevalência estar disponível, em algumas partes do mundo não existem dados que mostrem a real situação dos rebanhos quanto à exposição à *N. caninum*. Além disso, a diversidade de técnicas empregadas, bem como as variações metodológicas de cada uma, dificultam ou mesmo impossibilitam uma comparação de dados confiável. Este fato acaba por impedir a real compreensão da dimensão do dano causado por *N. caninum* no âmbito econômico e na saúde animal (ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003; COLLANTES-FERNÁNDEZ, 2003).

Os dados de prevalência disponíveis são, em grande maioria, obtidos em estudos sorológicos. Além das variações inerentes à técnica utilizada, são observadas diferenças nos números de prevalência relativas ao país, região, tamanho da amostra selecionada, e características desta (aptidão para corte ou leite, histórico ou não de abortamentos). Como exemplo de tal variação, tem-se o fato das maiores taxas de soropositividade estarem em propriedades com problemas de abortamento (COLLANTES-FERNÁNDEZ, 2003).

Levantamentos epidemiológicos revelam uma grande variação nos índices de soropositividade. Nos países da Europa, relatos apontam que *N. caninum* está presente em números que vão de 16% na Suécia (BARTELS et al., 2006a) e de 13,7% (CAETANO-DA-SILVA et al., 2004a) a 35,9% na Espanha (QUINTANILLA-GOZALO et al., 1999). No continente asiático, os níveis oscilam de 4,1% a 23% na Coreia (BAE et al., 2000; KIM et al., 2002), e entre 1,5% e 26,1% no Japão (KOIWA et al., 2005). Na Oceania, os relatos indicam variações de 30% a 86% na Austrália, em vacas sem e com histórico de abortamento, respectivamente (ATKINSON et al., 2000a) e de 2,8% a 33,61% na Nova Zelândia (TENNENT-BROWN et al., 2000; REICHEL & PFEIFFER, 2002). Na África, onde

os dados de soroprevalência são mais escassos, os registros existentes indicam que 2,6% dos bovinos de raças locais do continente (JOSHUA et al., 2002) e 17,9% dos bovinos de aptidão leiteira da região do Senegal (KAMGA-WALADJO et al., 2010) são soropositivos. No continente americano, foram relatados de 5,6% a 19,2% de bovinos positivos no Canadá (CHI et al., 2002; VANLEEUEWEN et al., 2005; 2010a), de 16% a 82% nos Estados Unidos (McALLISTER et al., 2000; RODRIGUEZ et al., 2002), e de 4,7% a 43,1% na Argentina (MOORE et al., 2002).

Os números relativos a levantamentos sorológicos nacionais de *N. caninum* compartilham das mesmas características de variabilidade observadas nos dados mundiais. Os relatos relativos ao cenário soroepidemiológico bovino brasileiro estão apresentados no Quadro 1.

QUADRO 1 – Levantamento de soroprevalências para anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos no território nacional, de acordo com unidade federativa, aptidão de produção dos animais, técnica utilizada e referência consultada (Continua)

Estado	Aptidão	Técnica	Soroprevalência (%)	Referência
Bahia	leite	IFI	14,09% (63/447)	GONDIM et al. (1999a)
Espírito Santo	leite	IFI	17,5% (7/40)	FANTI et al. (2009)
Goiás	leite	IFI	30,4% (135/444)	MELO et al. (2006)
	corte	IFI	29,6% (135/456)	MELO et al. (2006)
	mista	IFI	43,3% (13/30)	MELO et al. (2006)
	leite	ELISA	56,6%(1067/1884)	SCHULZE (2008)
	corte	ELISA	26,2% (469/1787)	SCHULZE (2008)
	mista	ELISA	44,6% (1067/2393)	SCHULZE (2008)
	corte/mista	IFI	21,82% (55/252)	OLIVEIRA et al. (2010)
Goiás e Tocantins	raça local	ELISA	38,24% (179/468)	JULIANO (2006)
Maranhão	leite	IFI	50,74% (412/812)	TEIXEIRA et al. (2010)
Mato Grosso	leite	IFI	53,54% (499/932)	BENETTI et al. (2009)

QUADRO 1 – Levantamento de soroprevalências para anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos no território nacional, de acordo com unidade federativa, aptidão de produção dos animais, técnica utilizada e referência consultada (Continuação)

Estado	Aptidão	Técnica	Soroprevalência (%)	Referência
Mato Grosso do Sul	leite/corte	IFI	28,2% (31/110)	RAGOZO et al. (2003)
	corte	ELISA	26,1% (63/241)	ANDREOTTI et al. (2004)
	corte	IFI	62,57% (687/1098)	ANDREOTTI et al. (2004)
	leite/corte/mista	IFI	14,9% (449/2488)	OSHIRO et al. (2007)
	corte	ELISA	29,5% (81/275)	PAZ et al. (2007)
	mista	IFI	11% (43/392)	MELLO et al. (2008)
Minas Gerais	leite	ELISA	18,7% (109/584)	MELO et al. (2001)
	leite/corte	IFI	29% (47/162)	RAGOZO et al. (2003)
	leite	ELISA	18,4% (106/576)	MELO et al. (2004)
	leite	ELISA	16,8% (41/243)	MINEO et al. (2006)
	leite	IFI	69,21% (1133/1637)	GUEDES et al. (2008)
Pará	leite/corte	IFI	19% (30/160)	MINERVINO et al. (2008)
Paraná	leite	ELISA	34,8% (60/172)	LOCATELLI-DITTRICH et al. (2001)
	leite/corte	IFI	22,2% (20/90)	RAGOZO et al. (2003)
	leite	IFI	14,3% (89/623)	GUIMARÃES Jr. et al. (2004)
	leite	IFI	12% (45/385)	OGAWA et al. (2005)
	-	ELISA	33% (423/1263)	LOCATELLI-DITTRICH et al. (2008)

QUADRO 1 – Levantamento de soroprevalências para anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos no território nacional, de acordo com unidade federativa, aptidão de produção dos animais, técnica utilizada e referência consultada (Conclusão)

Estado	Aptidão	Técnica	Soroprevalência (%)	Referência
Pernambuco	leite	IFI	34,75% (163/469)	SILVA et al. (2008)
Rio de Janeiro	leite/corte	IFI	14,7% (22/150)	RAGOZO et al. (2003)
	leite	ELISA	23,7% (131/563)	MUNHOZ et al. (2006)
Rio Grande do Sul	leite	IFI	11,2% (25/223)	CORBELLINI et al. (2002)
	leite/corte	IFI	20% (28/140)	RAGOZO et al. (2003)
	leite	IFI	17,8% (276/1549)	CORBELLINI et al. (2006)
	leite/corte/mista	ELISA	11,4% (89/781)	VOGEL et al. (2006)
Rondônia	leite	IFI	11,2% (114/1011)	AGUIAR et al. (2006)
	corte	IFI	9,5% (56/584)	AGUIAR et al. (2006)
	mista	IFI	9,7% (50/514)	AGUIAR et al. (2006)
São Paulo	leite	IFI	27,3% (41/150)	RAGOZO et al. (2003)
	leite	IFI	15,9% (83/521)	SARTOR et al. (2003)
	leite	ELISA	30,5% (159/521)	SARTOR et al. (2003)
	corte	IFI	15,57% (121/777)	HASEGAWA et al. (2004)
	leite	ELISA	35,54% (145/408)	SARTOR et al. (2005)
	corte	ELISA	20% (101/505)	SARTOR et al. (2005)



b) Transmissão horizontal

Caracterizada pela ingestão de água e alimentos contaminados pelos oocistos esporulados, a transmissão horizontal é também classificada como exógena (DUBEY et al., 2006), ficando o parasito em ambiente externo ao

organismo hospedeiro, em parte de seu ciclo biológico. Ocorre, portanto, por rota orofecal, onde existe a participação dos hospedeiros definitivos eliminando oocistos nas fezes. A partir da identificação do cão como eliminador de oocistos (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999), surgiu a possibilidade desta rota de transmissão, confirmada posteriormente por relatos de sucesso na infecção de bovinos após a administração experimental de oocistos eliminados nas fezes do cão (DE MAREZ et al., 1999; GONDIM et al., 2002; TREES et al., 2002).

Estudos relacionaram a presença de cães infectados nas propriedades rurais, possivelmente liberando oocistos no ambiente, com a soropositividade de bovinos para *N. caninum*. Tal fato indica a importância epidemiológica do hospedeiro definitivo na disseminação e manutenção da neosporose bovina nos rebanhos (WOUDA et al., 1999; DIJKSTRA et al., 2002; SÁNCHEZ et al., 2003).

c) Transmissão vertical

Esta forma de transmissão, também descrita como endógena (TREES & WILLIAMS, 2005; DUBEY et al., 2006) é caracterizada pela infecção do hospedeiro intermediário e manutenção do parasito, sem a participação de um hospedeiro definitivo. Embora a transmissão horizontal tenha certa importância na epidemiologia da neosporose bovina, a transmissão vertical transplacentária é considerada o principal meio de propagação da enfermidade e manutenção desta nos rebanhos. Avaliações acerca da relevância desta forma de infecção revelaram que entre 24% e 95,2% dos bezerros nascidos de mães positivas estão infectados por *N. caninum*, caracterizando a transmissão intra-uterina (PARÉ et al., 1996; ANDERSON et al., 1997; DAVISON et al., 1999; FRENCH et al., 1999; PEREIRA-BUENO et al., 2000; DUBEY et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010).

As fêmeas, uma vez infectadas, permanecem nesta condição por toda a vida e são capazes de transmitir a infecção a toda a sua descendência, de forma consecutiva ou intermitente. Assim, em propriedades onde é prática comum a reposição de matrizes com animais do próprio rebanho, a infecção se perpetua (WOUDA et al., 1998; ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003; FIORETTI et al., 2003). A

transmissão vertical transplacentária não se restringe aos animais que apresentam abortamentos, frequentes ou não, mas ocorre também em fêmeas que nunca apresentaram falhas reprodutivas (DUBEY & LINDSAY, 1996; DUBEY et al., 2007).

A probabilidade de ocorrência de transmissão vertical nos rebanhos parece sofrer decréscimo em prenhez subsequentes, o que poderia sugerir o surgimento de algum tipo de imunidade efetiva do hospedeiro, interferindo neste processo (DIJKSTRA et al., 2003; ROMERO & FRANKENA, 2003; DUBEY et al., 2007).

É possível, embora rara, a detecção de anticorpos pré-colostrais anti-*N. caninum* em bezerros nascidos de mães sorologicamente negativas. Possivelmente, estas vacas se tornaram infectadas há um bom tempo, e seus níveis de anticorpos foram declinando com o passar dos anos, até um patamar não detectável pelas técnicas comumente utilizadas, como resultado da descontinuidade (oscilação) na produção dos anticorpos (FRÖSSLING et al., 2005; LÓPEZ-GATIUS et al., 2004; DUBEY et al., 2007).

d) Outros mecanismos de transmissão

A transmissão de *N. caninum* em bovinos se dá basicamente por meio da transmissão horizontal e vertical. Entretanto, estudos levantam a hipótese de outras formas de infecção também estarem envolvidas na epidemiologia da neosporose bovina. A infecção de animais jovens foi descrita experimentalmente após ingestão do colostro e leite contaminados, sendo a via colostrar considerada uma modalidade de transmissão vertical (UGGLA et al., 1998; DAVISON et al., 2001). Amostras de colostro oriundas de vacas soropositivas foram também positivas para DNA de *N. caninum* e para anticorpos IgG específicos contra o parasito. Porém, o papel epidemiológico desta rota de infecção parece ser pouco relevante, já que os anticorpos presentes no colostro seriam eficazes na inativação de taquizoítos, sendo necessários estudos adicionais que corroborem ou não esta afirmativa (MOSKWA et al., 2007).

A possibilidade de transmissão por via venérea foi levantada a partir da identificação de DNA de *N. caninum* em sêmen de bovinos naturalmente infectados. Porém, a baixa frequência de animais positivos, associada à reduzida carga parasitária detectada nestes, sugere que o macho tem pouca importância epidemiológica na transmissão de *N. caninum* em condições naturais (ORTEGA-MORA et al., 2003; CAETANO-DA-SILVA et al., 2004b; FERRE et al., 2005) bem como seria improvável a transmissão por técnicas de inseminação artificial (CANADA et al., 2006). Entretanto, sêmen infectado experimentalmente e introduzido no útero de fêmeas primíparas foi capaz de infectá-las, se mostrando como via possível de infecção (SERRANO et al., 2006) e evidenciando a necessidade de mais estudos para elucidação deste aspecto.

A transmissão entre bovinos adultos parece não ocorrer, diante de estudos que relatam insucesso na tentativa de infectar animais a partir da administração de tecidos e secreções de animais contaminados, a exemplo de situações facilmente encontradas em condições naturais e comprovadamente importantes na transmissão de outras doenças da esfera reprodutiva (DAVISON et al., 2001).

Os estudos a respeito da importância da tecnologia de transferência de embriões como meio de transmissão da infecção indicam que o uso desta não representa risco de contaminação, desde que os embriões sejam implantados em receptoras comprovadamente negativas (BAILLARGEON et al., 2001; LANDMANN et al., 2002; CAMPERO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2010).

A partir da identificação de *N. caninum* em diversas espécies silvestres, a possibilidade da ocorrência de transmissão entre estes e os bovinos domésticos vem sendo discutida. Acredita-se na existência do chamado ciclo silvestre da neosporose, que acontece entre canídeos e herbívoros selvagens. Este ciclo poderia influenciar na epidemiologia dos rebanhos domésticos, especialmente naqueles de criação extensiva. Já foi comprovada a possibilidade de infecção de cães domésticos, com posterior liberação de oocistos, a partir da ingestão de tecidos de cervos naturalmente infectados, o que reforça esta teoria. Mais estudos são necessários para a elucidação dos aspectos referentes ao ciclo silvestre e sua influência nos bovinos domésticos (GONDIM et al., 2004c; ROSYPAL & LINDSAY, 2005; GONDIM, 2006).

e) Patogenia e manifestações clínicas

Estando o animal infectado, o *N. caninum* pode parasitar grande variedade de células hospedeiras. Entretanto, o maior tropismo deste parasito é o sistema nervoso central em primeiro lugar, seguido pelas células do sistema muscular estriado (esquelético e cardíaco) e células endoteliais (ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003; DUBEY et al., 2006).

N. caninum é, principalmente, um parasito de placenta e feto, sendo a neosporose resultante de uma primo-infecção durante a gestação, via de transmissão horizontal, ou da recrudesência de uma infecção latente, caracterizada pela reativação de bradizoítos (ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003; DUBEY et al., 2006).

Os taquizoítos são os responsáveis pela fase aguda da infecção por *N. caninum*. A intensidade da patogenia é dependente da capacidade de invasão e multiplicação do parasito e da eficácia do organismo hospedeiro em montar barreiras contra este processo. Devido à característica do parasito de ser intracelular, as lesões são decorrentes da destruição das células parasitadas, com aparecimento da necrose e posterior infiltração de células inflamatórias e citocinas (COLLANTES-FERNÁNDEZ, 2003; DUBEY et al., 2006; INNES et al., 2005).

A principal manifestação clínica da presença de *N. caninum* é a ocorrência de abortamentos. Acontecem tipicamente durante a fase inicial do segundo trimestre gestacional, sendo uma característica distintiva da doença, mas pode acontecer durante toda a gestação (DUBEY & LINDSAY, 1996; ANDERSON, 2007). A ocorrência da infecção na etapa inicial da gestação (primeiro trimestre) pode ocasionar morte embrionária e reabsorção do conceito, sem manifestação clínica específica, exceto a repetição ao estro. Uma infecção na etapa final de gestação (terceiro trimestre) resulta normalmente em nascimento de crias que, embora estejam infectadas, apresentam-se clinicamente saudáveis (BUXTON et al., 2002; ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003; MALEY et al., 2003; MACALDOWIE et al., 2004; DUBEY et al., 2006).

Existem teorias que procuram explicar como a infecção culmina na interrupção da prenhez. Acredita-se que ocorra uma parasitemia, o protozoário se estabeleça inicialmente nas carúnculas, antes de cruzar a barreira placentária e

atingir toda a placenta. O parasito se multiplica ativamente e o dano resultante desse processo prejudica a comunicação materno-fetal, ameaçando a sobrevivência do feto por tornar a oxigenação e nutrição fetais insuficientes. Outros fatos que contribuem no processo, associados à presença de *N. caninum* são a produção de prostaglandinas, provocando luteólise e a invasão dos órgãos fetais pelo parasito, ocasionando graves lesões e infiltração inflamatória (DUBEY et al., 2006; INNES et al., 2005).

Embora sejam assintomáticas, vacas infectadas que abortaram uma vez podem apresentar novos abortamentos ou produzir bezerros infectados em prenhez subsequentes. Fetos apresentam autólise e mumificação (GIVENS, 2006; ANDERSON, 2007; GIVENS & MARLEY, 2008). As fêmeas bovinas infectadas permanecem nesse estado por toda a vida e têm entre três e 13 vezes mais chances de abortar do que uma vaca não-infectada (WOUDA et al., 1998; CORBELLINI et al., 2002; LÓPEZ-GATIUS et al., 2004; HALL et al., 2005).

Bezerros congenitamente infectados podem apresentar sinais neuromusculares, como paresia e paralisia de membros e incoordenação, decorrentes da presença de cistos no sistema nervoso e lesões necróticas nas células musculares (BRYAN et al., 1994; DUBEY & LINDSAY, 1996). Com menor frequência pode ocorrer exoftalmia, cegueira, posição assimétrica dos olhos, hidrocefalia, redução na massa muscular, má formação da coluna vertebral e medula espinhal (BRYAN et al., 1994; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2003).

Em animais adultos a infecção costuma ser assintomática. Entretanto, em condições experimentais, observa-se quadro febril transitório e aumento de linfonodos (INNES et al., 2001; MALEY et al., 2003).

f) Imunologia e relação parasito-hospedeiro

Como acontece em diversas outras infecções parasitárias, a neosporose bovina é multifatorial e resultado de um desequilíbrio entre a multiplicação do parasita e a efetividade da resposta imune do hospedeiro (HEMPHILL & GOTTSTEIN, 2000).

Tanto a imunidade inata quanto a imunidade adquirida estão envolvidas no processo de proteção à infecção por *N. caninum* (NISHIKAWA et al., 2003). Estudos apontam que o padrão de resposta do tipo Th1 está relacionada a uma infecção aguda (RITTER et al., 2002), enquanto que a resposta tipo Th2 é determinante para a resistência ou susceptibilidade do hospedeiro à neosporose (NISHIKAWA et al., 2003).

Devido ao fato de *N. caninum* ser um parasita intracelular obrigatório, o sistema imune mediado por células tem grande importância na resposta do hospedeiro frente a uma infecção. A primeira observação nesse sentido foi descrita por INNES et al. (1995), que relataram uma inibição na multiplicação intracelular do parasito na presença de interferon gama (INF γ) em células *in vitro*.

Nesse processo, as citocinas pró-inflamatórias como interleucina-2 (IL-2), interleucina-12 (IL-12), fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e Interferon gama (INF γ) têm papel de grande importância na ativação de células T auxiliares, desencadeando uma resposta do tipo 1 (Th1) (RAGHUPATHY, 1997), sendo esta um eficiente meio de limitar a proliferação de *N. caninum* no organismo (INNES et al., 2002). Células *natural killer* (NK) têm representatividade como atuantes numa primeira resposta diante da infecção (KLEVAR et al., 2009).

A proteção por células TCD4⁺ é mais representativa na infecção por *N. caninum* quando comparada às células TCD8⁺. O INF γ tem expressão significativa no início da infecção pelo parasito, sendo as células TCD4⁺ essenciais para a produção de anticorpos específicos anti-*N. caninum* em momentos posteriores na infecção, traduzindo-se assim em outros mecanismos de proteção (TANAKA et al., 2000).

Nesse cenário a resposta imune humoral, embora menos expressiva, tem um importante papel no controle da infecção, neutralizando a invasão de novas células pela fase extracelular do taquizoíto, além de ser útil no diagnóstico e em estudos epidemiológicos, com a identificação de anticorpos específicos, tais como IgG1 e IgG2a (INNES et al., 2005; HEMPHILL et al., 2006). A atuação do sistema imune humoral foi comprovada por TEIXEIRA et al. (2005), ao caracterizarem a atuação de células B e constatarem que estas foram estimuladas por taquizoítos em camundongos Balb/c. Sabe-se ainda que o

padrão de resposta humoral frente a *N. caninum* difere entre raças puras e cruzadas, interferindo na taxa de abortamentos (SANTOLARIA et al., 2011).

Em caso de gestação, mudanças ocorrem no sistema imune da fêmea para possibilitar a continuação da gestação. Algumas citocinas, como as pró-inflamatórias INF γ , IL-2, IL-12 e TNF α são prejudiciais à prenhez. O tipo de resposta desencadeada na neosporose é potencialmente danosa ao feto em fêmeas prenhes, podendo provocar o abortamento. Assim, células maternas e trofoblásticas fetais produzem interleucina-10 (IL-10), interleucina-4 (IL-4) e fator de transformação de crescimento beta (TGF β), invadindo o sistema imune materno e desencadeando uma resposta local do tipo Th2 na interface materno-fetal (ENTRICAN, 2002). Este processo de imunomodulação, embora garanta o desenvolvimento da gestação, facilita a multiplicação de *N. caninum* e altera o equilíbrio parasita-hospedeiro em favor do parasito, pela ação da IL-10 reduzindo a produção de INF γ (INNES et al., 2002).

As particularidades das consequências da infecção por *N. caninum* ao feto são explicadas em parte pelas próprias características do sistema imunológico deste nas diferentes fases gestacionais. No início da gestação, o feto não apresenta capacidade imunológica e a infecção resulta em morte e reabsorção. Na etapa intermediária, os órgãos do sistema imune do feto começam a apresentar algum tipo de reconhecimento a patógenos (BUXTON et al., 2002; ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003), inclusive com produção de anticorpos específicos detectáveis (FERNANDES, 2010). Como não é suficientemente capaz de montar uma resposta eficiente, a consequência é o abortamento. Ao final da gestação, o feto já apresenta resposta competente à infecção, o suficiente para impedir sua morte, mas não para impedir que se torne infectado. Nesta fase, a detecção de anticorpos pré-colostrais é frequente e muitas vezes apresenta títulos superiores aos das mães (BUXTON et al., 2002; ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003).

A época em que a vaca se torna infectada (durante a gestação, ou anteriormente a esta) é determinante na ocorrência ou não de abortamento ou transmissão vertical da infecção. Uma prévia exposição das fêmeas ao agente foi relatada como comprovadamente eficaz na prevenção de perdas fetais ou transmissão transplacentária, sugerindo a existência de imunidade protetora efetiva (McALLISTER et al., 2000; INNES et al., 2001; WILLIAMS et al., 2003).

Entretanto, devido às mudanças que ocorrem no organismo materno durante a gestação, os níveis de anticorpos protetores oscilam e este fato pode explicar a ocorrência de recrudescência da infecção latente, nova parasitemia e infecção do feto (INNES et al., 2001).



2.1.4 Diagnóstico da neosporose bovina

A ausência de manifestações clínicas que sejam patognomônicas contribui para a dificuldade diagnóstica encontrada nesta enfermidade. Como visto, na maioria dos casos, percebe-se apenas a ocorrência de abortamentos e repetição de cio nas fêmeas em idade reprodutiva, fatos que são comuns a outras enfermidades do segmento reprodutivo (JENKINS et al., 2002; ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003). Portanto, estabelecer uma relação causa e efeito entre a ocorrência de abortamento e *N. caninum* é uma tarefa complexa. Encontrar a presença do DNA do parasito, por si só não significa que este causou o abortamento (DUBEY & SCHARES, 2006; ANDERSON, 2007; DUBEY et al., 2007).

O diagnóstico da neosporose bovina apresenta-se, por vezes, difícil e de custo elevado, pois necessita de uma associação entre o histórico clínico e epidemiológico, acrescido da análise dos diferentes espécimes por meio de mais de uma técnica laboratorial, além da exclusão de outras possíveis causas de falhas reprodutivas que podem acometer o rebanho (JENKINS et al., 2002; ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003; PEREIRA-BUENO et al., 2003; DUBEY & SCHARES, 2006).

a) Diagnóstico clínico e epidemiológico

Diante de um rebanho onde foram identificados problemas reprodutivos, tais como os que ocorrem na neosporose bovina, a determinação do diagnóstico conclusivo depende da completa análise das características relativas

à doença, do rebanho acometido, da propriedade e do manejo adotado (ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003; SILVA, 2004).

Características como tipo de exploração, dieta, histórico sanitário e reprodutivo, introdução de novos animais, presença de cães, tratamentos e vacinações administradas anteriormente, idade dos animais, dentre outras, devem ser incluídas na anamnese (ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003), sendo que algumas destas características foram identificadas como fatores de risco para a ocorrência da neosporose bovina (BARTELS et al., 1999; CORBELLINI et al., 2002; AGUIAR et al., 2006; CORBELLINI et al., 2006; SCHULZE, 2008).

Abortamentos podem ocorrer de forma esporádica, endêmica ou epidêmica, não apresentando sazonalidade. Podem acontecer tanto em primíparas quanto em multíparas, sendo que a investigação da genealogia e da descendência quanto à ocorrência de problemas reprodutivos é ponto importante, dada a representatividade da transmissão vertical em bovinos (ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003; ORTEGA-MORA et al., 2006).

A valorização dos dados de anamnese, juntamente com as informações clínicas e epidemiológicas, são de grande ajuda no diagnóstico. Entretanto, a confirmação da infecção requer a assistência de um laboratório de análise especializada veterinária (COLLANTES-FERNÁNDEZ, 2003).

b) Diagnóstico laboratorial

Em animais adultos, a principal forma de diagnóstico *ante-mortem* é a pesquisa de anticorpos específicos anti-*N. caninum* nos mais variados fluidos orgânicos. Já foram detectadas imunoglobulinas reagentes, além do soro sanguíneo, também em colostro e leite de vacas infectadas, fluídos vaginais e saliva (OOI et al., 2000).

Em fetos abortados, técnicas indiretas (identificação de anticorpos específicos) e diretas (identificação do agente ou fragmentos antigênicos) são aplicáveis no diagnóstico laboratorial. Estas técnicas permitem a detecção de anticorpos em fluidos fetais, identificação de lesões compatíveis, isolamento e caracterização do agente e amplificação de ácidos nucleicos do DNA do parasito

(ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003; SILVA, 2004). A detecção de anticorpos em fluidos fetais é considerada sinal de exposição intra-uterina ao parasito, já que a placenta bovina não permite a passagem de anticorpos maternos ao feto (INNES et al., 2001).

b.1) Técnicas para identificação de anticorpos

Desde a primeira descrição da doença provocada por *N. caninum*, a necessidade do desenvolvimento e padronização de provas laboratoriais de pesquisa de anticorpos específicos frente ao parasito se mostrou cada vez mais importante, visto que é uma forma eficiente de mapeamento da distribuição da infecção nos rebanhos, possibilitando o diagnóstico em grande quantidade de animais, *in vivo* e rapidamente (ATKINSON et al., 2000b).

A partir do momento em que DUBEY et al. (1988b) obtiveram êxito no isolamento do *N. caninum*, conduziu-se o desenvolvimento de diversas provas sorológicas, utilizando como substrato antigênico o taquizoíto inteiro inativado, ou diferentes preparações a partir de extratos antigênicos solúveis (ATKINSON et al., 2000b; ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003). Este fato permitiu um incremento na qualidade do diagnóstico e um melhor conhecimento da epidemiologia da neosporose bovina (ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003).

As técnicas de diagnóstico indireto apresentam como vantagens, além dos pontos já destacados acima, o fato de possuírem elevada sensibilidade e especificidade, o que garante confiabilidade às técnicas. Por outro lado, estas apresentam limitações no que diz respeito às discrepâncias encontradas entre os diversos laboratórios, principalmente com relação à técnica utilizada e ao ponto de corte adotado. Além disso, a característica de oscilação de anticorpos nos animais pode interferir na sensibilidade da técnica, especialmente naqueles animais onde o título é baixo. Estas situações podem ser encontradas mediante uma infecção crônica, soroconversão ou declínio de anticorpos colostrais (SCHARES et al., 1998; ATKINSON et al., 2000b; ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003).

A primeira técnica indireta padronizada para neosporose bovina foi a reação de imunofluorescência indireta (IFI) (DUBEY et al., 1988b), sendo

considerada padrão ouro para a enfermidade, referência para outras técnicas (ATKINSON et al., 2000b; ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003; SILVA, 2004; ORTEGA-MORA et al., 2006).

A IFI utiliza como substrato antigênico taquizoítos multiplicados em cultivo celular, purificados e inativados pela formalina. Os parasitos são depositados em lâminas demarcadas específicas, fixados (por acetona, frio, etc.) e permanecem com estrutura íntegra, portanto a reação é baseada na detecção de anticorpos que reconhecem e se ligam à superfície celular de *N. caninum*. Requer anticorpo secundário espécie-específico conjugado a um fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína – FITC). É considerada positiva a reação onde toda a superfície do taquizoíto apresenta fluorescência consistente. A ocorrência de reações fracas ou restritas à região apical do parasito refere-se normalmente a títulos baixos ou a reações cruzadas inespecíficas entre outros membros do filo Apicomplexa, que compartilham epítomos antigênicos no complexo apical, como é o caso do *Toxoplasma*. Em ambos os casos, a interpretação dos resultados deve ser conduzida com cautela, repetindo o teste caso necessário (ATKINSON et al., 2000b; ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003; SILVA, 2004; ORTEGA-MORA et al., 2006).

Existem variações no ponto de corte adotado na IFI, tanto quando se trata de sorologia em animais adultos quanto na sorologia fetal. Em se tratando de animais adultos e também em bezerros, os pontos de corte atualmente adotados vão de 1:200 a 1:640 (SCHARES et al., 1998; CONRAD et al., 1993b). No diagnóstico fetal, os pontos de corte variam entre 1:16 e 1:80. Além destas variações, outro ponto desfavorável da técnica de IFI é a subjetividade envolvida na interpretação dos resultados, exigindo técnico com experiência para minimizar erros (BJÖRKMAN & UGLA, 1999, ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003; SILVA, 2004; ORTEGA-MORA et al., 2006).

A técnica de ensaio imunoenzimático (*Enzyme-linked immunosorbent assay* – ELISA) é largamente utilizada no diagnóstico da neosporose bovina, especialmente por permitir a análise de grande número de amostras simultaneamente, sendo ideal para estudos epidemiológicos (ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003).

Utiliza uma variedade de substratos antigênicos, fixados em placas de poliestireno de 96 cavidades e superfície plana: taquizoítos inteiros

formalinizados, taquizoítos sonificados e solubilizados, proteínas recombinantes, antígenos extraídos dos taquizoítos e incluídos em partículas *iscom* (*immunostimulating complexes*) (BJÖRKMAN et al., 1994; ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003; FRÖSSLING et al., 2003; ORTEGA-MORA et al., 2006). Necessita de um anticorpo secundário espécie-específico conjugado covalentemente a uma enzima, geralmente a peroxidase, e um substrato para esta enzima, que origina cor em amostras positivas (BJÖRKMAN & UGGLA, 1999).

Variações no método convencional conferem à técnica maior especificidade (ELISA de competição), ou a possibilidade de diferenciação entre infecções crônicas ou recentes (ELISA de avidéz) (ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003). Estão disponíveis atualmente kits comerciais, desenvolvidos a partir de antígenos solúveis, destinados ao diagnóstico em soro bovino, como por exemplo: IDDEX (HerdChek[®]), Hipra (Civtest[®]) e Intervet (CHECKIT[®] Bommeli) (ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003), sendo apenas o primeiro com licença comercial no Brasil até o momento. Apresentam facilidade na execução, e trazem todos os reagentes necessários à reação.

A reação de ELISA tem como principais vantagens, além da possibilidade de muitas análises simultâneas, a simplicidade e rapidez na execução, fácil interpretação dos resultados, baixo custo e capacidade de automação, pois os resultados são obtidos por leitura da densidade óptica de cada amostra em espectrofotômetro, baseada das densidades dos controles positivo e negativo (ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003; SILVA, 2004; ORTEGA-MORA et al., 2006).

Além da IFI e do ELISA, que são as provas sorológicas mais comumente utilizadas, outras duas técnicas são empregadas para este fim: *immunoblotting* (IB) e imunoaglutinação direta (*Neospora agglutination test* - NAT). A primeira, também conhecida por *western-blotting*, tem menor utilização em exames rotineiros, sendo mais usada em apoio ao ELISA e à IFI. Identifica a composição antigênica de *N. caninum*, destacando-se os antígenos imunodominantes de peso molecular 17 kDa, 29-30 kDa, 37 kDa e 46 kDa. A segunda é baseada na aglutinação de taquizoítos em decorrência da exposição destes aos anticorpos presentes no soro testado. Não necessita de anticorpo secundário, possibilitando assim a utilização em soro de várias espécies animais

(BJERKAS et al., 1994; ATKINSON et al., 2000b; ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003; SILVA, 2004; ORTEGA-MORA et al., 2006).

Por vezes, discrepâncias entre os resultados obtidos nas diversas técnicas citadas põem em evidência a importância de uma avaliação cautelosa dos dados obtidos, bem como demonstram a necessidade de estudos no sentido de padronizar melhor o diagnóstico sorológico. Diversos estudos compararam as técnicas comumente utilizadas, avaliando a concordância entre elas. Sabe-se que, na maioria das vezes, as duas principais técnicas sorológicas do diagnóstico bovino (IFI e ELISA), apresentam um bom nível de concordância, levando em consideração as particularidades de cada rebanho (BJÖRKMAN & UGGLA, 1999; SCHARES et al., 1998, 1999; REICHEL & PFEIFFER, 2002; SILVA, 2004; VON BLUMRODER et al., 2004; WALDNER et al., 2004; ORTEGA-MORA et al., 2006; WAPENAAR et al., 2007), em contradição a outros autores, que não encontraram tal concordância (SCHARES et al., 1998; SARTOR et al., 2003).

Diante da característica de oscilação que pode acontecer nos níveis de anticorpos dos animais, pode ser interessante a realização de uma sorologia pareada, com algum intervalo entre as colheitas, a fim de detectar animais que possam ter soroconvertido (ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003; ORTEGA-MORA et al., 2006). Entretanto, esta prática parece ter pouca importância diante do fato de que alguns autores, ao realizar este procedimento, não encontraram diferença significativa entre os valores de soropositividade, sugerindo que apenas um exame do rebanho já é capaz de demonstrar o cenário da doença naqueles animais (McALLISTER et al., 2000; DIJKSTRA et al., 2003).

b.2) Técnicas para identificação do agente

Como visto, o diagnóstico da neosporose bovina frequentemente necessita de uma associação de técnicas para se tornar definitivo, especialmente em casos de ocorrência de falhas reprodutivas. Assim, a aplicação das técnicas indiretas deve ser acompanhada do exame do material abortado, a fim de encontrar o parasito, na forma de cistos ou taquizoítos, restos antigênicos, ou

mesmo lesões sugestivas da infecção (JENKINS et al., 2002; ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003; PEREIRA-BUENO et al., 2003; DUBEY & SCHARES, 2006).

A primeira técnica direta padronizada para *N. caninum* foi a imunoistoquímica (IHQ), onde utilizou-se o complexo avidina-biotina-peroxidase para a detecção de taquizoítos e bradizoítos em cortes histopatológicos formalinizados e parafinados de cães natural e experimentalmente infectados, com anticorpo específico produzido em coelho (LINDSAY & DUBEY, 1989).

Dentre os métodos de diagnóstico direto mais comumente utilizados estão o exame histopatológico, a imunoistoquímica (IHQ), a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações e o isolamento do agente *in vivo* ou *in vitro* (ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003; SILVA, 2004; ORTEGA-MORA et al., 2006).

Ao exame histopatológico, as lesões nos tecidos fetais são difundidas em muitos órgãos. Observa-se encefalite não supurativa, com focos de necrose e gliose, miocardite não supurativa, miosite, hepatite com focos de necrose hepática. Pulmões e rins podem apresentar infiltrado de células inflamatórias. Placentite pode ser observada, com grau de severidade variável. Os órgãos de eleição para diagnóstico são, nesta ordem, cérebro, coração e fígado. Entretanto, a observação destas lesões não é conclusiva, pois são típicas de qualquer infecção por protozoário, exceto quando se observa o parasito. Tais lesões podem ainda ser encontradas em infecções por bactérias ou vírus, reforçando a necessidade de uma associação de técnicas (JENKINS et al., 2002; DUBEY, 2003; SILVA, 2004; ANDERSON, 2007; DUBEY et al., 2007; CABRAL et al., 2009; FERNANDES, 2010).

A imunoistoquímica é de grande utilidade, permitindo identificar cistos do parasito, taquizoítos livres ou fragmentos antigênicos em secções de cérebro, pulmão, fígado, rim, músculo estriado e placenta. É indicada apenas em tecidos que apresentaram lesões características ao exame histopatológico. Pode não apresentar sensibilidade satisfatória, em decorrência do baixo número de parasitos presentes no tecido e do grau de autólise deste (ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003; BOGER & HATTEL, 2003; DUBEY & SCHARES, 2006; GIVENS, 2006; ANDERSON, 2007; DUBEY et al., 2007).

A técnica de PCR apresenta sensibilidade e especificidade elevadas, sendo capaz de detectar a contaminação por pequenas quantidades de parasitos

(mesmo infecções por um taquizoíto). É aplicável em tecidos em processo de autólise ou deterioração, fatos comuns na prática das amostras clínicas de fetos abortados (ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003; SILVA, 2004). Os protocolos mais utilizados visam a amplificação da região ITS1 do DNA ribossômico e a sequência Nc5 do DNA genômico de *N. caninum*, com modificações, como nested ou semi-nested PCR, objetivando aumentar a sensibilidade e especificidade da técnica. Estão ainda disponíveis variações como PCR quantitativa, PCR em tempo real e PCR *in situ* (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2002; LÖSCHENBERGER et al. 2004; ORTEGA-MORA et al., 2006).

A partir de um tecido suspeito, é possível tentar o isolamento de *N. caninum* por meio da inoculação deste, acrescido de solução salina e antibióticos, em cultivos de células de diversas linhagens (Vero, Marc, monócitos bovinos) e/ou inoculação em animais sensíveis à infecção, como camundongos das linhagens Balb/c, interferon gama *knockout* e nude. O sucesso deste meio de diagnóstico depende do número de parasitos na amostra e do grau de autólise do tecido. Entretanto, estas técnicas são pouco utilizadas para fins diagnósticos, sendo seu uso mais frequente no meio acadêmico e de pesquisa, direcionado para a obtenção de cepas e estudos de patogenia do parasito (ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003; SILVA, 2004).

b.3) Diagnóstico diferencial

A neosporose bovina, embora de grande expressividade, é apenas mais uma causa de abortamentos e falhas reprodutivas em um rebanho. Diante de um problema desta natureza, outras causas, infecciosas ou não, devem ser consideradas, para direcionar as ações terapêuticas, caso sejam aplicáveis, ou proceder a eliminação dos animais problemáticos e traçar medidas profiláticas.

No diagnóstico diferencial da neosporose bovina devem ser incluídas as causas de origem viral (IBR e BVDV), de origem bacteriana (*Brucella*, *Leptospira*, *Campylobacter*, *Listeria*, dentre outras), de origem parasitária (*Tritrichomonas foetus*, especialmente onde há monta natural) e de origem micótica (*Aspergillus*). Além destas outras causas também devem ser

consideradas: origem física (traumatismos, transporte), genética (anormalidades cromossômicas, mutações), tóxica (plantas, medicamentos) e nutricional (deficiências vitamínicas e minerais, excesso de suplemento protéico) (COLLANTES-FERNÁNDEZ, 2003).



2.1.5 Importância econômica

O maior impacto econômico observado na neosporose bovina é associado à ocorrência de abortamentos (ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003; DUBEY et al., 2007). Entretanto, outras perdas no campo econômico em decorrência da enfermidade devem ser consideradas tais como redução na produção de leite e ganho de peso, encurtamento da vida produtiva do animal, infertilidade como consequência de morte fetal e reabsorção, descarte e reposição, assistência especializada, dentre outros (TREES et al., 1999; ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003).

Vacas soropositivas, em comparação com soronegativas, podem apresentar maior número de inseminações por prenhez, evidenciando baixo desempenho reprodutivo (STENLUND et al., 1999; HALL et al., 2005). Outro fato que reforça o baixo desempenho reprodutivo dos animais soropositivos é o fato de vacas infectadas apresentem intervalo entre partos de até 584 dias (VANLEEUEWEN et al., 2010b).

Alguns autores têm realizado estudos objetivando quantificar as perdas econômicas em consequência da infecção, visto que na maioria das oportunidades, tal prejuízo é apenas estimado. CHI et al. (2002), analisando custos diretos de perdas na produção e indiretos como assistência veterinária, chegou a uma perda de 2305 dólares por ano em um rebanho de 50 animais infectados. Na indústria leiteira canadense, chegou-se a uma perda anual de 18 dólares canadenses por matriz infectada, entre abortamentos e gastos com assistência especializada (HADDAD et al., 2005). Ainda no Canadá, TIWARI et al. (2007) relataram 158 quilos de redução na produção de leite e 8,8 quilos no ganho de peso por ano.

Nos rebanhos holandeses, BARTELS et al. (2006b) constataram redução da produção de leite em até 0,72 quilos por dia em vacas infectadas.

Além disso, relataram que 24% dos animais soropositivos representam perdas econômicas de até 2000 euros por ano. Em abortamentos epidêmicos, as perdas ocorrem não somente durante o surto, mas perduram por até dois anos, com custos de 50 euros por animal (BARTELS et al., 2006c).

Não há estimativas das perdas por neosporose no Brasil, mas baseado nas ocorrências informadas, os prejuízos causados por esta infecção provavelmente excedem os de outras doenças abortivas como brucelose e leptospirose (VIANNA et al., 2008). Perdas no ganho de peso pós-desmame e baixa qualidade de carcaça foram associados a bezerros soropositivos (BARLING et al., 2000). A soropositividade em vacas foi associada, além da ocorrência de abortamentos, também à ocorrência de infecção uterina, aumento no número de inseminações artificiais para concepção e do intervalo de concepção (PESSOA, 2010).



2.1.6 Estratégias de controle

O controle da neosporose bovina deve ser concentrado, basicamente, em identificar animais positivos, reduzir os números de prevalência e impedir que novos animais se tornem infectados, por meio de ações que visem interromper as principais vias de transmissão (ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003).

O tratamento tem sido considerado antieconômico devido ao fato de ter caráter preventivo, necessitando ser aplicado por longos períodos, resultando em prováveis resíduos na carne e leite. Além disso, não há nenhum quimioterápico para a neosporose bovina que seja comprovadamente eficaz (DUBEY et al., 2007). Entretanto, drogas semelhantes às usadas para a toxoplasmose têm sido testadas, com níveis de êxito variáveis, inclusive com relatos de agirem bloqueando a transmissão transplacentária em cobaias experimentalmente infectadas (GOTTSTEIN et al., 2005). Estudos têm sido realizados na busca de drogas eficazes (VANLEEUWEN et al., 2011), porém sem resultados consistentes que permitam a recomendação de um protocolo terapêutico que garanta resultados satisfatórios.

Há uma vacina feita de taquizoítos inteiros inativados (Bovilis[®] Neoguard, Intervet), que embora não previna a infecção fetal, relatos têm associado sua administração com a redução estatística do abortamento bovino em áreas endêmicas para a enfermidade (BIELSA et al., 2004). Porém, o uso da vacina interfere no resultado da sorologia, não permitindo diferenciar animais infectados de vacinados (GIVENS, 2006). Sua eficácia duvidosa provocou sua indisponibilização para comércio no mercado nacional. Estudos vêm sendo conduzidos no sentido de obter um produto que apresente resultados mais satisfatórios (REICHEL & ELLIS, 2009).

Assim, não há na atualidade, protocolo imunoprolático eficaz, tampouco terapêutica aplicável em bovinos com eficácia comprovada. Recomenda-se a incorporação apenas de animais comprovadamente soronegativos no rebanho. A seleção e o descarte das fêmeas regentes é um método eficiente de controle (DUBEY & LINDSAY, 2006). Entretanto, em casos de alta prevalência, é recomendado o descarte seletivo das fêmeas, começando por aquelas que apresentarem maiores problemas, como abortamentos frequentes.

Realizar o monitoramento sorológico de todo o rebanho e eliminar filhas soropositivas, realizando a reposição do rebanho apenas com soronegativas foi a estratégia de controle com o melhor retorno econômico em estudo nos Estados Unidos (LARSON et al., 2004). Estudos de prevalência revelam que em algumas áreas, os animais são mais propensos a se tornarem positivos, devido às condições favoráveis para o parasito. Assim, a identificação destas áreas de risco permite o monitoramento a fim de impedir prejuízos (KLEVAR et al., 2010).

Em fêmeas soropositivas de alto valor genético, onde o descarte se mostra economicamente impraticável, uma opção é a utilização da tecnologia de transferência de embriões, que é apontada como eficiente maneira de impedir que as crias nasçam infectadas, desde que haja um rígido controle sobre as receptoras que devem ser, evidentemente, livres da infecção (BAILLARGEON et al., 2001; CAMPERO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2010).

A caracterização genética de diferentes cepas de *N. caninum* se mostra ferramenta importante para a prevenção, a vigilância e o controle da

neosporose bovina (BECK et al., 2009). Em estudo realizado na Alemanha, a diversidade genética entre as etiologias de surtos de abortamentos demonstram que a rota horizontal determina a ocorrência de abortamentos epidêmicos (BASSO et al., 2010). O controle ambiental é preconizado, no que diz respeito à atenção às fontes ambientais de transmissão horizontal. Deve-se evitar a exposição e o contato de canídeos domésticos e selvagens a placentas e restos de aborto e manter fontes de alimento e água livres do acesso por cães, prevenindo que estes defiquem nesses locais (DUBEY & LINDSAY, 2006).



2.2 Raças bovinas locais

Quando a América foi colonizada, as raças ibéricas foram trazidas pelos portugueses e espanhóis. Dentre as raças portuguesas, as mais importantes na formação do rebanho local são a Mertolenga, Alentejana, Arouquesa, Barrosã, Minhota e Mirandesa. As contribuições espanholas tinham origem na Andaluzia, sudoeste da Espanha, como as raças Retinta e Berrenda (EGITO, 2007). Estas evoluíram ao longo dos séculos, dando origem a raças locais brasileiras. A seleção natural destes rebanhos em ambientes totalmente distintos e a miscigenação dos animais trazidos deram origem a diferentes grupos (OLIVEIRA, 2006). No Nordeste do país cresceu o gado Curraleiro ou Sertanejo, que migrou para Minas Gerais e Goiás. No Sudeste desenvolveu-se o Junqueira e o Franqueiro além das raças Caracu e Mocho Nacional. No Sul, formou-se o Crioulo Lageano e, no Pantanal, o gado Pantaneiro (EGITO, 2007).

Embora estas raças sejam menos produtivas que as comerciais, distinguem-se por apresentarem uma enorme adaptação aos trópicos, onde foram submetidas a um longo processo de seleção natural, o que proporcionou o aparecimento de características de adaptabilidade às condições sanitárias, de clima e manejo encontradas nos mais diferentes habitats (MARTÍN-BURRIEL et al., 1999; EGITO, 2007).

Estes animais parecem ser mais resistentes às doenças endêmicas regionais, sendo este um ponto que os destaca e desperta interesse por parte de criadores. Além de proporcionar economia referente ao gasto com antibióticos e

antiparasitários, esta característica atende ainda à demanda atual por um produto mais natural e livre de possíveis resíduos, contribuindo ainda com a redução da liberação de químicos no ambiente e reforçando a sustentabilidade na criação, característica destes animais. Em estudo comparativo entre raças locais e animais mestiços, resultantes do cruzamento de raças exóticas, os bovinos locais apresentam maior eficiência na construção da resposta da imunidade inata, tida como primeira linha de defesa do organismo contra patógenos (JULIANO, 2006).

Raças locais, como o gado Curraleiro e o gado Pantaneiro, representam uma alternativa de exploração sustentável com geração de renda para populações próximas às áreas de preservação, assentados rurais, populações indígenas e quilombolas, além de poderem ser utilizadas em modelos agropecuários adequados para os biomas da região Centro-Oeste, Cerrado e Pantanal, evitando que ocorra sua destruição (NEIVA, 2009).

Poucos estudos são encontrados sobre a caracterização de raças bovinas locais ou localmente adaptadas. O estudo dessas raças poderia ajudar no desenvolvimento de programas futuros de criação de animais, assim como na preservação e conservação do material genético podendo resultar em ganhos na eficiência econômica, maiores do que o custo de preservação destes animais (HALL & BRADLEY, 1995).



2.2.1 Bovino Curraleiro

O bovino Curraleiro, também conhecido como Pé-duro, desenvolveu-se em regiões de clima semi-árido (EGITO, 2007). Atualmente, está presente no Maranhão, Piauí, Goiás e Tocantins. Os criadores ressaltam, além da rusticidade, o baixo custo de produção e a baixa exigência nutricional como qualidades indiscutíveis do Curraleiro. A carne saborosa e com baixo teor de gordura é outra característica que favorece a boa aceitação do produto, inclusive despertando o interesse de importadores (OLIVEIRA, 2006).

Sendo um animal dócil, rústico e resistente, poderia ocupar milhares de hectares de áreas de pastagens naturais de baixa qualidade, desfavoráveis às outras raças (teriam baixa produtividade ou até mesmo dificuldades de

sobrevivência), mediante um baixo investimento para o pequeno produtor, fornecendo carne, leite e animais de trabalho (BIANCHINI et al., 2006; EGITO, 2007; MORAES, 2010). O Curraleiro consegue passar por períodos de restrição alimentar sem contrair enfermidades. Apesar de perder peso nesses períodos, consegue recuperá-lo quando as condições voltam a ser favoráveis sem a necessidade de suplementação alimentar, pois aproveitam melhor as pastagens naturais em locais adversos (SANTIN, 2008).

A morfologia característica do bovino Curraleiro (Figura 3) apresenta-se da seguinte maneira: peso mínimo de 380 quilos para os machos e 300 quilos para as fêmeas e altura mínima de 1,34 metro para os machos e 1,20 metro para as fêmeas. Possuem pelagens variadas, sendo as mais comuns a vermelha clara e a baia, com extremidades, vassoura e focinho pretos além de tonalidades escuras no chanfro e em torno dos olhos. A cabeça é pequena com chifres curtos e em forma de coroa e orelhas pequenas, revestidas internamente de pelos claros, barbela reduzida, membros delgados e bem proporcionados apresentando, especialmente os anteriores, cor escura (JULIANO, 2006; EGITO, 2007). É uma raça taurina (*Bos taurus taurus*), que por sua origem, filia-se ao tronco de raças ibéricas (*Bos taurus ibericus*) (EGITO, 2007).

A resistência do Curraleiro é popularmente conhecida e divulgada, porem ainda é escasso o embasamento científico que ratifica esta característica, que se consolidou através do tempo por meio observacional. A resistência às infecções está diretamente relacionada à resposta imune do hospedeiro. Comparações entre o bovino Curraleiro outras raças exóticas criadas na região do Cerrado mostraram que existe uma resistência natural da raça. É mais eficiente na indução de resposta imune específica após a vacinação com *Mycobacterium bovis* - BCG, comparado ao Nelore (MAGGIOLI, 2010), além de apresentar valores percentuais médios de linfócitos T e B circulantes superiores aos encontrados em raças exóticas mais comumente criadas, como Holandês, Hereford, Pardo Suíço e Jersey (MORAES, 2010).





FIGURA 3 – Animais da raça Curraleiro.



2.2.2 Bovino Pantaneiro

O bovino Pantaneiro, também conhecido como Tucura ou Cuiabano, originou-se no Pantanal mato-grossense e foi decisivo para a ocupação das áreas alagáveis daquela região, devido às suas características de fácil adequação às constantes mudanças edafoclimáticas, bastante peculiares ao bioma Pantanal (JULIANO et al., 2007a).

O Pantaneiro descende de bovinos de origem espanhola. A influência das raças portuguesas nesta raça deu-se de maneira indireta, por meio de raças já localmente adaptadas como o Franqueiro e o Curraleiro. Embora possua o bovino Curraleiro como influência, o bovino Pantaneiro constitui uma entidade genética distinta, selecionada pelo ambiente pantaneiro característico (MAZZA et al., 1994; EGITO, 2007).

Os animais possuem porte pequeno a médio, com linha dorso-lombar geralmente reta; o perfil predominante é o subconvexo (79% dos exemplares), podendo ser retilíneo em alguns casos. O focinho é negro e em 73% dos animais ocorre um anel branco ao seu redor; os chifres possuem forma arredonda saindo lateralmente para cima e para frente; as orelhas são pequenas com presença de pelos na parte interna; a pelagem é predominantemente da cor amarelo-avermelhada, com presença de tonalidades mais escuras nas extremidades e pelos brancos na porção ventral (Figura 4). Possuem temperamento dócil e calmo, quando manejados constantemente, tornando-se bravios quando mantidos isolados, sem a intervenção humana (MAZZA et al., 1994; EGITO, 2007).

A resistência natural do Pantaneiro a desafios microbiológicos, assim como no bovino Curraleiro, se consolidou por meio observacional. Porém, diferente do que ocorre com o Curraleiro, não estão disponíveis estudos que ratifiquem tal característica. Todavia, as condições que levaram à formação do bovino Pantaneiro permitem inferir que este compartilha da mesma eficiência imunológica, inerente aos bovinos localmente adaptados.

Atualmente, existem dois núcleos de conservação dessa raça, localizados na fazenda Promissão, no município de Poconé-MT e na fazenda Nhumirim da Embrapa Pantanal, no município de Corumbá-MS (JULIANO et al., 2007b).

Assim como o bovino Curraleiro, esta é uma raça taurina (*Bos taurus taurus*), que por sua origem, filia-se ao tronco de raças ibéricas (*Bos taurus ibericus*) (EGITO, 2007).



FIGURA 4 – Animais da raça Pantaneiro (JULIANO et al., 2007b).



O estudo da soropositividade e a avaliação da transmissão vertical da neosporose bovina nas raças locais brasileiras, levando em consideração a alta adaptação das mesmas às condições adversas de clima e vegetação de regiões tropicais, permitirão avaliar a importância desta enfermidade para estes rebanhos.



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a ocorrência de *N. caninum* e avaliar a probabilidade de transmissão vertical da neosporose em rebanhos bovinos das raças Curraleiro e Pantaneiro.

3.2 Objetivos específicos

Verificar a presença de anticorpos anti-*N. caninum* nas fêmeas em idade reprodutiva e de suas crias, por meio das técnicas de IFI e ELISA indireto, nos rebanhos acompanhados.

Avaliar a ocorrência de transmissão vertical de *N. caninum* em bovinos das raças Curraleiro e Pantaneiro.

Avaliar a existência de associação entre o título de anticorpos e raça das mães e a ocorrência de transmissão vertical.

Comparar a técnica de IFI e um teste ELISA comercial no diagnóstico sorológico de *N. caninum*.



4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e período de realização do estudo

As análises foram realizadas no Laboratório de Protozoologia do Centro de Parasitologia Veterinária (CPV) da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, cidade de Goiânia. O estudo foi conduzido de março de 2009 a dezembro de 2010. A metodologia aqui descrita foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, e aprovada sob o número de protocolo 056/10. O trabalho foi realizado em parceria com a Embrapa Pantanal, na pessoa da pesquisadora Dra. Raquel Soares Juliano, que se encarregou da colheita e envio das amostras do rebanho Pantaneiro ao CPV.



4.2 Animais envolvidos no estudo

Neste estudo foram utilizadas fêmeas em idade reprodutiva e suas crias, perfazendo um total de 358 animais das raças Curraleiro e Pantaneiro.

Da raça Curraleiro foram acompanhados 249 animais, 198 fêmeas e 51 bezerras, provenientes de cinco propriedades, sendo a primeira localizada em Sobradinho-DF, com 16 animais, a segunda no Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga em Cavalcante-GO, com 68 animais, a terceira localizada em Mimoso de Goiás-GO, com 83 animais, a quarta em Pilar de Goiás-GO, com 41 animais e a última em Porangatu-GO, com 41 animais.

A população de bovinos Pantaneiros proveio da propriedade Nhumirim, localizada na Embrapa – Centro de Pesquisa Avançada do Pantanal em Corumbá – MS, que dispõe de 62 fêmeas em idade reprodutiva. Destas, 47 crias foram obtidas e incluídas nas análises, totalizando 109 bovinos Pantaneiros.



4.3. Colheita de amostras

Foram colhidas amostras individuais de sangue venoso, por punção da veia jugular ou coccígea média, em tubos com tampa (Vacutainer®) sem anticoagulante, para obtenção de soro, que foi separado por centrifugação a 500 x g/10 minutos. O soro foi identificado com o número do animal e mantido a -20°C até o momento do exame.



4.4 Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum*

A detecção de anticorpos anti-*N. caninum* foi feita por meio das técnicas de ELISA utilizando kit comercial (*Neospora caninum* Antibody Test Kit – HerdChek® IDEXX Laboratories), e imunofluorescência indireta (IFI) utilizando como substrato antigênico taquizoítos de *N. caninum*, amostra Nc-1 (DUBEY et al., 1988b), obtidos pela multiplicação destes em cultivo de células Vero, conduzido de acordo com o descrito por ÁLVAREZ-GARCÍA et al. (2002).

Os taquizoítos, depois de obtidos, foram lavados, contados, fixados em formol e utilizados para preparar lâminas demarcadas para IFI (12 círculos, lapidada - Perfecta®). Nove microlitros da suspensão de 10^7 taquizoítos foram adicionados em cada círculo da lâmina, que foi seca em temperatura ambiente. Esta foi então levada ao freezer (-20°C) por um mínimo de 24 horas para a fixação dos taquizoítos na superfície da cavidade.

Antes de proceder à reação, as lâminas foram retiradas do freezer e estabilizadas novamente à temperatura ambiente. Então, nove microlitros do soro a ser testado, diluído na proporção de 1:200 em solução salina fosfatada tamponada (PBS 1X), foram depositados sobre cada cavidade e sua posição na lâmina foi registrada. Em cada lâmina, foram utilizados controles positivos e negativos, constituídos por soros de animais previamente examinados. Foi realizada incubação por 30 minutos em estufa a 37°C, seguida de duas lavagens de dez minutos cada, com PBS 1X, em agitação. Os espaços entre os círculos foram secos com papel toalha, a fim de evitar a mescla do conjugado entre cavidades vizinhas. Foram adicionados então nove microlitros do conjugado anti-

IgG bovina-fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína – FITC, Sigma[®]), diluído na proporção de 1:150 em PBS 1X e Azul de Evans a 0,2%. Nova incubação foi realizada, nas mesmas condições da primeira, porém em recipiente que impedia a entrada da luz, devido às características do conjugado. Após a segunda incubação, novo processo de lavagem foi iniciado, desta vez com duas etapas em PBS 1X (dez minutos cada) e uma terceira etapa com água destilada (também por dez minutos), novamente em agitação. As lâminas foram então secas à temperatura ambiente (abrigadas da luz), e depois cobertas com glicerina tamponada e lamínula. A leitura foi realizada em microscópio invertido equipado para fluorescência (Carl Zeiss[®] Axiovert 40 CFL), em objetiva de 40x. A reação foi considerada positiva quando se observou fluorescência em toda a superfície do parasito (Figura 5), em uma diluição do soro $\geq 1:200$. As amostras positivas nesta diluição foram submetidas à titulação, em diluições ao dobro, até que fosse obtido resultado negativo.

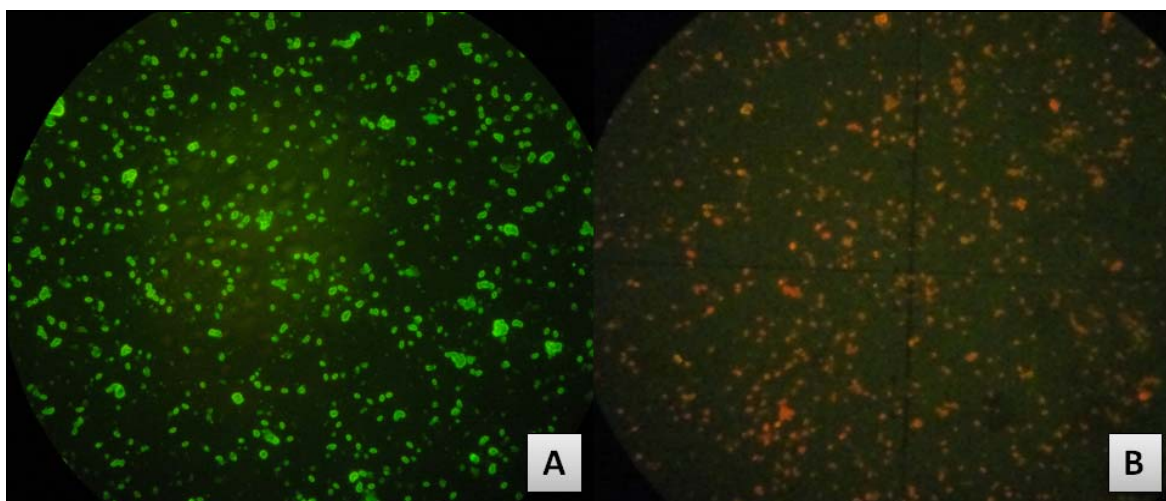


FIGURA 5 – Reação de imunofluorescência indireta para anticorpos anti-*N. caninum* em soro bovino. **(A)** Reação positiva, apresentando fluorescência consistente em toda a superfície do taquizoíto (40x). **(B)** Reação negativa (40x). △

Nas reações de ELISA, todo o protocolo foi conduzido segundo as recomendações do fabricante, utilizando-se os controles fornecidos pelo kit. O resultado da reação foi obtido através da leitura da densidade óptica (DO) das amostras em teste em leitora própria (BIOTEK[®] ELx800 Absorbance Microplate Reader), com base na DO dos controles positivo e negativo, em filtro de 630

nanômetros. Considerou-se positiva a amostra que apresentou razão S/P maior ou igual a 0,50. O kit utiliza anticorpo secundário conjugado à peroxidase, e peróxido de hidrogênio como substrato enzimático, associado a um cromógeno (3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina - TMB), resultando em cor azul nas amostras positivas (Figura 6).

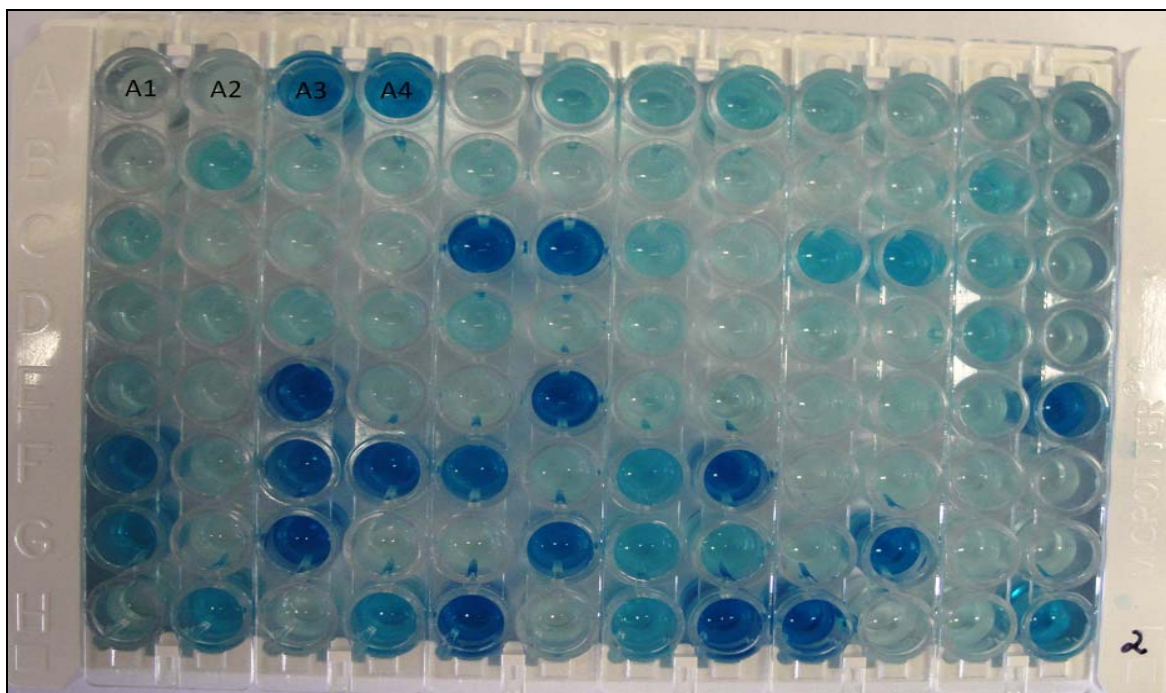


FIGURA 6 – Placa de ELISA indireto. Em A1 e A2, controles negativos; em A3 e A4, controles positivos. Amostras positivas têm coloração azul escuro, porém somente são consideradas como tal quando apresentam razão S/P maior ou igual a 0,50.



4.5 Avaliação da transmissão vertical

Para a avaliação da transmissão vertical de *N. caninum* as fêmeas em estado de prenhez, soropositivas ou não, foram acompanhadas. Amostras de sangue de suas crias foram colhidas conforme descrito no item 4.3, sendo posteriormente analisadas para a detecção de anticorpos frente ao parasito como descrito no item 4.4.

O momento de colheita destas amostras foi determinado de acordo com a característica de manejo que a propriedade em questão apresenta. Assim sendo, nas propriedades criadoras de Curraleiro onde foi possível o

acompanhamento dos nascimentos (Mimoso de Goiás-GO, Pilar de Goiás-GO e Porangatu-GO), foram colhidas amostras de sangue das crias antes da ingestão de colostro, para a verificação da ocorrência de transmissão vertical de *N. caninum*. Esta etapa do estudo contou com a colaboração dos funcionários das propriedades, que foram encarregados do acompanhamento dos nascimentos e colheitas, sendo adequadamente treinados para tal tarefa.

Na impossibilidade de realizar a colheita antes da ingestão do colostro devido ao manejo extensivo dos animais, como ocorreu na população de Pantaneiros, foram colhidas amostras de sangue dos bezerros logo após o nascimento (em média até três dias depois), seguidas de quatro colheitas sucessivas até os dez meses de idade, totalizando cinco colheitas. Assim, foi possível verificar a cinética da resposta imune frente ao parasito e comprovar ou não a transmissão vertical, visto que anticorpos colostrais permanecem por até 21 semanas, declinando até a negatividade (CARDOSO et al., 2008), enquanto que anticorpos resultantes de infecção congênita permanecem.



4.6 Tratamento estatístico dos dados

Este estudo se classifica no modelo epidemiológico analítico observacional de coorte. A probabilidade de ocorrência de transmissão vertical foi verificada pela seguinte fórmula, na qual X corresponde à frequência de bezerros positivos nascidos de vacas positivas e Y corresponde à frequência de bezerros negativos nascidos de vacas positivas:

$$P = \frac{X}{(X + Y)}$$

O intervalo de confiança foi medido pela fórmula:

$$P \pm 1,96 \sqrt{p(1-p)/(x+y)}$$

A existência de relações entre o título da mãe e a transmissão vertical de *N. caninum* foi avaliada pelo teste do Qui-quadrado (χ^2) (SAMPAIO, 2007), aplicando-se a correção de Yates quando necessário. A existência e grau de associação entre raça e ocorrência de transmissão vertical foram verificados pelo cálculo do intervalo de Odds Ratio (OR). O nível de concordância entre as técnicas de diagnóstico utilizadas foi determinado utilizando-se índice Kappa (κ).



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características dos rebanhos

As propriedades criadoras de gado Curraleiro acompanhadas apresentaram características comuns entre si. Em suma, são propriedades que possuem rebanho de tamanho pequeno a médio, sendo que a criação de Curraleiro não é a principal exploração da fazenda. A reposição de matrizes e reprodutores é realizada com animais da própria fazenda, o comércio entre os criadores e mesmo com outros criadores da raça não é frequente. Não há manejo nutricional diferenciado, exceto a mineralização do rebanho, que é criado de forma semi-extensiva, em áreas de vegetação nativa (Cerrado). O calendário imunoprofilático contempla brucelose, raiva, febre aftosa e clostridioses. A exploração econômica dos animais é discreta, onde existe a prática de castração de parte dos machos para abate e a ordenha de algumas fêmeas. A carne e leite obtidos são destinados para consumo próprio, sendo relatada produção leiteira variando entre três e oito litros diários. Proprietários e capatazes destacam o sabor e maciez diferenciados da carne do Curraleiro.

As informações sobre parâmetros reprodutivos são predominantemente observacionais, o que não confere exatidão. A reprodução ocorre por meio de monta natural, sem estação definida. Não foram relatados problemas reprodutivos tais como abortamento ou natimortalidade. Produtores destacam como característica marcante nos rebanhos Curraleiros a beleza dos animais, rusticidade e facilidade na criação, demonstrando inclusive satisfação em criar a raça e grande interesse na sua conservação.

Estas observações estão de acordo com estudo publicado por FIORAVANTI et al. (2008), que realizaram um trabalho de caracterização das propriedades criadoras da raça. Segundo os autores, estas fazendas apresentam de baixo a médio nível tecnológico, pouco custo de produção e baixo retorno econômico, levando em consideração para este julgamento pontos como registro de índices zootécnicos, suplementação nutricional, uso da estação de monta e assistência técnica especializada.

O rebanho Pantaneiro apresenta sistema de criação extensivo, sendo que os animais são recolhidos para manejo geral duas vezes ao ano. O calendário imunoprofilático contempla brucelose, raiva, febre aftosa e clostridioses. Em relação às doenças da esfera reprodutiva, de acordo com acompanhamento dos pesquisadores responsáveis, não são observados animais soropositivos para brucelose, havendo soropositividade para IBR e BVDV.

As taxas reprodutivas do rebanho são consideradas compatíveis com as condições do bioma Pantanal, sendo o fator limitante nutricional. Abortamentos são raros, não havendo possibilidade de diferenciação entre natimortos e mortalidade neonatal. A constatação da ocorrência de algum problema relacionado à morte da cria é possível apenas por meio da visualização da mãe com sinais de parto (vaca “suja”), e sem bezerro ao pé. Se isso ocorre antes da estação de nascimentos, é indicativo de abortamento. Em geral, não se tem acesso aos produtos abortados ou bezerros natimortos, pois é muito frequente a predação destes por carnívoros silvestres. A mortalidade pós-natal observada se dá, principalmente, devido à presença de miíase umbilical.

Em estudo realizado por JULIANO et al. (2007b), foram apresentadas características do rebanho Pantaneiro, que são basicamente criação extensiva a pasto nativo, taxa de natalidade de 70%, sendo por vezes superior à taxa encontrada na bovinocultura de corte tradicional do Pantanal (CATTO & FILHO, 2003), utilização da estação de monta, taxa de reposição com animais de outros rebanhos nula e redução acentuada na soropositividade para brucelose nos últimos anos. PELLEGRIN et al. (1997) consideram as fêmeas Pantaneiras como sendo de boa fertilidade, superior às fêmeas Nelore da mesma região.



5.2 Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum*

Dos 358 animais analisados, 249 eram pertencentes a rebanho Curraleiro e 109 a rebanho Pantaneiro. A ocorrência total de anticorpos anti-*N. caninum*, nas duas raças, foi de 47,49% (170/358). Os valores de soropositividade individuais de cada raça foram 51% (127/249) para o gado Curraleiro e 39,45% (43/109) para o gado Pantaneiro. Ao analisar a ocorrência por propriedade

envolvida, observou-se que 100% (6/6) das fazendas apresentaram animais positivos. Os valores por raça e por propriedade obtidos estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

TABELA 1 – Ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos Curraleiros e Pantaneiros, provenientes de unidades de criação em Goiás e Mato Grosso do Sul, respectivamente, realizada por imunofluorescência indireta (título $\geq 1:200$) e ELISA (S/P $\geq 0,50$), 2010

Raça	Anticorpos anti- <i>N. caninum</i>		TOTAL
	Positivos (%)	Negativos	
Curraleiro	127 (51,00%)	122 (49,00%)	249
Pantaneiro	43 (39,45%)	66 (60,55%)	109
TOTAL	170 (47,49%)	188 (52,51%)	358

TABELA 2 – Ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* por propriedade avaliada, em bovinos Curraleiros e Pantaneiros, provenientes de unidades de criação em Goiás e Mato Grosso do Sul, respectivamente, realizada por imunofluorescência indireta (título $\geq 1:200$) e ELISA (S/P $\geq 0,50$), 2010

Propriedade	Anticorpos anti- <i>N. caninum</i>		TOTAL
	Positivos (%)	Negativos	
Sobradinho-DF	5 (31,25%)	11 (68,75%)	16
Mimoso de Goiás-GO	31 (37,35%)	52 (62,65%)	83
Cavalcante-GO	54 (79,41%)	14 (20,59%)	68
Pilar de Goiás-GO	18 (43,9%)	23 (56,1%)	41
Porangatu-GO	19 (46,34%)	22 (53,66%)	41
Corumbá-MS	43 (39,45%)	66 (60,55%)	109
TOTAL	170 (47,49%)	188 (52,51%)	358

O valor total de ocorrência obtido neste estudo 47,49% (170/358) demonstra que *N. caninum* está amplamente distribuído nos rebanhos das raças locais brasileiras – Curraleiro e Pantaneiro. No cenário mundial, o valor deste estudo se mostra superior ao de estudos de soroprevalência realizados na Suécia (16% - aptidão leite) e na Holanda (41% - aptidão corte) (BARTELS et al., 2006a), na Espanha (17,9% - aptidão corte e 35,9% - aptidão leite) (QUINTANILLA-GOZALO et al., 1999), na Coreia (4,1% - aptidão corte) (KIM et al., 2002), no Japão (1,5% - aptidão corte e 20% - aptidão leite) (KOIWA et al., 2005), na Nova Zelândia (33,61% - aptidão leite) (REICHEL & PFEIFFER, 2002), no Senegal (17,9% - aptidão leite) (KAMGA-WALADJO et al., 2010), no Canadá (5,6% - aptidão leite) (VANLEEUEWEN et al., 2005), nos Estados Unidos (16% aptidão corte e leite) (RODRIGUEZ et al., 2002) e na Argentina (4,7% - aptidão corte e 16,6% - aptidão leite) (MOORE et al., 2002).

Por outro lado, resultados superiores foram relatados na Alemanha (49% - aptidão leite), na Espanha (63% - aptidão leite), na Holanda (76% - aptidão leite e 61% - aptidão corte) (BARTELS et al., 2006a) e nos Estados Unidos (82% - aptidão corte) (McALLISTER et al., 2000).

No cenário nacional, situação semelhante é constatada, com estudos apresentando valores de soropositividade inferiores e superiores ao valor aqui relatado. Taxas de animais positivos inferiores foram relatadas nos diversos estados da Federação: 23,7%/aptidão leite/Rio de Janeiro (MUNHOZ et al., 2006), 20%/aptidão corte/São Paulo (SARTOR et al., 2005), 16,8%/aptidão leite/Minas Gerais (MINEO et al., 2006), 17,8%/aptidão leite/Rio Grande do Sul (CORBELLINI et al., 2006), 33%/aptidão não informada/Paraná (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2008), 14,09%/aptidão leite/Bahia (GONDIM et al., 1999a), 34,75%/aptidão leite/Pernambuco (SILVA et al., 2008), 9,7%/aptidão mista/Rondônia (AGUIAR et al., 2006) e 14,9%/aptidão corte, leite e mista/Mato Grosso do Sul (OSHIRO et al., 2007).

Resultados nacionais acima do encontrado neste estudo foram relatados por TEIXEIRA et al. (2010) (50,74%/aptidão leite/Maranhão), BENETTI et al. (2009) (53,54%/aptidão leite/Mato Grosso), ANDREOTTI et al. (2004) (62,57%/aptidão corte/Mato Grosso do Sul) e por GUEDES et al. (2008) (69,21%/aptidão leite/Minas Gerais).

No estado de Goiás, MELO et al. (2006) reportaram prevalências de 30,4% em gado de leite, 29,6% em gado de corte e 43,3% em rebanho de aptidão mista, nas microrregiões de Goiânia e Anápolis. SCHULZE (2008), estudando a prevalência em todo o estado, observaram taxas de 56,6% em rebanhos leiteiros, 26,2% em rebanhos para corte e 44,6% nos de aptidão mista. OLIVEIRA et al. (2010) relataram 21,82% de soropositividade em animais de aptidão para corte/mista em propriedade na cidade de Nerópolis.

São escassos os estudos de soroprevalência em rebanhos de raças localmente adaptadas. Na África, 2,6% dos bovinos de raças locais do continente foram positivos para anticorpos anti-*N. caninum* (JOSHUA et al., 2002), valor bastante inferior ao encontrado neste estudo. Porém, esta comparação deve ser realizada com cautela dadas as diferenças que certamente existem entre a realidade de criação naquele continente e no continente latino-americano. Além disso, diferença também é encontrada na técnica adotada, pois no estudo citado, foram consideradas positivas apenas amostras fluorescentes na diluição 1:640 ou superior. ÁLVAREZ-GARCÍA (2003) afirma que diferenças estatisticamente significativas podem ser encontradas entre números de prevalência de uma mesma população obtidos com ponto de corte mais baixo (1:250) e mais alto (1:640). Em rebanho ainda não estudado, como acontece nas raças locais, seria recomendada a adoção de pontos de corte mais baixos, objetivando uma maior sensibilidade para uma primeira abordagem.

JULIANO (2006) em relato de pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* em rebanho Curraleiro, encontrou 38,24% dos animais positivos, em rebanhos de Goiás e Tocantins. É importante salientar que no estudo citado, todas as categorias animais foram incluídas, enquanto que aqui, apenas as fêmeas em idade reprodutiva e suas crias foram contempladas, já que se objetivou avaliar a transmissão vertical. Em estudo semelhante, porém abordando apenas fêmeas Curraleiras em idade reprodutiva nos mesmos Estados, SANTIN (2008) verificou que 45,8% destas estavam soropositivas para *N. caninum*. Estes registros, embora inferiores aos aqui obtidos, indicam a ampla distribuição da neosporose bovina nos rebanhos Curraleiros, especialmente em fêmeas adultas. Os rebanhos envolvidos neste estudo não haviam sido contemplados com um estudo desta natureza, e resultaram em uma taxa de soropositividade superior ao observado

nos trabalhos citados. Para o rebanho Pantaneiro, o único registro de soroprevalência até o momento para *N. caninum* foi publicado por JULIANO et al. (2006), que encontraram 26,51% e 40,87% em duas populações distintas, sendo o primeiro dado obtido no mesmo rebanho avaliado neste estudo. Esta observação revela um incremento considerável na soropositividade daquele rebanho, demonstrando que a enfermidade está em evolução nesta população, necessitando de monitoramento e controle.

Nota-se que os maiores valores de prevalência são descritos em rebanhos de aptidão leiteira. Os rebanhos Curraleiro não têm aptidão específica, sendo utilizados para muitos fins, inclusive cultural (festas de carro de boi) e turístico (prática de ecoturismo). Entretanto, devido até mesmo às características da exploração destes animais, os mesmos se enquadram em rebanho de aptidão mista, fornecendo carne e leite, dentro de suas características produtivas particulares. Já o rebanho Pantaneiro, devido ao tipo de criação extensiva ao qual é submetido, e para fins de comparação, aproxima-se de um rebanho de aptidão corte, embora não haja exploração comercial no momento por se tratar de um rebanho de unidade de conservação da raça.

Assim sendo, o alto índice de prevalência encontrado no Curraleiro ultrapassa, porém com valores ainda próximos, outros estudos onde foram avaliados rebanhos de aptidão mista (MELO et al., 2006; SCHULZE, 2008). Entretanto, para o rebanho Pantaneiro, o índice encontrado foi bastante alto quando comparado a estudos em gado de corte (SARTOR et al., 2005; MELO et al., 2006; OSHIRO et al., 2007; SCHULZE, 2008), ficando inferior para apenas um relato (ANDREOTTI et al., 2004). Um fato que pode ajudar a explicar as altas taxas obtidas é a reposição de animais ser praticamente só com animais do próprio rebanho. ÁLVAREZ-GARCÍA (2003) destaca esta prática como fator importante na manutenção da enfermidade no rebanho, perpetuando-se pela via transplacentária e contribuindo para altas taxas de positividade.

Existe uma semelhança sorológica entre bovinos Curraleiros e outras raças locais como a Caracu, submetidas às mesmas condições de ambiente, alimentação e manejo. Quando comparados a raças zebuínas como Guzerá e Nelore criadas da mesma forma e num mesmo ambiente, o Curraleiro apresenta maior soropositividade (SANTIN, 2008), característica provavelmente atribuída à

alta taxa de reposição de matrizes com fêmeas do próprio plantel, reforçando a transmissão vertical como importante no incremento de animais positivos no rebanho.

DUBEY & LINDSAY (2006) apontam como estratégia eficaz de controle o descarte seletivo de fêmeas soropositivas, evitando assim novos abortamentos ou a transmissão vertical. Porém esta prática é difícil nestes rebanhos, visto que se trata de raças que estavam (e estudiosos consideram que ainda estão) ameaçadas de extinção, constituídas de poucos exemplares, especialmente o gado Pantaneiro. Assim não parece coerente, em um rebanho que visa a conservação da raça, eliminar fêmeas com boa capacidade materna diante da soropositividade para *N. caninum*, até mesmo porque a neosporose bovina parece não afetar os parâmetros reprodutivos das raças envolvidas, pois não foram relatados tais problemas. Porém, é preciso o monitoramento destes rebanhos a fim de identificar se esta situação se modificou. Diante de um surto de abortamentos, confirmada a causa por *N. caninum*, o descarte das vacas positivas deve ser realizado, em benefício do rebanho.

A ocorrência de anticorpos por propriedade encontrada neste estudo (100% - 6/6) mostrou o quanto o parasito está difundido nestes rebanhos. Valores altos de soroprevalência por propriedade também foram relatados, por exemplo, por PARÉ et al. (1998), encontrando de 73% a 100% dos rebanhos infectados no Canadá, por RODRIGUEZ et al. (2002), que encontrou em 90% dos rebanhos testados nos Estados Unidos, por MELO et al. (2006), que encontrou 100% de propriedades positivas nas microrregiões de Anápolis e Goiânia e por SCHULZE (2008) que obteve prevalência por propriedade de 83,43% em todo o estado de Goiás. No trabalho de JULIANO (2006), também foi observado 100% de propriedades positivas.

É importante reforçar que a realização de comparações de resultados da soroprevalência de anticorpos anti-*N. caninum* obtidos, com resultados de outros estudos, deve ser analisada levando em consideração diferenças que ocorrem em função do país ou da região estudada, da técnica de diagnóstico empregada, do ponto de corte adotado, do tipo de exploração, presença de antecedentes de falhas reprodutivas, dentre outros fatores (GUIMARÃES Jr. et al., 2004; GARCIA, 2005). Ainda assim, tais estudos são de extrema importância,

pois constituem uma forma eficiente de mapeamento da distribuição da infecção nos rebanhos (ATKINSON et al., 2000b), devendo ser incentivados diante do fato de existirem regiões onde ainda se desconhece a situação da neosporose bovina.

Não foi aqui avaliada a presença de cães domésticos e sua relação com a soropositividade bovina nas propriedades, embora em todas houvesse pelo menos um cão com acesso às instalações dos bovinos. Diversos autores avaliaram a ocorrência de bovinos positivos e a presença de cães, encontrando correlação significativa (MOORE et al., 2002; SÁNCHEZ et al., 2003; GUIMARÃES Jr. et al., 2004; BARTELS et al., 2007), ou não (RODRIGUEZ et al., 2002; OSHIRO et al., 2007; SCHULZE, 2008). Deve-se ainda levar em consideração a possibilidade de contaminação dos rebanhos por meio da participação de animais silvestres (GONDIM et al., 2004c; ROSYPAL & LINDSAY, 2005; GONDIM, 2006; KING et al., 2011), pois a presença destes é comum no Cerrado e no Pantanal.

A análise referente ao título de anticorpos observados nos animais positivos para IFI obteve-se, entre os Curraleiros, a maioria dos positivos com título 1:200 (43 animais), sendo que o maior título encontrado foi 1:6400 (cinco animais). Entre os animais Pantaneiros, dois títulos detiveram a maioria dos animais soropositivos: 1:200 (nove animais) e 1:3200 (nove animais). O maior título encontrado neste rebanho foi de 1:25600 (dois animais). A Figura 7 traz um gráfico com a apresentação dos títulos encontrados e o número de animais em cada nível de titulação, separados por raça e também somados.

Variados títulos são descritos na literatura, de acordo com o ponto de corte adotado em cada estudo. A partir de 1:100 e 1:200 (ponto de corte mais comumente utilizado), foram relatados títulos tão altos quanto 1:1600, 1:6400 e 1:12800 (SARTOR et al., 2003; CARDOSO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010). Não é frequente a observação de título tão alto quanto o obtido no rebanho Pantaneiro, em infecção natural, sendo encontrado apenas um relato na literatura consultada, descrito por FIORETTI et al. (2003).

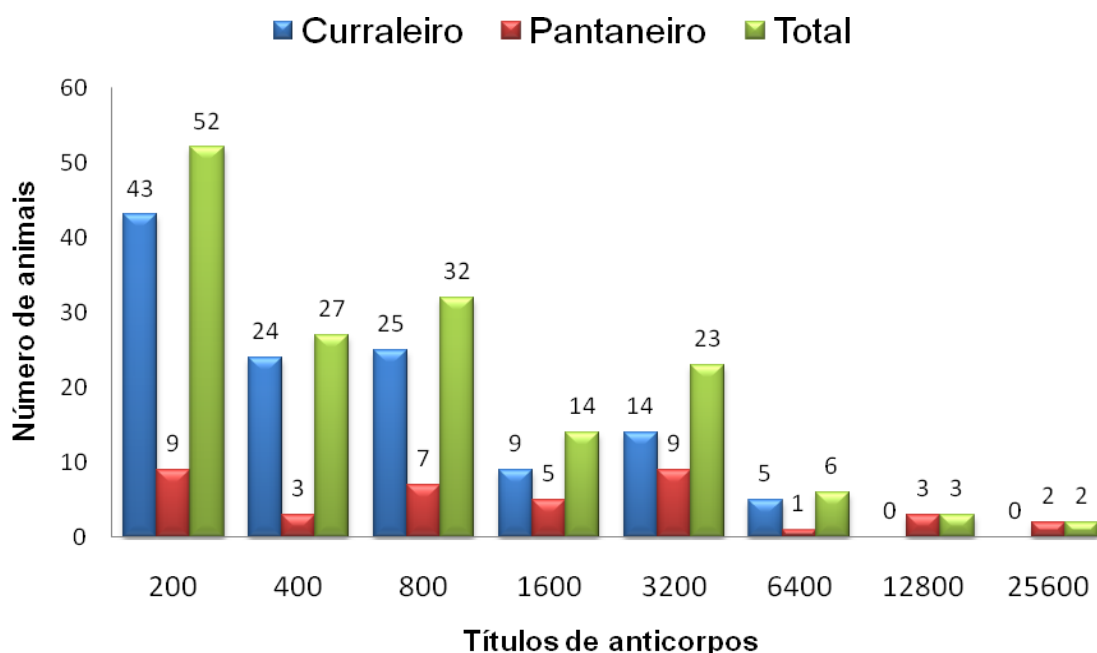


FIGURA 7 – Títulos de anticorpos anti-*Neospora caninum* obtidos por imunofluorescência indireta (título $\geq 1:200$) em bovinos das raças Curraleiro e Pantaneiro, provenientes de unidades de criação em Goiás e Mato Grosso do Sul, respectivamente, 2010 $\triangle$

Apesar da oscilação de anticorpos, comum em bovinos, provocar a recomendação de coleta seriada para melhor avaliação do rebanho (ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003), a metodologia realizada neste trabalho, que contemplou apenas uma colheita por animal (exceto nos bezerros pantaneiros, para avaliação da transmissão vertical) garante segurança na determinação da soroprevalência, de acordo com estudos que, ao realizarem o procedimento seriado, não encontraram diferença significativa entre os valores de soropositividade, sugerindo que apenas um exame do rebanho já é capaz de demonstrar o cenário da doença naqueles animais (McALLISTER et al., 2000; DIJKSTRA et al., 2003).

$\triangle$

5.3 Avaliação da transmissão vertical

Das propriedades envolvidas no estudo, foi possível o acompanhamento das fêmeas, com posterior acesso ao soro das crias em três fazendas criadoras de Curraleiro (Mimoso de Goiás-GO, Pilar de Goiás-GO e

Porangatu-GO), além da propriedade criadora do rebanho Pantaneiro. Nesta, diante da impossibilidade de acesso aos bezerros no momento em que nascem, foi utilizada a ferramenta da coleta seriada, realizada em cinco momentos até os dez meses de idade das crias. Nos animais Curraleiros, foi possível a colheita do sangue no momento do nascimento, permitindo a verificação da transmissão vertical com apenas este material.

A taxa de transmissão vertical geral observada nos rebanhos foi de 51% (95%, IC 37%-64%). Separando por raça, no gado Curraleiro esta taxa foi de 48% (95%, IC 30%-66%). Na população de Pantaneiros, este valor foi superior, ficando em 54% (95%, IC 35%-73%). Os valores de transmissão obtidos estão expostos nas Tabelas 3, 4 e 5, para taxa geral, rebanho Curraleiro e rebanho Pantaneiro, respectivamente.

TABELA 3 – Ocorrência de transmissão vertical de *N. caninum* em bovinos Curraleiros e Pantaneiros, provenientes de unidades de criação em Goiás e Mato Grosso do Sul, respectivamente, 2010

Animais	Bezerros positivos	Bezerros negativos	Total
Filhos de vacas sorologicamente positivas	22	26	48
Filhos de vacas sorologicamente negativas	5	45	50
Total	27	71	98



TABELA 4 – Ocorrência de transmissão vertical de *N. caninum* em bovinos Curraleiros, provenientes de unidades de criação em Goiás, 2010

Animais	Bezerros positivos	Bezerros negativos	Total
Filhos de vacas sorologicamente positivas	10	15	25
Filhos de vacas sorologicamente negativas	4	22	26
Total	14	37	51

TABELA 5 – Ocorrência de transmissão vertical de *N. caninum* em bovinos Pantaneiros, provenientes de unidade de criação em Mato Grosso do Sul, 2010

Animais	Bezerros positivos	Bezerros negativos	Total
Filhos de vacas sorologicamente positivas	12	11	23
Filhos de vacas sorologicamente negativas	1	23	24
Total	13	34	47



A taxa de transmissão vertical em raças locais nacionais obtida neste estudo (51%) se mostrou elevada quando comparada aos estudos de GONDIM et al. (2004b) (35%/aptidão corte/Estados Unidos), de MORÉ et al. (2009) (37,1%/aptidão leite/Argentina) e de OLIVEIRA et al. (2010) (24%/aptidão mista/Goiás). Por outro lado, taxas maiores foram relatadas por DAVISON et al. (1999) (95,2%/aptidão leite/Reino Unido), por ROMERO & FRANKENA (2003)

(64%/aptidão leite/Costa Rica), por HALL et al. (2005) (75%/aptidão leite/Austrália), por GARCIA (2005) (62,5%/aptidão leite/Goiás) e por BARTELS et al. (2007) (61,8%/aptidão leite/Holanda).

Mais uma vez, presumindo que os rebanhos Curraleiros se enquadram nas características de aptidão mista, temos que a taxa de transmissão vertical nestes (48%) está acima do relatado em rebanho com aptidão semelhante por OLIVEIRA et al. (2010), de 24%. Isso pode ser explicado pelo fato de o rebanho envolvido no estudo de OLIVEIRA et al., (2010) ser pertencente a uma central de transferência de embriões, onde sabe-se que existe um controle maior das receptoras com relação aos problemas reprodutivos, sendo o descarte das fêmeas problemáticas uma prática comum. Por outro lado, como mencionado anteriormente, esse descarte rotineiro não é observado no rebanho Curraleiro e a reposição se dá com fêmeas do próprio rebanho. Além disso, sabe-se que o uso da tecnologia de transferência de embriões é um meio eficiente de se evitar a transmissão transplacentária, desde que sejam utilizadas receptoras negativas (BAILLARGEON et al., 2001; CAMPERO et al., 2003; OLIVEIRA et al, 2010).

Da mesma forma, admitindo ser o gado Pantaneiro de características de rebanho de corte, sua taxa de transmissão vertical (54%) é bastante superior ao relatado por GONDIM et al. (2004b), de 35% em rebanho de corte. Aqui, novamente a característica de reposição com fêmeas do próprio rebanho pode explicar este fato.

A detecção de anticorpos pré-colostrais anti-*N. caninum* em bezerros nascidos de mães sorologicamente negativas foi observada em cinco ocasiões. Estas ocorrências indicam que as vacas, apesar de seu estado sorológico negativo, estavam infectadas. Tal fato pode ser explicado pela flutuação de anticorpos característica em bovinos, onde após uma infecção prévia, os níveis de anticorpos podem declinar com o passar do tempo, até um patamar não detectável pelas técnicas utilizadas, podendo voltar a se elevar em ocasiões de recrudescência (FRÖSSLING et al., 2005; LÓPEZ-GATIUS et al., 2004; DUBEY et al., 2007). A presença do ciclo com transmissão horizontal nas propriedades é outro aspecto que pode explicar a ocorrência, aqui observada, de bezerros positivos filhos de mães negativas. A mãe pode ter se infectado horizontalmente no período decorrido entre a colheita do soro e o parto, apresentando uma

infecção aguda durante a gestação e transmitindo a infecção à cria. Das quatro ocorrências desta natureza no rebanho Curraleiro, três foram de uma mesma propriedade, fato que reforça essa teoria, sugerindo que, no período de estudo, houve participação de hospedeiro definitivo infectando o rebanho.

É fato que a transmissão vertical é a forma de propagação da infecção predominante nos rebanhos (FRÖSSLING et al., 2005; DUBEY et al., 2007) e importante na epidemiologia da neosporose bovina (WILLIAMS et al., 2009). Tal assertiva foi mais uma vez confirmada neste estudo, dadas as altas prevalências e taxas de transmissão transplacentária observadas. Entretanto, não se deve atribuir toda a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* à transmissão vertical, devido a provável presença de transmissão horizontal e a possível interferência do ciclo silvestre da neosporose nos rebanhos estudados. FRENCH et al. (1999) afirmaram que a ocorrência de alguma infecção pós-natal, mesmo que em menores proporções, é essencial para a manutenção do parasito no rebanho.

A colheita seriada de amostras nos bezerros pantaneiros permitiu ainda a observação de outro parâmetro: o momento no qual os anticorpos colostrais desapareciam. Assim constatou-se, nos bezerros que apresentaram anticorpos colostrais, que estes permaneceram por aproximadamente quatro semanas (quatro animais), oito semanas (dois animais), 12 semanas (três animais), 16 semanas (um animal) e 20 semanas (um animal), quando então, após estes períodos, não foram mais detectados. Esta observação está de acordo com o relato de CARDOSO et al. (2008), que afirmaram que o anticorpo colostrar para *N. caninum* pode permanecer por até 21 semanas após o nascimento nos bezerros, evidenciando a importância da exclusão dos animais de até quatro meses de idade nos estudos de soroprevalência, para impedir os resultados falso-positivos. Durante o estudo, não houve situação de animal que iniciou a pesquisa soronegativo e soroconverteu nas colheitas posteriores, fato que poderia representar a infecção pós-natal (via horizontal).

Ao final da gestação, o feto já apresenta resposta imune competente à infecção, e a detecção de anticorpos pré-colostrais muitas vezes apresenta títulos superiores aos das mães (ÁLVAREZ-GARCÍA, 2003). Isto foi observado neste estudo onde, dos 22 bezerros positivos (que caracterizaram a transmissão vertical), 11 apresentaram títulos de anticorpos superiores ao de suas mães, sete

apresentaram títulos menores e quatro apresentaram o mesmo título que suas mães. Tal fato foi mais frequente no rebanho Pantaneiro (nove dos 11 citados).

Visto que a transmissão vertical ocorre em valores consideráveis nos rebanhos Curraleiro e Pantaneiro, é interessante se pensar em monitorá-los sorologicamente e identificar as bezerras positivas tentando, dentro das limitações já discutidas, não utilizá-las para reposição.



5.4 Associação entre títulos das fêmeas e ocorrência de transmissão vertical

Avaliando a possibilidade de relação entre o título de anticorpos das vacas e a ocorrência de transmissão vertical, não houve diferença estatisticamente significativa entre estas variáveis, demonstrando que não há relação entre elas. Em outras palavras, a transmissão vertical de *N. caninum* nos rebanhos Curraleiro e Pantaneiro pode ocorrer independentemente do título de anticorpos que as fêmeas estejam apresentando. Os números de bezerras positivos e negativos, de acordo com a titulação das mães estão apresentados na Tabela 6.

TABELA 6 – Associação entre título de anticorpos maternos anti-*N. caninum* e ocorrência de transmissão vertical em bovinos Curraleiros e Pantaneiros, provenientes de unidades de criação em Goiás e Mato Grosso do Sul, respectivamente, 2010

Título materno	Bezerros positivos	Bezerros negativos	Total
1:200	8	6	14
≥ 1:400	14	20	34
Total	22	26	48

$\chi^2 = 1,018$; Yates = 0,477 ($p > 0,001$)



Esta observação discorda do estudo de MORÉ et al. (2009) e OLIVEIRA et al. (2010), que observaram que vacas com título maior ou igual a 1:400 tiveram maior taxa de transmissão vertical. Nas raças aqui estudadas, não

houve este padrão, sendo que mesmo vacas com título 1:200 apresentaram transmissão vertical.



5.5 Associação entre raça e ocorrência de transmissão vertical

Não houve associação estatisticamente significativa entre a raça e a ocorrência de transmissão vertical nas populações (OR 0,79; IC 0,27-2,34 95%). Assim, a ocorrência ou não de transmissão transplacentária nos animais estudados não está ligada à raça, ocorrendo de maneira semelhante em ambas.

As associações comumente encontradas correlacionam raça (ou grupo de raças, de acordo com aptidões) e soropositividade para *N. caninum*. Presumindo ser possível assumir que quanto mais soropositivo é um rebanho, maiores são as chances de ocorrência de transmissão vertical (ROMERO & FRANKENA, 2003), observamos que este meio de transmissão está mais associado a rebanhos leiteiros em primeiro lugar, seguido dos rebanhos de aptidão mista e dos rebanhos de corte em terceiro. MUNHOZ et al. (2009) relataram animais da raça Holandês Preto e Branco com até 2,65 vezes mais chances de serem positivos quando comparados com animais zebuínos e cruzados. Entretanto, nos rebanhos aqui avaliados este padrão não foi observado, mesmo se tratando de animais com características próximas a rebanhos de aptidão mista (Curraleiro) e corte (Pantaneiro).

Em outra abordagem tais avaliações, embora atribuam maior ou menor soropositividade à característica de manejo dos animais, dentre outros fatores, acabam por sugerir raças possivelmente mais resistentes aos efeitos deletérios da neosporose bovina, visto que são observados diferentes números de animais positivos em raças distintas, porém criadas em ambiente e manejo semelhantes. Além disso, também se observam rebanhos onde a soropositividade é alta e a ocorrência de manifestação clínica característica é rara, como nos rebanhos de raças locais aqui avaliados.

Dentre as características apresentadas pelos bovinos Curraleiro e Pantaneiro, certamente sua resistência a doenças e parasitas é a que mais se destaca e desperta interesse. A resistência natural a algumas enfermidades

refere-se à capacidade inerente de um animal resistir à determinada doença quando exposto a patógenos, sem que tenha havido imunização ou exposição prévia a este agente (WESTHUSIN et al., 2007). Embora amplamente difundida entre produtores e conhecedores das raças, esta característica ainda possui escasso embasamento científico que corrobore a observação dos criadores. Partindo da premissa que a resistência às infecções está diretamente relacionada à resposta imune do hospedeiro, os estudos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de identificar particularidades na imunologia destes animais, que expliquem sua maior resistência.

Comparando raças locais e animais mestiços, resultantes do cruzamento de raças exóticas, os bovinos locais apresentam maior eficiência na construção da resposta da imunidade inata, tida como primeira linha de defesa do organismo contra patógenos (JULIANO, 2006). Objetivando verificar a existência de diferença na resposta imune de animais Curraleiros e outras raças exóticas criadas na região do Cerrado, MAGGIOLI (2010) avaliou bezerros Curraleiros e Nelores após a vacinação com *Mycobacterium bovis*- BCG. Como resultado, concluiu que existe uma resistência do bovino Curraleiro quando comparado ao Nelore, devido a sua melhor capacidade de induzir resposta imune específica à vacina.

Em estudo comparativo, MORAES (2010) concluiu que bovinos Curraleiros apresentam valores percentuais médios de linfócitos T e B circulantes superiores aos encontrados em raças exóticas mais comumente criadas, como Holandês, Hereford, Pardo Suíço e Jersey, sendo apenas o valor percentual de células T da raça Hereford assemelhando ao do Curraleiro.

De acordo com BITTAR et al. (2004), o perfil fenotípico do sangue periférico de bovinos europeus pode influenciar o padrão de imunidade clínica apresentado por eles, sendo os níveis de linfócitos T e B circulantes associados à maior resistência para infecções parasitárias. Uma elevada razão T/B pode ser associada à resistência clínica de bovinos Hereford à babesiose, demonstrando que as diferenças no perfil celular devem ser consideradas nos estudos de imunidade desencadeada por doenças infectoparasitárias. Assim, baseado em tais observações, fica evidente a existência uma resistência natural do bovino Curraleiro, conferida por suas particularidades imunológicas.

É fato que a comprovação da resistência dos animais a uma só doença, a princípio, pode não estar relacionada à resistência a outras enfermidades. Entretanto, o processo de ativação de grupos de células hospedeiras pode apresentar similaridades que determinarão a sobrevivência de patógenos com característica biológica semelhante, como o desenvolvimento intracelular. (ADAMS & TEMPLETON, 1998). Os consideráveis números de soropositividade e transmissão vertical aqui observados, associados ao fato de que a neosporose bovina parece não afetar os parâmetros reprodutivos das raças envolvidas, pois não foram relatados tais problemas, evidenciam que a característica de resistência destes animais se estende também ao *N. caninum*.

Sabendo da necessidade de maiores estudos, tal característica poderia inclusive ser herdável em utilizações futuras do material genético destes bovinos em programas de melhoramento. Observação nesse sentido foi realizada por ALMERÍA et al. (2009), relatando que a utilização de sêmen de touros de raças de corte, tidas como possivelmente mais resistentes ao *N. caninum*, reduziu drasticamente o risco de abortamento em vacas leiteiras. Isso é bastante desejável por se tratar de uma enfermidade causadora de grandes prejuízos à produção e ainda sem vacina ou tratamento eficaz.



5.6 Nível de concordância entre as técnicas sorológicas

Avaliando separadamente os índices de soropositividade, de acordo com as técnicas empregadas detectou-se pela técnica de IFI, 48,19% (120/249) de reagentes no rebanho Curraleiro e 34,86% (38/109) de reagentes no rebanho Pantaneiro. Pela técnica de ELISA, 14,46% (36/249) e 34,86% (38/109) dos animais foram positivos, para os rebanhos Curraleiro e Pantaneiro, respectivamente.

A concordância geral verificada entre as técnicas sorológicas utilizadas foi considerada moderada-baixa ($\kappa = 0,34$). Foi feita uma análise separada por raça, onde a concordância observada nas análises dos soros Curraleiros foi muito baixa ($\kappa = 0,20$), em oposição à concordância obtida nos soros Pantaneiros, considerada moderada-alta ($\kappa = 0,71$). Esta observação difere do obtido por

CAETANO-DA-SILVA et al. (2004a), que encontraram uma boa concordância entre os dois métodos ($\kappa = 0,87$).

Não é raro observar discrepâncias entre números de soropositividade em uma mesma população. Como dito, é preciso considerar diferenças entre técnicas e principalmente o ponto de corte adotado. Ao comparar os níveis de acordo entre diferentes testes (IFI em vários pontos de corte e ELISA comercial *HerdChek*® IDEXX), SCHARES et al. (1998) observaram que tal concordância varia bastante conforme se altera o ponto de corte de IFI, encontrando concordância muito baixa ($\kappa = 0,202$) quando foi adotado ponto de corte 1:200 na IFI, resultado semelhante ao deste estudo.

Discordâncias também foram observadas e relatadas entre os diferentes testes de ELISA, comerciais e *in house*, sendo atribuídas mais uma vez aos diferentes pontos de corte adotados (SCHARES et al., 1999).

REICHEL & PFEIFFER (2002), objetivando avaliar os níveis de sensibilidade e especificidade de testes de ELISA, comparando-os com a IFI, observaram que nas amostras positivas a 1:200 na IFI e analisadas pelo ELISA comercial (*HerdChek*® IDEXX) respeitando o ponto de corte recomendado, resultaram em sensibilidade de 50% e especificidade de 98%. Ou seja, das amostras positivas para IFI nesta diluição, o teste de ELISA conseguiu identificar apenas a metade, porém com alta confiabilidade. O autor ainda recomenda que, para obtenção de níveis de sensibilidade e especificidade iguais (de 81%), o ponto de corte deveria ser reduzido de 0,50 para 0,11.

Ainda segundo os mesmos autores, quando o mesmo procedimento foi repetido, porém utilizando 1:600 como parâmetro na IFI, os valores de sensibilidade e especificidade do ELISA foram 77% e 95%, respectivamente. Ou seja, a sensibilidade do ELISA comercial melhora quando se têm títulos mais altos. Neste estudo, grande parte dos títulos encontrados no gado Curraleiro na IFI foram baixos (1:200). Assim, o teste de ELISA da maneira como foi conduzido (com ponto de corte 0,50, conforme recomendado) não foi capaz de detectar todas as amostras positivas com títulos abaixo de 1:400 (Tabela 7). Isso explica a baixa concordância entre os testes.

TABELA 7 – Comparação entre título de anticorpos na IFI e positividade no teste de ELISA em soros de bovinos Curraleiros, provenientes de unidades de criação em Goiás, 2010

IFI +	ELISA +	ELISA -	Total
1:200	1	42	43
≥ 1:400	29	48	77
Total	30	90	120

$\chi^2 = 18,375$; Yates = 16,539 ($p > 0,001$)

△

Nos animais Pantaneiros, o maior número de animais com título alto foi fator determinante para uma melhor concordância entre as técnicas de diagnóstico.

△

6 CONCLUSÕES

Os resultados aqui obtidos permitem as seguintes conclusões:

N. caninum está presente nos rebanhos de raças locais brasileiras Curraleiro e Pantaneiro, estando amplamente distribuído nas propriedades avaliadas.

Os animais apresentam uma amplitude de títulos, que vão desde o ponto de corte adotado (1:200) até títulos de 1:25600.

A transmissão vertical está presente em ambos os rebanhos estudados, em taxas consideravelmente altas, sendo possivelmente o principal modo de transmissão encontrado nestas populações.

Não há associação entre o título das mães e a ocorrência de transmissão vertical.

Não há associação entre a ocorrência de transmissão vertical e a raça.

Não houve boa concordância entre as técnicas de IFI e ELISA indireto utilizadas. A técnica de IFI deve ser adotada como padrão.



REFERÊNCIAS

1. ADAMS, L. G.; TEMPLETON, J. W. Genetic resistance to bacterial diseases of animals. **Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties**, Paris, v. 17, n. 1, p. 200-219, abr. 1998.
2. AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; RODRIGUES, A. A. R.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; CAMARGO, E. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 142, n. 1-2, p. 71-77, nov. 2006. [doi:10.1016/j.vetpar.2006.06.014](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.06.014)
3. ALMERÍA, S.; LÓPEZ-GATIUS, F.; GARCÍA-ISPIERTO, I.; NOGAREDA, C.; BECH-SÀBAT, G.; SERRANO, B.; SANTOLARIA, P.; YÁNIZ, J. L. Effects of crossbreed pregnancies on the abortion risk of *Neospora caninum*-infected dairy cows. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 163, n. 4, p. 323-329, ago. 2009. [doi:10.1016/j.vetpar.2009.04.026](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.04.026)
4. AL-QASSAB, S.; REICHEL, M. P.; IVENS, A.; ELLIS, J. T. Genetic diversity amongst isolates of *Neospora caninum*, and the development of a multiplex assay for the detection of distinct strains. **Molecular and Cellular Probes**, Londres, v. 23, n. 3-4, p. 132-139, jun./ago. 2009. [doi:10.1016/j.mcp.2009.01.006](https://doi.org/10.1016/j.mcp.2009.01.006)
5. ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; PEREIRA-BUENO, J.; GÓMES-BAUTISTA, M.; ORTEGA-MORA, L. M. Pattern of recognition of *Neospora caninum* tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted fetuses. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 107, n. 1-2, p. 15-27, jul. 2002. [doi:10.1016/S0304-4017\(02\)00091-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00091-2)
6. ÁLVAREZ-GARCÍA, G. **Identificación y caracterización de antígenos de *Neospora caninum* con interés inmunodiagnóstico en bovinos**. 2003. 301f. Tese (Doutorado) – Departamanto de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
7. ANDERSON, M. L.; BLANCHARD, P. C.; BARR, B. C.; DUBEY, J. P.; HOFFMAN, R. L.; CONRAD, P. A. Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 198, n. 2, p. 241-244, jan. 1991.
8. ANDERSON, M. L.; REYNOLDS, J. P.; ROWE, J. D.; SVERLOW, K. W.; PACKHAM, A. E.; BARR, B. C.; CONRAD, P. A. Evidence of vertical transmission of *Neospora caninum* infection in dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 210, n. 8, p. 1169-1172, abr. 1997.
9. ANDERSON, M. L. Infectious causes of bovine abortion during mid - to late -gestation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 68, n. 3, p. 474-486, ago. 2007. [doi:10.1016/j.theriogenology.2007.04.001](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.001)

10. ANDREOTTI, R.; PINCKNEY, R. D.; PIRES, P. P.; SILVA, E. A. E. Evidence of *Neospora caninum* in beef cattle and dogs in the state of Mato Grosso do Sul, center-western region, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 129-131, jul./set. 2004.
11. ATKINSON, R.; HARPER, P. A. W.; RYCE, C.; MORRISON, D. A.; ELLIS, J. T. Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. **Parasitology**, Londres, v. 118, n. 4, p. 363-370, abr. 1999.
12. ATKINSON, R. A.; COOK, R. W.; REDDACLIFF, L. A.; ROTHWELL, J.; BROADY, K. W.; HARPER, P. A. W.; ELLIS, J. T. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in a dairy cattle herd. **Australian Veterinary Journal**, Victoria/AU, v. 78, n. 4, p. 262-266, abr. 2000a. doi: [10.1111/j.1751-0813.2000.tb11752.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2000.tb11752.x)
13. ATKINSON, R.; HARPER, P. A.; REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 16, n. 3, p. 110-114, mar. 2000b. doi: [10.1016/S0169-4758\(99\)01604-X](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01604-X)
14. BAE, J. S.; KIM, D. Y.; HWANG, W. S.; KIM, J. H.; LEE, N. S.; NAM, H. W. Detection of IgG antibody against *Neospora caninum* in cattle in Korea. **The Korean Journal of Parasitology**, Seul, v. 38, n. 4, p. 245-249, dez. 2000. doi: [10.3347/kjp.2000.38.4.245](https://doi.org/10.3347/kjp.2000.38.4.245)
15. BAILLARGEON, P.; FECTEAU, G.; PARE, J.; LAMOTHE, P.; SAUVE, R. Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 218, n. 11, p. 1803-1806, jun. 2001. doi: [10.2460/javma.2001.218.1803](https://doi.org/10.2460/javma.2001.218.1803)
16. BARLING, K. S.; MCNEILL, J. W.; THOMPSON, J. A.; PASCHAL, J. C.; MCCOLLUM III, T.; CRAIG, T. M.; ADAMS, L. G. Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 217, n. 9, p. 1356-1360, nov 2000. doi: [10.2460/javma.2000.217.1356](https://doi.org/10.2460/javma.2000.217.1356)
17. BARR, B. C.; ANDERSON, M. L.; DUBEY, J. P.; CONRAD, P. A. Neospora-like protozoal infections associated with bovine abortions. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 28, n. 2, p. 110-116, mar. 1991. doi: [10.1177/030098589102800202](https://doi.org/10.1177/030098589102800202)
18. BARTELS, C. J. M.; WOUDA, W.; SCHUKKEN, Y. H. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997). **Theriogenology**, Stoneham v. 52, n. 2, p. 247-257, jul. 1999. doi: [10.1016/S0093-691X\(99\)00126-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00126-0)

19. BARTELS, C. J. M.; ARNAIZ-SECO, J. I.; RUIZ-SANTA-QUITERA, A.; BJÖRKMAN, C.; FRÖSSLING, J.; VON BLUMRÖDER, D.; CONRATHS, F. J.; SCHARES, G.; VAN MAANEN, C.; WOUDA, W.; ORTEGA-MORA, L. M. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, the Netherlands, Spain and Sweden. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 137, n. 1-2, p. 17-27, abr. 2006a. [doi:10.1016/j.vetpar.2005.12.016](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.12.016)
20. BARTELS, C. J. M.; VAN SCHAIK, G.; VELDHUISEN, J. P.; VAN DEN BORNE, B. H. P.; WOUDA, W.; DIJKSTRA, T. Effect of *Neospora caninum* serostatus on culling, reproductive performance and milk production in Dutch dairy herds with and without a history of *Neospora caninum*-associated epidemics. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdã, v. 77, n. 3-4, p. 186-198, dez. 2006b. [doi:10.1016/j.prevetmed.2006.07.003](https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2006.07.003)
21. BARTELS, C. J. M.; HOGVEEN, H.; VAN SCHAIK, G.; WOUDA, W.; DIJKSTRA, T. 2006. Estimated economic losses due to *Neospora caninum* infection in dairy herds with and without a history of *Neospora caninum* associated abortion epidemics. In: International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics, 11., 2006, Devon/UK. **Proceedings...** Devon/UK: Exeter University, mar. 2006c, p. 191-201.
22. BARTELS, C. J. M.; HUININK, I.; BEIBOER, M. L.; VAN SCHAIK, G.; WOUDA, W.; DIJKSTRA, T.; STEGEMAN, A. Quantification of vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* infection in Dutch dairy herds. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 148, n. 2, p. 83-92, set. 2007. [doi:10.1016/j.vetpar.2007.06.004](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.06.004)
23. BASSO, W.; SCHARES, S.; MINKE, L.; BÄRWALD, A.; MAKSIMOV, A.; PETERS, M.; SCHULZE, C.; MÜLLER, M.; CONRATHS, F.J.; SCHARES, G. Microsatellite typing and avidity analysis suggest a common source of infection in herds with epidemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 173, n. 1-2, p. 24-31, out. 2010. [doi:10.1016/j.vetpar.2010.06.009](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.009)
24. BENETTI, A. H.; SCHEIN, F. B.; SANTOS, T. R.; TONIOLO, 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, supl. 1, p. 29-33, dez. 2009. [doi:10.4322/rbpv.018e1005](https://doi.org/10.4322/rbpv.018e1005)
25. BECK, H. P.; BLAKE, D.; DARDÉ, M. L.; FELGER, I.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; REGIDOR-CERRILLO, J.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.; ORTEGA-MORA, L. M.; PUTIGNANI, L.; SHIELS, B.; TAIT, A.; WEIR, W. Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 175-189, jan. 2009. [doi:10.1016/j.ijpara.2008.10.001](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.10.001)

26. BIANCHINI, E.; MCMANUS, C.; LUCCI, C. M.; FERNANDES, M. C. B.; PRESCOTT, E.; MARIANTE, A. S.; EGITO, A. A. Características corporais associadas com a adaptação ao calor em bovinos naturalizados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 9, p. 1443-1448, set. 2006.
27. BIELSA, J. M.; ROMERO, J. J.; HEUER, C. Controle de Neosporose em bovinos com Bovilis® Neoguard: a experiência de campo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 13, suplemento 1, set. 2004.
28. BITTAR, J. F. F.; RIBEIRO, M. F. B.; MARCIANO, A. P. V.; SALCEDO, J. H. P.; MARTINS FILHO, O. A. Perfil fenotípico de linfócitos periféricos de bovinos de raças européias. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 1, p. 107-110, fev. 2004. doi: [10.1590/S0102-09352004000100016](https://doi.org/10.1590/S0102-09352004000100016)
29. BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming Sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, Berlim, v. 70, n. 2, p. 271-274, mar. 1984. doi: [10.1007/bf00942230](https://doi.org/10.1007/bf00942230)
30. BJERKAS, I.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 1, n. 2, p. 214-221, mar. 1994.
31. BJÖRKMAN, C.; LUNDÉN, A.; HOLMDAHL, J.; BARBER, J.; TREES, A. J.; UGGLA, A. *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 16, n. 12, p. 643-648, dez. 1994. doi: [10.1111/j.1365-3024.1994.tb00320.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1994.tb00320.x)
32. BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, Nova Iorque, v. 29, n. 10, p. 1497-1507, out. 1999. doi: [10.1016/S0020-7519\(99\)00115-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00115-0)
33. BOGER, L. A.; HATTEL, A. L. Additional evaluation of undiagnosed bovine abortion cases may reveal fetal neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 113, n. 1, p. 1-6, abr. 2003. doi: [10.1016/S0304-4017\(03\)00041-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00041-4)
34. BRAUTIGAM, F. E.; HIETALA, S. K.; GLASS, R. Resultados de levantamento sorológico para a espécie *Neospora* em bovinos de corte e leite. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15, 1996, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: PANVET, 1996, p. 284.
35. BRYAN, L. A.; GAJADHAR, A. A.; DUBEY, J. P.; HAINES, D. M. Bovine neonatal encephalomyelitis associated with a *Neospora* sp. protozoan. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 35, n. 2, p. 111-113, fev. 1994.

36. BUXTON, D.; McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 12, p. 546-552, dez. 2002. [doi:10.1016/S1471-4922\(02\)02414-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02414-5)
37. CABRAL, A. D.; CAMARGO, C. N.; GALLETI, N. T. C.; OKUDA, L. H.; PITUCO, E. M.; DEL FAVA, C. Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histology, immunohistochemistry, and nested-PCR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 4, p. 14-19, out./ dez. 2009. [doi:10.4322/rbpv.01804003](https://doi.org/10.4322/rbpv.01804003)
38. CAETANO-DA-SILVA, A.; FERRE, I.; ADURIZ, G.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; DEL-POZO, I.; ATXAERANDIO, R.; REGIDOR-CERRILLO, J.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L. M. *Neospora caninum* infection in breeder bulls: seroprevalence and comparison of serological methods used for diagnosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 124, n. 1-2, p. 19-24, set. 2004a. [doi:10.1016/j.vetpar.2004.06.023](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.06.023)
39. CAETANO-DA-SILVA, A.; FERRE, I.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; NAVARRO, V.; ADURIZ, G.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L. M. Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. **Theriogenology**, Stoneham v. 62, n. 7, p. 1329-1336, out. 2004b. [doi:10.1016/j.theriogenology.2004.01.010](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.01.010)
40. CAMPERO, C. M.; MOORE, D. P.; LAGOMARSINO, H.; ODEÓN, A. C.; CASTRO, M.; VISCA, H. Serological status and abortion rate in progeny obtained by natural service or embryo transfer from *Neospora caninum*-seropositive cows. **Journal of Veterinary Medicine B**, Berlim, v.50, n. 9, p.458-460, nov. 2003. [doi:10.1046/j.0931-1793.2003.00698.x](https://doi.org/10.1046/j.0931-1793.2003.00698.x)
41. CANADA, N.; MEIRELES, C. S.; FERREIRA, J.; COSTA, M. C.; ROCHA, A. Artificial insemination of cows with semen *in vitro* contaminated with *Neospora caninum* tachyzoites failed to induce neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 139, n. 1-3, p. 109-114, jun. 2006. [doi:10.1016/j.vetpar.2006.02.014](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.02.014)
42. CARDOSO, J. M.; FUNADA, M. R.; SOARES, R. M.; GENNARI, S. M. Perfil sorológico dos anticorpos colostrais para *Neospora caninum* em bezerros livres da infecção. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, n. 5, p. 379-384, maio 2008.
43. CARDOSO, J. M. S.; NISHI, S. M.; FUNADA, M. R.; AMAKU, M.; GUIMARÃES JÚNIOR, J. S.; GENNARI, S. M. Antibody dynamics during gestation in cows naturally infected with *Neospora caninum* from four dairy herds in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 46, n. 5, p. 395-399, set. 2009.
44. CATTO, J. B.; FILHO, J. A. C. Taxa de Natalidade no Rebanho Bovino no Pantanal: Nutrição, Sanidade e Genética. Comunicado Técnico/Embrapa Pantanal, Corumbá, n. 29, p. 1-8, nov. 2003. Disponível em:

<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/COT29.pdf>. Acesso em: 06 jan. 2011.

45. CHI, J.; VANLEEUEWEN, J. A.; WEERSINK, A.; KEEFE, G. P. Management factors related to seroprevalences to bovine viral-diarrhoea virus, bovine-leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in dairy herds in the Canadian Maritimes. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdã, v. 55, n. 1, p. 57-68, set. 2002. [doi:10.1016/S0167-5877\(02\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(02)00067-3)
46. COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ZABALLOS, A.; ÁLVAREZGARCIA, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 4, p. 1194-1198, abr. 2002. [doi:10.1128/jcm.40.4.1194-1198.2002](https://doi.org/10.1128/jcm.40.4.1194-1198.2002)
47. COLLANTES-FERNÁNDEZ, E. **Patogenia de la neosporosis en el feto bovino y en un modelo murino experimental**. 2003. 277f. Tese (Doutorado) – Departamanto de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
48. CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C. F. E.; GONDIM, L. F. P.; WALD, W. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 103, n. 3, p. 195-202, jan. 2002. [doi:10.1016/S0304-4017\(01\)00600-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00600-8)
49. CORBELLINI, L. G.; SMITH, D. R.; PESCADOR, C. A.; SCHMITZ, M.; CORREA, A.; STEFFEN, D. J.; DRIEMEIER, D. Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in Southern Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdã, v. 74, n. 2-3, p. 130-141, maio 2006. [doi:10.1016/j.prevetmed.2005.11.004](https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.11.004)
50. CONRAD, P. A.; BARR, B. C.; SVERLOW, K. W.; ANDERSON, M.; DAFT, B.; KINDE, H.; DUBEY, J. P.; MUNSON, L.; ARDANS, A. *In vitro* isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine foetuses. **Parasitology**, Londres, v. 106, n.3, p.239-249, abr. 1993a. [doi: 10.1017/s0031182000075065](https://doi.org/10.1017/s0031182000075065)
51. CONRAD, P. A.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M.; ROWE, J.; BONDURANT, R.; TUTER, G.; BREITMEYER, R.; PALMER, C.; THURMOND, M.; ARDANS, A. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 5, n. 4, p. 572-578, out. 1993b.
52. DAVISON, H. C.; OTTER, A.; TREES, A. J. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. **International Journal for Parasitology**, Nova Iorque, v. 29, n. 10, p. 1683-1689, out. 1999. [doi:10.1016/S0020-7519\(99\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00129-0)
53. DAVISON, H. C.; GUY, C. S.; McGARRY, J. W.; GUY, F.; WILLIAMS, D. J. L.; KELLY, D. F.; TREES, A. J. Experimental studies on the transmission of

Neospora caninum between cattle. **Research in Veterinary Science**, Londres, v. 70, n. 2, p. 163-168, abr. 2001. [doi:10.1053/rvsc.2001.0457](https://doi.org/10.1053/rvsc.2001.0457)

54. DE MAREZ, T.; LIDDELL, S.; DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; GASBARRE, L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. **International Journal for Parasitology**, Nova Iorque, v. 29, n. 10, p. 1647-1657, out. 1999. [doi:10.1016/S0020-7519\(99\)00154-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00154-X)

55. DIJKSTRA, T. H.; BARKEMA, W.; EYSKER, M.; HESSELINK, J. W.; WOUDE, W. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 105, n. 2, p. 99-104, abr. 2002. [doi:10.1016/S0304-4017\(02\)00010-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00010-9)

56. DIJKSTRA, T. H.; BARKEMA, W.; EYSKER, M.; BEIBOER, M. L.; WOUDE, W. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 110, n. 3-4, p. 161-169, jan. 2003. [doi:10.1016/S0304-4017\(02\)00323-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00323-0)

57. DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 192, p. 1269-1285, maio 1988a.

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

59. DUBEY, J. P.; LEATHERS, C. W.; LINDSAY, D. S. *Neospora caninum*-like protozoan associated with fatal myelitis in newborn calves. **The Journal of Parasitology**, Lincoln/NE, v. 75, n. 1, p. 146-148, fev. 1989.

60. DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; ANDERSON, M. L.; DAVIS, S. W.; SHEN, S. K. Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 201, n. 5, p. 709-713, set. 1992.

61. DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 67, n. 1-2, p. 1-59, dez. 1996. [doi:10.1016/S0304-4017\(96\)01035-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(96)01035-7)

62. 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 for Parasitology**,

Nova Iorque, v. 32, n. 8, p. 929-946, jul. 2002. [doi:10.1016/S0020-7519\(02\)00094-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00094-2)

63. DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, Seul, v. 41, n. 1, p.1-16, mar. 2003. [doi:10.3347/kjp.2003.41.1.1](https://doi.org/10.3347/kjp.2003.41.1.1).

64. DUBEY, J. P.; ZARNKE, R.; THOMAS, N. J.; WONG, S. K.; VAN BONN, W.; BRIGGS, M.; DAVIS, J. W.; EWING, R.; MENSE, M.; KWOK, O. C. H.; ROMAND, S.; THULLIE, P. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 116, n. 4, p. 275-296, out. 2003. [doi:10.1016/S0304-4017\(03\)00263-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00263-2)

65. DUBEY, J. P.; BUXTON, D.; WOUDE, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 134, n. 4, p. 267-289, maio 2006. [doi:10.1016/j.jcpa.2005.11.004](https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.11.004)

66. DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 22, n. 3, p. 645-671, nov. 2006. [doi:10.1016/j.cvfa.2006.08.001](https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2006.08.001)

67. DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 140, n. 1-2, p. 1-34, ago. 2006. [doi:10.1016/j.vetpar.2006.03.035](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.035)

68. DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical microbiology Reviews**, Washington, v. 20, n. 2, p. 323-367, abr. 2007. [doi:10.1128/CMR.00031-06](https://doi.org/10.1128/CMR.00031-06)

69. DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; RAJENDRAN, C.; MISKA, K.; FERREIRA, L. R.; MARTINS, J.; KWOK, O. C. H.; CHOUDHARY, S. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, 2011 (Article in Press). [doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.018](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.018)

70. ELLIS, J.; LUTON, K.; BAVERSTOCK, P. R.; BRINDLEY, P. J.; NIMMO, K. A.; JOHNSON, A. M. The phylogeny of *Neospora caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdã, v. 64, n. 2, p. 303-311, abr. 1994. [doi:10.1016/0166-6851\(94\)00033-6](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)00033-6)

71. EGITO, A. A. **Diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em microssatélites e haplótipos de DNA mitocondrial: subsídios para a conservação**. 2007. 246 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas, universidade de Brasília, Brasília.

72. ENTRICAN, G. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in Infectious abortion. **Journal of Comparative Pathology**, Edimburgo, v. 126, n. 2-3, p. 79-94, fev. 2002. [doi:10.1053/jcpa.2001.0539](https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0539)
73. FANTI, J. H. N.; BARIONI, G.; BELTRAME, M. A. V.; Soroprevalência de *Neospora caninum* em propriedades do município de Barra de São Francisco, Espírito Santo, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, Suplemento 1 – Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, p. 637-641, out. 2009
74. FERNANDES, P. R. **Neospora caninum: diagnóstico e caracterização genética em fetos de fêmeas zebuínas abatidas, Goiás, Brasil**. 2010. 95 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
75. FERRE, I.; ADURIZ, G.; DEL-POZO, I.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ATXAERANDIO, R.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; HURTADO, A.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L. M. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, n. 5, p. 1504-1518, mar. 2005. [doi:10.1016/j.theriogenology.2004.07.002](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.07.002)
76. FIORAVANTI, M. C. S.; JULIANO, R. S.; COSTA, G. L.; ABUD, L. J.; CARDOSO, W. S. Características dos criatórios de bovinos da raça Curraleiro nos estados de Goiás e Tocantins. In: Simpósio Nacional do Cerrado e II Simpósio Internacional de Savanas Tropicais, 9., 2008, Brasília. **Anais...** Brasília:Embrapa Cerrados, out. 2008. Disponível em: http://simposio.cpac.embrapa.br/simposio_pc210/trabalhos_pdf/00621_trab2_ap.p df. Acesso em: 22 jun. 2009.
77. FIORETTI, D. P.; PASQUAI, P.; DIAFERIA, M.; ROSIGNOLI, L. *Neospora caninum* infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. **Journal of Veterinary Medicine B**, Berlim, v. 50, n. 8, p. 399-404, out. 2003. [doi: 10.1046/j.1439-0450.2003.00686.x](https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00686.x)
78. FRENCH, N. P.; CLANCY, D.; DAVISON, H. C.; TREES, A. J. Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. **International Journal for Parasitology**, Nova Iorque, v. 29, n. 10, p. 1691-1704, out. 1999. [doi:10.1016/S0020-7519\(99\)00131-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00131-9)
79. FRÖSSLING, J.; BONNETT, B.; LINDBERG, A.; BJÖRKMAN, C. Validation of *Neospora caninum* iscom ELISA without a gold standard. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdã, v. 57, n. 3, p. 141-153, mar. 2003. [doi:10.1016/S0167-5877\(02\)00216-7](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(02)00216-7)
80. FRÖSSLING, J.; UGGLA, A.; BJÖRKMAN, C. Prevalence and transmission of *Neospora caninum* within infected Swedish dairy herds. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 128, n. 3-4, p. 209-218, mar. 2005. [doi:10.1016/j.vetpar.2004.12.006](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.12.006)

81. GARCIA, D. P. **Neosporose bovina: prevalência, transmissão e diagnóstico em fetos abortados, nas microrregiões de Anápolis e Goiânia – Goiás**. 2005. 41 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
82. GARCIA-MELO, D. P.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ORTEGA-MORA, L. M.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; OLIVEIRA, V. S. F.; OLIVEIRA, M. A. P.; SILVA, A. C. Isolation and biological characterisation of a new isolate of *Neospora caninum* from an asymptomatic calf in Brazil. **Acta Parasitologica**, Warsaw, v. 54, n. 2, p. 180-185, jun. 2009. [doi: 10.2478/s11686-009-0018-2](https://doi.org/10.2478/s11686-009-0018-2)
83. GIVENS, M. D. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 66, n. 3, p. 648-654, ago. 2006. [doi:10.1016/j.theriogenology.2006.04.021](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.04.021)
84. GIVENS, M. D.; MARLEY, M. S. D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. **Theriogenology**, Stoneham, v. 70, n. 3, p. 270-285, ago. 2008. [doi:10.1016/j.theriogenology.2008.04.018](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.018)
85. GONDIM, L. F. P.; SARTOR, I. F.; MONTEIRO, L. A.; HARITANI, M. *Neospora caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington/NZ, v. 47, n. 1, p. 35-35, fev. 1999a.
86. GONDIM, L. F. P.; SARTOR, I. F.; HASEGAWA, M.; YAMANE, I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 86, n. 1, p. 71-75, set. 1999b. [doi:10.1016/S0304-4017\(99\)00129-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00129-6)
87. GONDIM, L. F. P.; PINHEIRO, A. M.; SANTOS, P. O. M.; JESUS, E. E. V.; RIBEIRO, M. B.; FERNANDES, H. S.; ALMEIDA, M. A. O.; FREIRE, S. M.; MEYER, R.; McALLISTER, M. M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 101, n. 1, p. 1-7, out. 2001. [doi:10.1016/S0304-4017\(01\)00493-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00493-9)
88. GONDIM, L. F.; GAO, L.; McALLISTER, M. M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and *in vitro* isolation from oocysts. **The Journal of Parasitology**, Lincoln/NE, v. 88, n. 6, p. 1159-1163. dez. 2002. [doi: 10.1645/0022-3395\(2002\)088\[1159:IPONCO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[1159:IPONCO]2.0.CO;2)
89. GONDIM, L. F.; McALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Nova Iorque, v.34, n. 2, p. 159-161, fev. 2004a. [doi:10.1016/j.ijpara.2004.01.001](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.01.001)
90. GONDIM, L. F. P.; McALLISTER, M. M.; ANDERSON-SPRECHER, R. C.; BJÖRKMAN, C.; LOCK, T. F.; FIRKINS, L. D.; GAO, L.; FISCHER, W. R. Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum*

oocysts. **The Journal of Parasitology**, Lincoln, v. 90, n. 6, p. 1394-1400. dez. 2004b. doi: 10.1645/GE-359R

91. GONDIM, L. F.; McALLISTER, M. M.; MATEUS-PINILLA, N. E.; PITT, W. C.; MECH, L. D.; NELSON, M. E. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. **The Journal of Parasitology**, Lincoln, v. 90, n. 6, p. 1361-1365. dez. 2004c. doi: 10.1645/GE-341R

92. GONDIM, L. F. P. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 247-252, jun. 2006. doi:10.1016/j.pt.2006.03.008

93. GOTTSTEIN, B.; RAZMI, G. R.; AMMANN, P.; SAGER, H.; MÜLLER, N. Toltrazuril treatment to control diaplacental *Neospora caninum* transmission in experimentally infected pregnant mice. **Parasitology**, Londres, v. 130, n. 1, p. 41-48, 2005. doi: 10.1017/s0031182004006365

94. GUEDES, M. H. P.; GUIMARÃES, A. M.; ROCHA, C. M. B. M.; HIRSCH, C. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas e fetos provenientes de municípios do sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, n. 4, p. 189-194, out./set. 2008.

95. GUIMARÃES Jr., J. S.; SOUZA, S. L. P.; BERGAMASCHI, D. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 124, n. 1-2, p. 1-8, set. 2004. doi:10.1016/j.vetpar.2004.07.002

96. HADDAD, J. P. A.; DOHOO, I.; VANLEEUEWEN, J. A.; KEEFE, G.; WEERSINK, A. Perdas na produção e custos no tratamento em rebanhos leiteiros canadenses infectados com *Neospora caninum*. In: Fórum Brasileiro de Estudos sobre *Neospora caninum*, 1., 2005, São Paulo. **Anais...** São Paulo:CBPV, set. 2005, p. 30. Disponível em: http://www.cbpv.com.br/artigos/CBPV_Anais_Neospora.pdf. Acesso em: 18 jun. 2009.

97. HALL, S.J.G.; BRADLEY, D.G. Conserving livestock breed biodiversity. **Trends in Ecology and Evolution**, Londres, v. 10, n. 7, p.267-270, jul. 1995. doi:10.1016/0169-5347(95)90005-5

98. HALL, C. A.; REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 128, n. 3-4, p. 231-241, mar. 2005. doi:10.1016/j.vetpar.2004.12.012

99. 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, jan./mar. 2004.

100. HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B.; KAUFMANN, H. Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. **Parasitology**, Londres, v. 112, n. 2, p. 183-197, fev. 1996. [doi: 10.1017/s0031182000084754](https://doi.org/10.1017/s0031182000084754)
101. HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B. A European perspective on *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, n. 8, p. 877-924, jul. 2000. [doi:10.1016/S0020-7519\(00\)00072-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00072-2)
102. HEMPHILL, A.; VONLAUFEN, N.; NAGULESWARAN, A. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. **Parasitology**, Londres, v. 133, n. 3, p. 261-278, jun. 2006. [doi:10.1017/S0031182006000485](https://doi.org/10.1017/S0031182006000485)
103. INNES, E. A.; PANTON, W. R.; MARKS, J.; TREES, A. J.; HOLMDAHL, O. J. M.; BUXTON, D. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum* as shown by incorporation of 3H Uracil. **Journal of Comparative Pathology**, Edimburgo, v. 113, n. 1, p. 95-100, jul. 1995. [doi:10.1016/S0021-9975\(05\)80075-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(05)80075-1)
104. INNES, E. A.; WRIGHT, S. E.; MALEY, S.; RAE, A.; SCHOCK, A.; KIRVAR, E.; BARTLEY, P.; HAMILTON, C.; CAREY, I. M.; BUXTON, D. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, Nova Iorque, v. 31, n. 13, p. 1523-1534, nov. 2001. [doi:10.1016/S0020-7519\(01\)00284-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00284-3)
105. INNES, E. A.; ANDRIANARIVO, A. G.; BJÖRKMAN, C.; WILLIAMS, D. J.; CONRAD, P. A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 11, p. 497-504, nov. 2002. [doi:10.1016/S1471-4922\(02\)02372-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02372-3)
106. INNES, E. A.; WRIGHT, S.; BARTLEY, P.; MALEY, S.; MACALDOWIE, C.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdã, v. 108, n. 1-2, p. 29-36, out. 2005. [doi:10.1016/j.vetimm.2005.07.004](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.07.004)
107. JENKINS, M.; BASZLER, T.; BJÖRKMAN, C.; SCHARES, G.; WILLIAMS, D. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **International Journal for Parasitology**, Nova Iorque, v. 32, n. 5, p. 631-636, maio 2002. [doi:10.1016/S0020-7519\(01\)00363-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00363-0)
108. JOSHUA, R. A.; OBWOLO, M. J.; GUY, Y. Serum antibody to *Neospora caninum* in indigenous African cattle. **Tropical Veterinarian**, Ibadã/NG, v. 20, n. 2, p. 57-61, mar. 2002.
109. JULIANO, R. S. **Aspectos sanitários e do sistema de fagócitos de bovinos da raça Curraleiro**. 2006. 125f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

110. JULIANO, R. S.; FIORAVANTI, M. C. S.; SILVA, A. C.; ABREU, U. G. P.; SILVA, A. R. B.; SOUZA, S. N.; SERENO, J. R. B. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* y anti-toxoplasma gondii en rebanos bovinos de la raza pantaneira. In: Simpósio Iberoamericano sobre Conservación y Utilización de Recursos Zoogenéticos, 7., 2006, Cochabamba. **Anais...** Cochabamba, dez. 2006.
111. JULIANO, R. S.; ABREU, U. G. P.; SANTOS, S. A. Conservação do patrimônio genético, cultural e modelo pecuário. **ADM-Embrapa Pantanal**, Corumbá, n. 117, p. 1-3, ago. 2007a. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2007_3/PatriGenetico/index.htm. Acesso em: 05 jan. 2011.
112. JULIANO, R. S.; FIORAVANTI, M. C. S.; ABREU, U. G. P.; SERENO, J. R. B.; JACOMINI, L. A. Situação Sanitária de bovinos Pantaneiros: brucelose e tuberculose. **Embrapa Pantanal-Circular Técnica**, Corumbá, n. 70, p. 1-4, out. 2007b. Disponível em: <http://www.pantanalecoturismo.tur.br/fotos/arquivos/2244.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2011.
113. KAMGA-WALADJO, A. R.; GBATI, O. B.; KONE, P.; LAPO, R. A.; CHATAGNON, G.; BAKOU, S. N.; PANGUI, L. J.; DIOP, P. E. 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**, Edimburgo, v. 42, n. 5, p. 953-959, jun. 2010. doi: 10.1007/s11250-009-9513-6
114. KIM, J. H., LEE, J. K., HWANG, E. K., KIM, D. Y. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in Korean native beef cattle. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tóquio. v. 64, n. 10, p. 941-943, out. 2002. doi:10.1292/jvms.64.941
115. KING, J. S.; ŠLAPETA, J.; JENKINS, D. J.; AL-QASSAB, S. E.; ELLIS, J. T.; WINDSOR, P. A. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Nova Iorque, v.40, n. 8, p. 945-950, jul. 2010. doi:10.1016/j.ijpara.2010.01.008
116. KING, J. S.; DAVID J. JENKINS, D. J.; ELLIS, J. T.; FLEMING, P.; WINDSOR, P. A.; ŠLAPETA, J. Implications of wild dog ecology on the sylvatic and domestic life cycle of *Neospora caninum* in Australia. **The Veterinary Journal**, Londres, v. 188, n. 1, p. 24-33, abr. 2011. doi:10.1016/j.tvjl.2010.03.002
117. KLEVAR, S.; KULBERG, S.; BOYSEN, P.; STORSET, A.; MOLDAL, T.; BJÖRKMAN, C.; OLSEN, I. Bovine natural killer cells act as primary responders in the early stages of *Neospora caninum* infected cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdã, v. 128, n. 1-3, p. 292-293, mar. 2009. doi:10.1016/j.vetimm.2008.10.176

118. KLEVAR, S.; NORSTRÖM, M.; THARALDSEN, J.; CLAUSEN, T.; BJÖRKMAN, C. The prevalence and spatial clustering of *Neospora caninum* in dairy herds in Norway. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 170, n. 1-2, p. 153-157, maio 2010. [doi:10.1016/j.vetpar.2010.02.005](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.005)
119. KOIWAI, M.; HAMAOKA, T.; HARITANI, M.; SHIMIZU, S.; TSUTSUI, T.; ETO, M.; YAMANE, I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle with reproductive disorders in Japan. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 130, n. 1-2, p. 15-18, jun. 2005. [doi:10.1016/j.vetpar.2005.03.009](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.03.009)
120. LANDMANN, J. K.; JILLELLA, D.; O'DONOGHUE, P. J.; MCGOWAN, M. R. Confirmation of the prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle by the use of embryo transfer. **Australian Veterinary Journal**, Victoria/AU, v. 80, n. 8, p. 502-503, ago. 2002. [doi: 10.1111/j.1751-0813.2002.tb12475.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2002.tb12475.x)
121. LARSON, R. L.; HARDIN, D. K.; PIERCE, V. L. Economic considerations for diagnostic and control options for *Neospora caninum*-induced abortions in endemically infected herds of beef cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 224, n. 10, p. 1597-1604, maio 2004. [doi: 10.2460/javma.2004.224.1597](https://doi.org/10.2460/javma.2004.224.1597)
122. LINDSAY, D.S.; DUBEY, J. P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 50, n. 11, p. 1981-1983, nov. 1989.
123. LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). **The Journal of Parasitology**, Lincoln, v. 76, n. 3, p. 410-413, jun. 1990.
124. LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 82, n. 4, p. 327-333, maio 1999. [doi:10.1016/S0304-4017\(99\)00054-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00054-0)
125. LOBATO, J.; SILVA, D. A. O.; MINEO, T. W. P.; AMARAL, J. D. H. F.; SEGUNDO, G. R. S.; COSTA-CRUZ, J. M.; FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S.; MINEO, J. R. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 13, n. 1, p. 84-89, jan. 2006. [doi:10.1128/CVI.13.1.84-89.2006](https://doi.org/10.1128/CVI.13.1.84-89.2006)
126. LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V. T.; RICHARTZ, R. R. T. B.; GASINO-JOINEAU, M. E.; VINNE, R.; PINCKNEY, R. D. Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in southern Brazil. **The Journal of Parasitology**, Lincoln, v. 87, n. 6, p. 1493-1494, dez. 2001.
127. LOCATELLI-DITTRICH, R.; DE SOUSA, R. S.; LEITE, L. C.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RICHARTZ, R. R. T. B.; JOINEAU M. E. G.; PINCKNEY, R. D. Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Parana, southern Brazil.

Veterinary Record, Londres, v. 153, n. 12, p. 366-367. set. 2003. [doi:10.1136/vr.153.12.366](https://doi.org/10.1136/vr.153.12.366)

128. LOCATELLI-DITTRICH, R.; MACHADO JR., P. C.; FRIDLUND-PLUGGE, N.; RICHARTZ, R. R. T. B.; MONTIANI-FERREIRA, F.; PATRÍCIO, L. F. L.; PATRÍCIO, M. A. C.; JOINEAU, M. G.; PIEPPE, M. Determinação e correlação de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos e cães do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, suplemento 1, p. 191-196, set. 2008.

129. LÓPEZ-GATIUS, F.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; MURUGAVEL, K.; PABÓN, M.; FERRER, D.; ALMERÍA, S. Neospora-associated Abortion Episode over a 1-Year Period in a Dairy Herd in North-east Spain. **Journal of Veterinary Medicine B**, Berlim, v. 51, n. 7, p.348-352, set. 2004. [doi: 10.1111/j.1439-0450.2004.00779.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2004.00779.x)

130. LÖSCHENBERGER K.; SZÖLGYÉNYI W.; PESCHKE R.; PROSL H. Detection of the protozoan *Neospora caninum* using in situ polymerase chain reaction. **Biotechnic & Histochemistry**, Baltimore, v. 79, n. 2, p. 101-105. jan. 2004. [doi:10.1080/10520290410001715246](https://doi.org/10.1080/10520290410001715246)

131. 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, n. 2-3, p. 142-156, ago./out. 2004. [doi:10.1016/j.jcpa.2004.02.005](https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2004.02.005)

132. MAGGIOLI, M. F. **Comparação da resposta imune induzida pela vacinação de bezerros Curraleiros e Nelores com *Mycobacterium bovis*-BCG**. 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

133. MALEY, S. W.; BUXTON, D.; RAE, A. G.; WRIGHT, S. E.; SCHOCK, A.; BARTLEY, P. M.; ESTEBAN-REDONDO, I.; SWALES, C.; HAMILTON, C. M.; SALES, J.; INNES, E. A. The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 129, n. 2-3, p. 186-195. ago./out. 2003. [doi:10.1016/S0021-9975\(03\)00032-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(03)00032-X)

134. MARTÍN-BURRIEL, I.; GARCÍA-MURO, E.; ZARAGOZA, P. Genetic diversity analysis of six Spanish native cattle breeds using microsatellites. **Animal Genetics**, Oxford, v. 30, n. 3, p.177-182, jun. 1999. [doi: 10.1046/j.1365-2052.1999.00437.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.1999.00437.x)

135. MAZZA, M. C. M.; MAZZA, C. A. S.; SERENO, J. R. B.; SANTOS, S. A.; PELLEGRIN, A. O. **Etnobiologia e Conservação do Bovino Pantaneiro**. Corumbá: Embrapa/Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, 1994. 61 p.

136. McALLISTER M. M.; DUBEY J. P.; LINDSAY D. S.; JOLLEY W. R.; WILLS R. A.; MACGUIRE A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*.

International Journal for Parasitology, Nova Iorque, v. 28, n. 9, p.1473-1478, set. 1998. [doi:10.1016/S0020-7519\(98\)00138-6](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00138-6)

137. McALLISTER, M. M.; BJÖRKMAN, C.; ANDERSON-SPRECHER, R.; ROGERS, D. G. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 217, n. 6, p. 881-887, set. 2000. [doi:10.2460/javma.2000.217.881](https://doi.org/10.2460/javma.2000.217.881)

138. MELO, C. B.; LEITE, R. C.; SOUZA, G. N.; LEITE, R. C. Frequência de infecção por *Neospora caninum* em dois diferentes sistemas de produção de leite e fatores predisponentes à infecção em bovinos em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 10, n. 2, p. 67-74, ago. 2001.

139. MELO, C. B.; LEITE, R. C.; LOBATO, Z. I. P.; LEITE, R. C. Infection by *Neospora caninum* associated with bovine herpes virus 1 and bovine viral diarrhea virus in cattle from Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 119, n. 2-3, p. 97-105, jan. 2004. [doi:10.1016/j.vetpar.2003.12.002](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.12.002)

140. 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, jul.-set. 2006.

141. MELLO, R. C.; ANDREOTTI, R.; BARROS, J. C.; TOMICH, R. G. P.; MELLO, A. K. M.; CAMPOLIM, A. I.; PELLEGRIN, A. O. Levantamento epidemiológico de *Neospora caninum* em bovinos de assentamentos rurais em Corumbá, MS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, suplemento 1, p. 311-316, set. 2008.

142. MINEO, T. W. P.; ALENIUS, S.; NÄSLUND, K.; MONTASSIER, H. J.; BJÖRKMAN, C. Distribution of antibodies against *Neospora caninum*, BVDV and BHV-1 among cows in Brazilian dairy herds with reproductive disorders. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 188-192, out./dez. 2006.

143. MINERVINO, A. H. H.; RAGOZO, A. M. A.; MONTEIRO, R. M.; ORTOLANI, E. L.; GENNARI, S. M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle from Santarém, Pará, Brazil. **Research in Veterinary Science**, Londres, v. 84, n. 2, p. 254-256, abr. 2008. [doi:10.1016/j.rvsc.2007.05.003](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.05.003)

144. MOORE, D. P.; CAMPERO, C. M.; ODEÓN, A. C.; POSSO, M. A.; CANO, D.; LEUNDA, M. R.; BASSO, W.; VENTURINI, M. C.; SPÄTH, E. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 107, n. 4, p. 303-316, ago. 2002. [doi:10.1016/S0304-4017\(02\)00129-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00129-2)

145. MORAES, J. M. **Imunofenotipagem e avaliação quantitativa de linfócitos circulantes de bovinos da raça Curraleiro**. 2010. 73 f. Dissertação (mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
146. MORÉ, G.; BACIGALUPE, D.; BASSO, W.; RAMBEAUD, M.; BELTRAME, F.; RAMIREZ, B.; VENTURINI, M.C.; VENTURINI, L. Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 160, n. 1-2, p. 51-54, mar. 2009. [doi:10.1016/j.vetpar.2008.10.081](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.081)
147. MOSKWA, B.; PASTUSIAK, K.; BIEN, J.; CABAJ, W. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. **Parasitology Research**, Berlim, v. 100, n. 3, p.633-636, fev. 2007. [doi: 10.1007/s00436-006-0288-7](https://doi.org/10.1007/s00436-006-0288-7)
148. MUGRIDGE, N. B.; MORRISON, D. A.; JAKEL, T.; HECKEROTH, A. R.; TENTER, A. M.; JOHNSON, A. M. Effects of sequence alignment and structural domains of ribosomal DNA on phylogeny reconstruction for the protozoan family sarcocystidae. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 17, n. 12, p. 1842-1853, dez. 2000.
149. MUNHOZ, A. D.; FLAUSINO, W.; SILVA, R. T.; ALMEIDA, C. R. R.; LOPES, C. W. G. Distribuição de anticorpos contra *Neospora caninum* em vacas leiteiras dos municípios de Resende e Rio Claro, estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 101-104, jul./set. 2006.
150. MUNHOZ, A. D.; PEREIRA, M. J. S.; FLAUSINO, W.; LOPES, C. W. G. *Neospora caninum* seropositivity in cattle breeds in the South Fluminense Paraíba Valley, state of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 1, p. 29-32, jan. 2009. [doi: 10.1590/S0100-736X2009000100004](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009000100004)
151. NEIVA, A. C. G. R. **Caracterização socioeconômica da comunidade quilombola Kalunga e proposta de reintrodução do bovino Curraleiro como alternativa de geração de renda**. 2009. 138 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
152. NISHIKAWA, Y.; INOUE, N.; MAKALA, L.; NAGASAWA, H. A role for balance of interferon-gamma and interleukin-4 production in protective immunity against *Neospora caninum* infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 116, n. 3, p. 175-184, out. 2003. [doi:10.1016/j.vetpar.2003.07.001](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.07.001)
153. 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, jun. 2005. [doi: 10.1590/S0102-09352005000300006](https://doi.org/10.1590/S0102-09352005000300006)

154. OLIVEIRA, M. Bem brasileiros: Embrapa intensifica estudos com raças surgidas no país que formam um rico patrimônio genético. **Revista Pesquisa FAPESP**, n. 129, nov. 2006. Disponível em: <http://revistapesquisa.fapesp.br/?art=3097&bd=1&pg=1&lg>. Acesso em 25 jun. 2009.
155. OLIVEIRA, V. S. F.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; ORTEGA-MORA, L. M.; BORGES, L. M. F.; SILVA, A. C. Abortions in bovines and *Neospora caninum* transmission in an embryo transfer center. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 173, n. 3-4, p. 206-210, out. 2010. doi:10.1016/j.vetpar.2010.06.028
156. OOI, H. K.; HUANG, C. C.; YANG, C. H.; LEE, S. H. Serological survey and first finding of *Neospora caninum* in Taiwan, and the detection of its antibodies in various body fluids of cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 90, n. 1-2, p. 47-55, jun. 2000. doi:10.1016/S0304-4017(00)00211-9
157. ORTEGA-MORA, L. M.; FERRE, I.; DEL-POZO, I.; CAETANO-DA-SILVA, A.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ADURIZ, G. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 117, n. 4, p. 301-308, nov. 2003. doi:10.1016/j.vetpar.2003.09.015
158. ORTEGA-MORA, L. M.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; GÓMEZ-BAUTISTA, M. Diagnosis of bovine neosporosis: Recent advances and perspectives. **Acta Parasitologica**, Warszawa, v. 51, n. 1, p. 1-14, fev. 2006. doi: 10.2478/s11686-006-0001-0
159. OSHIRO, L. M.; MATOS, M. F. C.; OLIVEIRA, J. M.; MONTEIRO, L. A. R. C.; ANDREOTTI, R. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 133-138, jul./set. 2007.
160. PARÉ, J.; THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 60, n. 2, p. 133-139, abr. 1996.
161. PARÉ, J.; FECTEAU, G.; FORTIN, M.; MARSOLAIS, G. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 213, n. 11, p. 1595-1598, dez. 1998.
162. PAZ, G. F.; LEITE, R. C.; ROCHA, M. A. Associação entre sorologia para *Neospora caninum* e taxa de prenhez em vacas receptoras de embriões. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 5, p. 1323-1325, out. 2007. doi: 10.1590/S0102-09352007000500034
163. PEDRAZA-DÍAZ, S.; MARUGÁN-HERNÁNDEZ, V.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ROJO-MONTEJO, S.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.; ORTEGA-MORA, L. M. Microsatellite markers for the molecular characterization of *Neospora caninum*: application to clinical samples. **Veterinary**

Parasitology, Amsterdã, v. 166, n. 1-2, p. 38-46, dez. 2009. [doi:10.1016/j.vetpar.2009.07.043](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.043)

164. PELLEGRIN, A. O.; SERENO, J. R. B.; MAZZA, M. C. M.; LEITE, R. C. Doenças da reprodução e conservação genética: Levantamento no núcleo de conservação do bovino Pantaneiro. **Embrapa Pantanal-Comunicado Técnico**, n. 21, p. 1-4, set. 1997. Disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/COT21.pdf>. Acesso em: 06 jan. 2011.

165. PENA, H. F. J.; SOARES, R. M.; RAGOZO, A. M. A.; MONTEIRO, R. M.; YAI, L. E. O.; NISHI, S. M.; GENNARI, S. M. Isolation and molecular detection of *Neospora caninum* from naturally infected sheep from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 147, n. 1-2, p. 61-66, jun. 2007. [doi:10.1016/j.vetpar.2007.03.002](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.002)

166. PEREIRA-BUENO, J.; QUINTANILLA-GOZALO, A.; SEIJAS-CARBALLEDO, A.; COSTAS, E.; ORTEGA-MORA, L. M. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: pattern of transmission and age-related antibody fluctuations in: HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B. A. European perspective on *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Nova Iorque, v. 30, n. 8, p. 877-924, jul. 2000. [doi:10.1016/S0020-7519\(00\)00072-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00072-2)

167. PEREIRA-BUENO, J.; QUINTANILLA-GOZALO, A.; PÉREZ-PÉREZ, V.; ESPI-FELGUEROSO, A.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ORTEGA-MORA, L. M. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 111, n. 2-3, p. 143-152, fev. 2003. [doi:10.1016/S0304-4017\(02\)00361-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00361-8)

168. PESSOA, G. A. **Desempenho reprodutivo de vacas leiteiras naturalmente infectadas por *Neospora caninum***. 2010. 52 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

169. QUINTANILLA-GOZALO, A.; PEREIRA-BUENO, J.; TABARÉS, E.; INNES, E. A.; GONZÁLEZ-PANIELLO, R.; ORTEGA-MORA, L. M. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. **International Journal for Parasitology**, Nova Iorque, v. 29, n. 8, p. 1201-1208, ago. 1999. [doi:10.1016/S0020-7519\(99\)00084-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00084-3)

170. RAGHUPATHY, R. Th I-type immunity is incompatible with successful pregnancy. **Immunology Today**, Cambridge, v. 18, n. 10, p. 478-482, out. 1997.

171. 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**, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 33-37. jan./mar. 2003.

172. REICHEL, M. P.; PFEIFFER, D. U. An analysis of the performance characteristics of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 107, n. 3, p. 197-207, ago. 2002. [doi:10.1016/S0304-4017\(02\)00086-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00086-9)
173. REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. *Neospora caninum* – How close are we to development of an efficacious vaccine that prevents abortion in cattle? **International Journal for Parasitology**, Nova Iorque, v. 39, n. 11, p. 1173-1187, set. 2009. [doi:10.1016/j.ijpara.2009.05.007](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.05.007)
174. RITTER, D. M.; KERLIN, R.; SIBERT, G.; BRAKE, D. Immune factors influencing the course of infection with *Neospora caninum* in the murine host. **The Journal of Parasitology**, Lincoln/NE, v. 88, n. 2, p. 271-280, abr. 2002. [doi:10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0271:IFITCO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0271:IFITCO]2.0.CO;2)
175. RODRIGUES, A. A. R.; GENNARI, S. M.; AGUIAR, D. M.; SREEKUMAR, C.; HILL, D. E.; MISKA, K. B.; VIANNA, M. C. B.; DUBEY, J. P. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 124, n. 3-4, p. 139-150, out. 2004. [doi:10.1016/j.vetpar.2004.07.007](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.007)
176. RODRIGUEZ, I.; CHOROMANSKI, L.; RODGERS, S. J.; WEINSTOCK, D. Survey of *Neospora caninum* antibodies in dairy and beef cattle from five regions of the United States. **Veterinary Therapeutics**, Yardley, v. 3, n. 4, p. 396-401, fev. 2002.
177. ROJO-MONTEJO, S.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ALVAREZ-GARCIA, G.; MARUGAN-HERNANDEZ, V.; PEDRAZA-DIAZ, S.; BLANCO-MURCIA, J.; PRENAFETA, A.; ORTEGA-MORA, L. M. Isolation and characterization of a bovine isolate of *Neospora caninum* with low virulence. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 159, n. 1, p. 7-16, jan. 2009. [doi:10.1016/j.vetpar.2008.10.009](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.009)
178. ROMERO, J. J.; FRANKENA, K. The effect of the dam calf relationship on serostatus to *Neospora caninum* on 20 Costa Rican dairy farms. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 114, n. 3, p. 159-171, jun. 2003. [doi:10.1016/S0304-4017\(03\)00135-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00135-3)
179. ROSYPAL, A. C.; LINDSAY, D. S. The sylvatic cycle of *Neospora caninum*: where do we go from here? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 10, p. 439-440, out. 2005. [doi:10.1016/j.pt.2005.08.003](https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.08.003)
180. SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia 3ed., 2007. 264 p.
181. SÁNCHEZ, G. F.; MORALES, S. E.; MARTINEZ, M. J.; TRIGO, J. F. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and

cattle from Mexico. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 67, n. 2, p. 142-145, maio 2003.

182. SANTIN, A. P. I. **Perfil sanitário de bovinos da raça Curraleiro frente a enfermidades de importância econômica**. 2008. 78 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

183. SANTOLARIA, P.; ALMERÍA, S.; MARTÍNEZ-BELLO, D.; NOGAREDA, C.; MEZO, M.; GONZALEZ-WARLETA, M.; CASTRO-HERMIDA, J. A.; PABÓN, M.; YÁNIZ, J. L.; LÓPEZ-GATIUS, F. Different humoral mechanisms against *Neospora caninum* infection in purebred and crossbreed beef/dairy cattle pregnancies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 178, n. 1-2, p. 70-76, maio 2011. [doi:10.1016/j.vetpar.2010.12.018](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.018)

184. SARTOR, I. F.; HASEGAWA, M. Y.; CANAVESSI, A. M. O.; PINCKNEY, R. D. Ocorrência de anticorpos de *Neospora caninum* em vacas leiteiras avaliados pelos métodos ELISA e RIFI no município de Avaré, SP. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 3-10, jan./jun. 2003.

185. SARTOR, I. F.; GARCIA FILHO, A.; VIANNA, L. C.; PITUCO, E. M.; PAI, V. D.; 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, out./dez. 2005.

186. SCHARES, G.; PETERS, M.; WURM, R.; BARWALD, A.; CONRATHS, F. J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 80, n. 2, p. 87-98, dez. 1998. [doi:10.1016/S0304-4017\(98\)00195-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00195-2)

187. SCHARES, G.; CONRATHS, F. J.; REICHEL, M. P. Bovine neosporosis: comparison of serological methods using outbreak sera from a dairy herd in New Zealand. **International Journal for Parasitology**, Nova Iorque, v. 29, n. 10, p. 1659-1667, out. 1999. [doi:10.1016/S0020-7519\(99\)00104-6](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00104-6)

188. SCHOCK, A.; INNES, E. A.; YAMANE, I.; LATHAM, S. M.; WASTLING, J. M. Genetic and biological diversity among isolates of *Neospora caninum*. **Parasitology**, Londres, v. 123, n. 1, p. 13-23, jul. 2001. [doi:10.1017/S003118200100796X](https://doi.org/10.1017/S003118200100796X)

189. SCHULZE, C. M. B. **Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em fêmeas bovinas do Estado de Goiás e fatores associados**. 2008. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

190. SERRANO, E.; FERRE, I.; OSORO, K.; ADURIZ, G.; MATEOS-SANZ, A.; MARTÍNEZ, A.; ATXAERANDIO, R.; HIDALGO, C. O.; ORTEGA-MORA, L. M. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 135, n. 3-4, p. 197-203, fev. 2006. [doi:10.1016/j.vetpar.2005.10.003](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.10.003)

191. SHIBAHARA, T.; KOKUHO, T.; ETO, M.; HARITANI, M.; HAMAOKA, T.; SHIMURA, K.; NAKAMURA, K.; YOKOMIZO, Y.; YAMANE, I. Pathological and immunological findings of athymic nude and congenic wild type BALB/c mice experimentally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Pathology**, Basel/CH, v. 36, n. 4, p. 321-327, jul. 1999. [doi: 10.1354/vp.36-4-321](https://doi.org/10.1354/vp.36-4-321)
192. SILVA, A. C. Diagnóstico da neosporose bovina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, suplemento 1, p. 29-33, set. 2004.
193. SILVA, M. I. S.; ALMEIDA, M. A. O.; MOTA, R. A.; JUNIOR, J. W. P.; RABELO, S. S. A. Fatores de riscos associados à infecção por *Neospora caninum* em matrizes bovinas leiteiras em Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n. 2, p. 455-461, abr./jun. 2008.
194. SPEER, C. A.; DUBEY, J. P.; McALLISTER, M. M.; BLIXT, J. A. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, Nova Iorque, v.29, n. 10, p. 1509-1519, out. 1999. [doi:10.1016/S0020-7519\(99\)00132-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00132-0)
195. STENLUND S. A.; KINDAHL, H. A.; MAGNUSSON, U. A.; UGGLA, A. B.; BJÖRKMAN, C. C. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 85, n. 4, p. 227-234, set. 1999. [doi:10.1016/S0304-4017\(99\)00120-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00120-X)
196. TANAKA, T.; HAMADA, T.; INOUE, N.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; SUZUKI, N.; MIKAMI, T. The role of CD4+ or CD8+ T cells in the protective immune response of BALB/c mice to *Neospora caninum* infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 90, n. 3, p. 183-191, jun. 2000. [doi:10.1016/S0304-4017\(00\)00238-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00238-7)
197. TEIXEIRA, L.; MARQUES, A.; MEIRELES, C. S.; SEABRA, A. R.; RODRIGUES, D.; MADUREIRA, P.; FAUSTINO, A. M. R.; SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, P.; COSTA, J. M. C.; CANADA, N.; VILANOVA, M. Characterization of the B-cell immune response elicited in BALB/c mice challenged with *Neospora caninum* tachyzoites. **Immunology**, Londres, v. 116, n. 1, p. 38-52, set. 2005. [doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02195.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02195.x)
198. TEIXEIRA, W. C.; UZÊDA, R. S.; GONDIM, L. F. P.; SILVA, M. I. S.; PEREIRA, H. M.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* (Apicomplexa: Sarcocystidae) em bovinos leiteiros de propriedades rurais em três microrregiões no estado do Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 9, p. 729-734, set. 2010. [doi: 10.1590/S0100-736X2010000900004](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010000900004)
199. TENNENT-BROWN, B. S.; POMROY, W. E.; REICHEL, M. P.; GRAY, P. L.; MARSHALL, T. S.; MOFFAT, P. A.; ROGERS, M.; DRISCOLL, V. A.; REEVE, O. F.; RIDLER, A. L.; RITAVEN, S. Prevalence of *Neospora* antibodies in beef

cattle in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 48, n. 5, p. 149-150, out. 2000.

200. TIWARI, A.; VANLEEUEWEN, J. A.; DOHOO, I. R.; KEEFE, G. P.; HADDAD, J. P.; TREMBLAY, R.; SCOTT, H. M.; WHITING, T. Production effects of pathogens causing bovine leukosis, bovine viral diarrhea, paratuberculosis, and neosporosis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 2, p. 659-669, fev. 2007. [doi:10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71548-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71548-5)

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

202. TRANAS, J.; HEINZEN, R. A.; WEISS, L. M.; McALLISTER, M. M. Serological evidence of human Infection with the protozoan *Neospora caninum*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 6, n. 5, p. 765-767, set. 1999.

203. TREES, A. J.; DAVISON, H. C.; INNES, E. A.; WASTLING, J. M. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, Nova Iorque, v. 29, n. 8, p. 1195-1200, ago. 1999. [doi:10.1016/S0020-7519\(99\)00093-4](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00093-4)

204. TREES, A. J.; McALLISTER, M. M.; GUY, C. S.; MCGARRY, J. W.; SMITH, R. F.; WILLIAMS, D. J. L. *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 109, n. 1-2, p. 147-154, out. 2002. [doi:10.1016/S0304-4017\(02\)00234-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00234-0)

205. TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 12, p. 558-561, dez. 2005. [doi:10.1016/j.pt.2005.09.005](https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.09.005)

206. UGGLA, A.; STENULD, S.; HOLMDAHL, O. J. M.; JAKUBEK, E. B.; THEBO, P.; KINDAHL, H.; BJÖRKMAN, C. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **International Journal for Parasitology**, Nova Iorque, v. 28, n. 9, p. 1467-1472, set. 1998. [doi:10.1016/S0020-7519\(98\)00110-6](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00110-6)

207. VANLEEUEWEN, J. A.; FORSYTHE, L.; TIWARI, A.; CHARTIER, R. Seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in dairy cattle in Saskatchewan. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 46, n. 1, p. 56-58, jan. 2005.

208. VANLEEUEWEN, J. A.; HADDAD, J. P.; DOHOO, I. R.; KEEFE, G. P.; TIWARI, A.; SCOTT, H. M. Risk factors associated with *Neospora caninum* seropositivity in randomly sampled Canadian dairy cows and herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdã, v. 93, n. 2-3, p. 129-138, fev. 2010a. [doi:10.1016/j.prevetmed.2009.11.013](https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.11.013)

209. VANLEEUEWEN, J. A.; HADDAD, J. P.; DOHOO, I. R.; KEEFE, G. P.; TIWARI, A.; TREMBLAY, R. Associations between reproductive performance and seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral-diarrhea virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in Canadian dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdã, v. 94, n. 1-2, p. 54-64, abr. 2010b. [doi:10.1016/j.prevetmed.2009.11.012](https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.11.012)
210. VANLEEUEWEN, J. A.; GREENWOOD, S.; CLARK, F.; ACORN, A.; MARKHAM, F.; MCCARRON, J.; O'HANDLEY, R. Monensin use against *Neospora caninum* challenge in dairy cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 175, n. 3-4, p. 372-376, fev. 2011. [doi:10.1016/j.vetpar.2010.10.016](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.016)
211. VIANNA, M. C. B.; SREEKUMAR, C.; MISKA, K. B.; HILL, D. E.; DUBEY, J.P. Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 129, n. 3-4, p. 253-257, maio 2005. [doi:10.1016/j.vetpar.2004.02.031](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.02.031)
212. 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, abr./jun. 2008.
213. VOGEL, F. S. F.; ARENHART, S.; BAUERMAN, F. V. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e bubalinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1948-1951, nov./dez. 2006.
214. VON BLUMRÖDER, D.; SCHARES, G.; NORTON, R.; WILLIAMS, D. J. L.; ESTEBAN-REDONDO, I.; WRIGHT, S.; BJÖRKMAN, C.; FRÖSSLING, J.; RISCO-CASTILLO, V.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; ORTEGA-MORA, L. M.; SAGER, H.; HEMPHILL, A.; VAN MAANEN, C.; WOUDE, W.; CONRATHS, F. J. Comparison and standardisation of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 120, n. 1-2, p. 11-22, fev. 2004. [doi:10.1016/j.vetpar.2003.12.010](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.12.010)
215. WALDNER, C.L.; CUNNINGHAM, G.; CAMPBELL, J.R. Agreement between three serological tests for *Neospora caninum* in beef cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 16, n. 4, p. 313-315, jul. 2004.
216. WAPENAAR, W.; BARKEMA, H. W.; VANLEEUEWEN, J. A.; MCCLURE, J. T.; O'HANDLEY, R. M.; KWOK, O. C. H.; THULLIEZ, P.; DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C. Comparison of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 143, n. 2, p. 166-173, jan. 2007. [doi:10.1016/j.vetpar.2006.08.007](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.007)
217. WESTHUSIN, M. E.; SHIN, T.; TEMPLETON, J. W.; BURGHARDT R. C.; ADAMS, L. G. Rescuing valuable genomes by animal cloning: A case for natural

disease resistance in cattle. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 85, n. 1, p. 138-142, jan. 2007. [doi: 10.2527/jas.2006-258](https://doi.org/10.2527/jas.2006-258)

218. WILLIAMS, D. J. L.; GUY, C. S.; SMITH, R. F.; GUY, F.; MCGARRY, J. W.; MCKAY, J. S.; TREES, A. J. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, Nova Iorque, v. 33, n. 10, p. 1059-1065, set. 2003. [doi:10.1016/S0020-7519\(03\)00143-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00143-7)

219. WILLIAMS, D. J. L.; HARTLEY, C. S.; BJÖRKMAN, C.; TREES, A. J. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* – how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. **Parasitology**, Londres, v. 136, n. 4, p. 1895-1900, dez. 2009. [doi: 10.1017/S0031182009990588](https://doi.org/10.1017/S0031182009990588)

220. WOUDA, W.; MOEN, A. R.; SCHUKKEN, Y. H. Abortion risk in progeny of cows that experienced a *Neospora caninum* epidemic. **Theriogenology**, Stoneham, v. 49, n. 7, p. 1311-1316, maio 1998. [doi:10.1016/S0093-691X\(98\)00078-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00078-8)

221. WOUDA, W.; DIJKSTRA, T.; KRAMER, A.M.H.; VAN MANEN, C.; BRINKHOF, J.M.A. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infection in dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, Nova Iorque, v. 29, n. 10, p.1677-1682, out. 1999. [doi:10.1016/S0020-7519\(99\)00105-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00105-8)

