



Situação da neosporose bovina no Brasil e métodos de diagnóstico

(Situation of Brazilian cattle neosporosis and diagnostic methods)

"Revisão/Review"

RA Mota^{A(*)}, I Ferre^B, EB Faria^C

^ALaboratório de Bacterioses do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Rua Manoel de Medeiros, s/nº - Dois Irmãos, CEP: 52171-900 – Recife-PE/Brasil.

^BDepartamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid/Espanha.

^CPrograma de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da UFRPE.

Resumo

O Neospora caninum é um importante agente causador de abortos e mortalidade neonatal, sendo responsável por grandes perdas econômicas à produção mundial de bovinos. Neste trabalho, é revisada a situação atual da neosporose no Brasil, assim como os métodos de diagnóstico da doença em bovinos, incluindo os avanços mais recentes das técnicas sorológicas e de biologia molecular.

Palavras-chave: ruminante, protozoário, aborto.

Abstract

Neospora caninum is considered as an important cause of abortion and neonatal mortality in dairy and beef cattle worldwide. The infection causes important economic losses in the main cattle producing countries. The purpose of this article is to review the current status of neosporosis in Brazil, especially in cattle, and the diagnostic methods used, including the recent advances in serological and molecular techniques.

Key-words: ruminant, protozoan, abortion.

Introdução

O *N. caninum* é um protozoário coccídeo, apicomplexa, agente causador da neosporose, muito semelhante ao *Toxoplasma gondii*, produtor de cistos nos tecidos de seus hospedeiros (DUBEY et al., 2002). O cão atua como hospedeiro definitivo e intermediário (McALLISTER et al., 1998), enquanto vacas, ovelhas, cabras, cervos e búfalos são considerados seus hospedeiros intermediários naturais (DUBEY e LINDSAY, 1996; DUBEY, 1999/2003ab). Experimentalmente Dubey et al. (1999/2003a) demonstraram a participação dos gatos, gerbis, ratos e macacos como hospedeiros intermediários, assim como Gondim et al. (2004) comprovaram, por meio

por meio de infecção experimental, que coiotes (*Canis latrans*) são os segundo hospedeiros definitivos conhecidos, depois dos cães.

Quanto ao seu ciclo biológico, a transmissão congênita do *N. caninum* é considerada a forma mais importante de manutenção e difusão da neosporose. Vários trabalhos demonstraram que a transmissão transplacentária do parasito é eficaz nos bovinos infectados naturalmente, oscilando entre 48 a 95% (DAVISON et al., 1999; QUINTANILLA-GONZALO et al., 1999; PEREIRA-BUENO et al., 2000). Outra forma de transmissão vertical, comprovada experimentalmente, pode ser o colostro ou o

(*) Autor para correspondência/Corresponding author (canjani_ch@hotmail.com)

(§) Recebido em 11/06/07 e aceito em 28/12/07.

leite (UGGLA et al., 1998).

Contudo, modelos matemáticos de simulação demonstraram que somente a transmissão vertical não é suficiente para manter a infecção nos rebanhos (FRENCH et al., 1999) e estudos epidemiológicos indicaram a existência da transmissão horizontal (THURMOND et al., 1997; DAVISON et al., 1999; HIETALA e THURMOND, 1999; DIJKSTRA et al., 2001/2002; CRAWSHAW e BROCKLEHURST, 2003).

De Marez et al. (1999) comprovaram que os bezerros e Trees et al. (2002) que vacas gestantes podem se infectar experimentalmente quando administrados, por via oral, oocistos do *N. caninum* eliminados pelo cão. Entretanto, o número de oocistos eliminados nas fezes de cães experimentalmente infectados por tecidos de camundongos com neosporose crônica são escassos, exceto quando são submetidos a um tratamento imunossupressor (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999). Gondim et al. (2002) reproduziram experimentalmente o ciclo de transmissão cão-bezerro, demonstrando que os cães infectados mediante a ingestão de tecidos de bovinos com neosporose crônica eliminavam uma maior quantidade de oocistos do parasito em suas fezes quando comparados com aqueles infectados com tecidos de camundongos.

Ortega-Mora et al. (2003) e Caetano-da-Silva et al. (2004) detectaram o DNA do parasito no sêmen fresco e congelado de touros naturalmente infectados, sugerindo a possibilidade de transmissão venérea.

Desta forma, esta revisão tem como objetivo informar sobre a situação da neosporose bovina no Brasil, além de relatar os avanços no diagnóstico da doença.

A neosporose bovina no Brasil

A infecção por *N. caninum* foi relatada pela primeira vez por Brautigam et al. (1996) em um estudo sorológico de bovinos com aptidão para leite e carne. No Brasil, o *N. caninum* foi isolado pela primeira vez em um feto bovino abortado no Estado da Bahia

(GONDIM et al., 1999a). Em um estudo sobre a soroprevalência da infecção por *N. caninum* em rebanhos leiteiros da Bahia, Gondim et al. (1999b) observaram positividade de 14,09%, concluindo que o agente poderia ser uma importante causa de abortos naquela região.

Corbellini et al. (2000) relataram que 10% dos fetos bovinos abortados no Rio Grande do Sul estavam infectados por *N. caninum* e Corbellini et al. (2002) estudaram a neosporose como enfermidade causadora de abortos em bovinos com o objetivo de avaliar a associação entre a infecção com abortos, além de identificar os fatores epidemiológicos associados à infecção. Identificaram lesões cerebrais caracterizadas como encefalite que foram compatíveis com tal infecção em 47,8% dos fetos analisados e a presença do protozoário em 81,8% desses fetos com tais lesões, utilizando a técnica de imunohistoquímica. Observaram também soroprevalência de 11,2% que variou de 3,1 a 30,7% nos rebanhos estudados. A frequência de animais soropositivos foi mais elevada nas vacas que abortaram (23,3%) do que naquelas que não abortaram (8,3%) e encontraram associação significativa entre a soropositividade e o aborto. Os autores sugeriram, com base nos estudos sorológicos e histopatológicos, que a neosporose é uma importante causa de morte fetal naquele Estado.

Outros estudos soroepidemiológicos foram realizados em outros estados do Brasil (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2001; MELO et al., 2001/2004/2006; SARTOR et al., 2003), registrando a infecção por *N. caninum* em diferentes espécies, indicando que esta se encontra disseminada nos rebanhos estudados.

Corbellini et al. (2002) relataram a presença de cães em todas as propriedades com histórico de aborto associado ao *N. caninum*, destacando o provável papel desses animais na transmissão horizontal do parasito para bovinos, além de sugerirem, com base em dados obtidos na literatura especializada, o envolvimento de canídeos silvestres no ciclo epidemiológico do agente.

Souza et al. (2002) testaram amostras de bovinos com aptidão leiteira do Estado do Paraná e relataram frequência de 21,6%, com maior prevalência em cães com idade entre dois e quatro anos, sugerindo a exposição pós-natal ao parasito.

Locatelli-Dittrich et al. (2003) identificaram um novo isolado do parasito (BNC-PR1) num bezerro portador de cegueira, procedente do Estado do Paraná, sugerindo a inclusão da neosporose como diagnóstico diferencial de sinais neurológicos em bezerros.

Foram verificadas co-infecção e associação entre a presença de anticorpos anti-*N. caninum*, o Herpes Vírus Bovino 1 e o Vírus da Diarréia Viral Bovina em bovinos leiteiros do Estado de Minas Gerais (MELO et al., 2004).

No Brasil não existe nenhum dado apontando o valor das perdas produtivas relativas às falhas reprodutivas em bovinos. Em rebanhos leiteiros da Austrália e Califórnia, perdem-se, anualmente, 85 milhões de dólares e 35 milhões de dólares, respectivamente, e 25 milhões de dólares para a produção de carne causados pela neosporose (BRITAIN, 2000).

Diagnóstico da neosporose bovina

Desde a descoberta do *N. caninum* e de seu isolamento, uma série de possibilidades diagnósticas vêm sendo descritas. Inicialmente, a confirmação da infecção se dava com o exame *post-mortem*, no qual tentava-se demonstrar a presença do parasita nos tecidos.

O diagnóstico clínico da neosporose bovina é complexo devido à ausência de manifestações clínicas nos animais cronicamente infectados e ao escasso número de parasitos nos fetos abortados (JENKINS et al., 2002). Segundo Dubey e Lindsay (1996), as vacas que abortam não mostram outras manifestações clínicas, sendo estas só observadas em bezerros com menos de dois meses de idade. Os sinais clínicos observados em bezerros neonatos, infectados por *N. caninum* podem ser flexão dos membros

anteriores e/ou posteriores, assim como hiperextensão. O exame neurológico pode revelar ataxia, redução do reflexo patelar e perda da consciência proprioceptiva. Também podem apresentar exoftalmia e aparência assimétrica dos olhos. Entretanto, deve-se destacar que estes casos são pouco frequentes e que a grande maioria dos bezerros infectados congenitamente não apresentam sinais clínicos (PICOUX et al., 1998).

Em função da dificuldade de isolamento do agente, os exames sorológicos tornaram-se uma ferramenta útil na detecção de anticorpos específicos frente a infecção nos bovinos adultos (BJÖRKMAN e UGGLA, 1999). A observação de lesões compatíveis da enfermidade no cérebro, coração e fígado de fetos abortados, associados ao exame imunohistoquímico (BARR et al., 1990/1991; GONZÁLES et al., 1990; ANDERSON et al., 1991) e molecular do parasito, mediante a reação em cadeia de polimerase (PCR) (GOTTSTEIN et al., 1998; BASZLER et al., 1999) em tecidos fetais, além da realização da sorologia fetal (BARR et al., 1995; REICHEL e DRAKE, 1996; BUXTON et al., 1997; WOUDA et al., 1997) confirmam a infecção por este agente.

As técnicas sorológicas que detectam anticorpos séricos específicos anti-*N. caninum* são utilizadas para demonstrar a infecção nos rebanhos bovinos a fim de determinar se a neosporose esta envolvida como doença da esfera reprodutiva (THURMOND e HIETALA, 1995). A transmissão congênita também pode ser avaliada mediante a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* no soro pré-colostral de bezerros recém-nascidos, visto que nos bovinos não há transferência de anticorpos da mãe ao feto durante a gestação (PARÉ et al., 1996; THURMOND e HIETALA, 1997). Entretanto, mesmo que um resultado positivo auxilie a identificar um animal infectado, um resultado negativo não descarta definitivamente a infecção porque os anticorpos séricos, frente ao *N. caninum*, podem variar com a idade e a fase da gestação (PEREIRA-BUENO et al., 2000; QUINTANILLA-GONZALO et al., 2000).

Entre as técnicas sorológicas mais utilizadas no diagnóstico da neosporose bovina destaca-se a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (PARÉ et al., 1995; BJÖRKMAN e UGGLA, 1999; ATKINSON et al., 2000ab; MORALES et al., 2001; DUBEY e SCHARES, 2006) e imunoabsorção enzimática (ELISA) (BJÖRKMAN e UGGLA, 1999; SCHARES et al., 2000/2002; BAILLARGEON et al., 2001; BASZLER et al., 2001; REBORDOSA et al., 2001; CHALUN et al., 2002; REICHEL e PFEIFFER, 2002; ÁLVAREZ-GARCÍA et al., 2003; SAGER et al., 2003; DUBEY e SCHARES, 2006).

A RIFI foi a primeira técnica sorológica aplicada à neosporose, sendo frequentemente utilizada como prova de referência. As provas ELISA, utilizando amostras de soro (BJÖRKMAN e UGGLA, 1999; ATKINSON et al., 2000a) ou leite (CHALUN et al., 2002; SCHARES et al., 2003) são mais objetivas e podem automatizar-se, permitindo uma análise mais rápida das amostras e são muito úteis em estudos epidemiológicos em grande escala.

Para melhorar a especificidade das provas ELISA tradicionais, baseadas na utilização de macerados ou extratos solúveis de taquizoítos, foram utilizados taquizoítos intactos, complexos estimulantes da imunidade (iscoms), antígenos recombinantes e antígenos purificados por afinidade (BJÖRKMAN e UGGLA, 1999; AHN et al., 2003; CHAHAN et al., 2003; FROSSLING et al., 2003).

Por outro lado, foram desenvolvidas várias provas ELISA de avidéz que permitem distinguir as fases aguda e crônica da neosporose (BJÖRKMAN e UGGLA, 1999; SCHARES et al., 2002; BJÖRKMAN et al., 2003; SAGER et al., 2003; STENLUND et al., 2003). Também foram padronizadas as provas de aglutinação direta (BJÖRKMAN e UGGLA, 1999; FUJII et al., 2001), cuja vantagem é sua simplicidade e não requerer anticorpos secundários específicos. O diagnóstico da neosporose bovina foi viabilizado com a comercialização de diferentes provas ELISA que permitem a detecção de anticorpos séricos frente ao *N. caninum*.

Diferentes métodos sorológicos de diagnóstico da infecção por *N. caninum* em

bovinos foram comparados em um estudo realizado por diferentes laboratórios europeus (VON BLUMRÖDER et al., 2004), que concluíram existir um alto nível de concordância na interpretação dos resultados entre o ELISA e RIFI, indicando uma similaridade entre os princípios e os aspectos técnicos desses testes e improvável efeito significativo nos resultados de estudos de prevalência.

Atualmente, os antígenos utilizados nas provas sorológicas são procedentes de taquizoítos mantidos nos cultivos celulares de células VERO, de isolados de *N. caninum* de bovinos e caninos (DUBEY e LINDSAY, 1996).

Mediante a técnica de imunoblot foram identificados antígenos imunodominantes de 17, 29/30, 37 e 46 kDa e proteínas com peso molecular de 25, 65 e 116 kDa no soro de bovinos naturalmente infectados (BASZLER et al., 1996; ATKINSON et al., 2000ab; SÖNDGEN et al., 2001; ÁLVAREZ-GARCÍA et al., 2002). Entretanto, o imunoblot não é utilizado como método rotineiro de diagnóstico, mas sim como técnica confirmatória de outras provas sorológicas (ATKINSON et al., 2000ab; SÖNDGEN et al., 2001). Assim, o reconhecimento de três ou quatro antígenos imunodominantes de 17, 29/30, 37 e 46 kDa no soro de vacas naturalmente infectadas é considerado como confirmação da infecção (SCHARES et al., 1998). Além disso, quando o imunoblot é utilizado para analisar fluidos fetais, comprova-se que este incrementa significativamente a sensibilidade da sorologia fetal (SÖNDGEN et al., 2001).

Reação de Imunofluorescência Indireta

A imunofluorescência indireta, primeiro teste sorológico desenvolvido para a detecção de anticorpos IgG anti-*Neospora caninum* (DUBEY et al., 1988), foi usada por Björkman e Uggå (1999) como referência para o desenvolvimento de outros testes.

Mesmo sendo observada uma semelhança estrutural entre o *N. caninum* e o *T. gondii*, a RIFI para diagnóstico da

neosporose tem sido descrita como específica (DUBEY e LINDSAY, 1996), assim como para *Sarcocystis* spp. devido aos antígenos de membrana (DUBEY et al., 1996). A imunofluorescência do taquizoítos é considerada uma reação inespecífica devido a possibilidade de ocorrer reação cruzada com os parasitos da mesma família, como o *Toxoplasma gondii*, *Hammondia hammondi* e *Hammondia heydorni* (UGGLA et al., 1987).

O ponto de corte utilizado difere entre alguns laboratórios, contudo, tem sido preconizado um ponto de corte de 1:200 para bovinos e bubalinos, sendo sugestivo de infecção por *N. caninum* (REICHEL e DRAKE, 1996; DUBEY et al., 1997; DUBEY, 1999).

De acordo com o período gestacional das fêmeas bovinas, observa-se variação de anticorpos, sendo registrado um aumento no terço final e um decréscimo após o parto ou abortamento, fazendo com que surja uma dificuldade na interpretação da sorologia (DANATT, 1997).

ELISA

A facilidade para se processar um grande número de amostras, aliado à uma sensibilidade e especificidade acima das encontradas quando se utiliza a RIFI e a subjetividade apresentada pelo referido teste, conferem confiança ao ELISA.

O primeiro teste de ELISA para neosporose foi padronizado e descrito por Björkman et al. (1994) e, desde então, uma série de modificações foram introduzidas no teste para o diagnóstico da infecção na espécie bovina. A maior variação nos testes de ELISA descritos diz respeito à preparação do antígeno utilizado. Na atualidade existem testes de ELISA descritos com sonicação de taquizoítos, utilizando-se antígenos extra e intra celular (PARÉ et al., 1995), ou ainda com taquizoítos inteiros (WILLIAMS et al., 1997), com proteínas recombinantes de 30 e 35 KDa (LALLY et al., 1996) e ainda a utilização de um ELISA de competição, que se caracteriza por utilizar anticorpos monoclonais que reagem com antígenos

imunodominantes de 65 KDa (KUNDE et al., 1980).

O ponto de corte é um motivo de muita discussão, tendo-se que ele é dependente de fatores como a composição do antígeno, anticorpos identificados e o conjugado utilizado (DUBEY et al., 1997). Deveria-se utilizar um novo ajuste de ponto de corte a cada nova situação presenciada (DUBEY, 1999). Uggla et al. (1987) detectaram em sua pesquisa, reação cruzada entre o *N. caninum* e o *T. gondii* utilizando o ELISA.

Em um estudo realizado por Björkman et al. (1997) foi demonstrada a presença de anticorpos para *N. caninum* nas amostras de leite e soro, obtendo-se uma correlação de 95% quando comparadas as amostras de leite e soro.

“Immunoblotting”

A utilização do “immunoblotting” tem auxiliado no estudo da especificidade da resposta imune humoral contra antígenos do *Neospora caninum* e, com isso, tem sido descrito o reconhecimento de diversos polipeptídeos imunorreativos em diferentes estágios da infecção (SCHARES et al., 2000).

Os antígenos mais comumente citados na literatura apresentam peso molecular de 17, 22, 29, 30, 31, 33, 35, 37, 42, 43, 56, 62, 68 e acima de 94 KDa (SCHARES et al., 2000/2001; MINEO et al., 2001).

Schares et al. (2001), utilizando soro de raposas experimentalmente infectadas, observaram que, dez dias após a infecção, foram reconhecidos antígenos de 29, 30, 33, e 37 KDa. A primeira reação com o antígeno de 17 KDa foi observada após os dias 22 e 31 pós-infecção, entretanto, as de 56, 68 e > 94 KDa foram reconhecidas nos dias 13 e 22 pós-infecção.

Microaglutinação

A microaglutinação é uma prova sorológica muito útil no diagnóstico de neosporose devido a não utilização de conjugados, permitindo assim, o processamento de amostras de diferentes espécies (MOORE et al., 2001). A técnica de microaglutinação é relativamente barata

quando comparada a RIFI por não utilizar conjugado, utilização de poucos equipamentos e material, além de ser de fácil interpretação, mesmo entre diferentes pesquisadores (ROMAND et al., 1998).

A técnica preconizada por Romand et al. (1998) degrada a IgM devido à utilização de 2-mercaptoetanol, expressando desta forma, somente IgG (DUBEY et al., 1996). Quando comparam-se as técnicas de imunofluorescência indireta e a de microaglutinação, a sensibilidade e a especificidade que é observada é de 100% e 98% para a RIFI e 97% e 99% para a microaglutinação.

Imunohistoquímica

Infecções virais como BVD (Diarréia Viral Bovina) e infecção por *Sarcocystis* spp. podem causar lesões similares à neosporose como infiltrações multifocais de células mononucleares, sobretudo no cérebro, coração e músculos esqueléticos. Porém, a probabilidade de ser neosporose é reforçada pela presença de necroses multifocais nesses órgãos. O diagnóstico da neosporose pela imunohistoquímica é dado quando essas lesões típicas forem encontradas, permitindo assim a identificação do *N. caninum* com alta especificidade (ANDERSON et al., 2000; DUBEY, 1999).

Nessa técnica são utilizados anticorpos anti-*N. caninum* sobre cortes dos tecidos, onde são identificados os parasitas (taquizoítos e cistos). Algumas vezes, o número de parasitas é muito reduzido e pode não ser detectado nos cortes, ocorrendo risco de resultados falsos negativos (ANDERSON et al., 2000).

Pesquisadores têm questionado o valor de diagnóstico da Imunohistoquímica devido a resultados positivos em fetos que não foram abortados e bezerros nascidos vivos (BARR et al., 1991; BRYAN et al., 1994; DUBEY, 1993; PARÉ et al., 1998).

Segundo Dubey e Lindsay (1996), a utilização de anticorpos policlonais na imunohistoquímica pode levar à reação cruzada com o *T. gondii*. Têm-se

desenvolvido anticorpos monoclonais contra taquizoítos de *N. caninum*, mas a sua utilização na Imunohistoquímica não tem sido avaliada (DUBEY, 1999).

Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Devido ser uma técnica extremamente sensível e específica, a PCR tem permitido grandes avanços no diagnóstico de doenças infecciosas. Estudos têm sido feitos utilizando-se a PCR para diagnóstico da neosporose bovina, confirmando a especificidade e sensibilidade no diagnóstico da neosporose (ELLIS, 1998; ELLIS et al., 1999). A técnica da PCR amplifica o material genômico de um parasito, mesmo que se encontre pequenas quantidades de DNA de *N. caninum* em materiais provenientes de infecções experimentais ou naturais (HOLMDAHL et al., 1996; HO et al., 1997).

A utilização da PCR competitiva está sendo usada para passar a técnica de qualitativa para quantitativa. A técnica utiliza quantidades previamente conhecidas de um competidor molecular exógeno (PCR mímico), que promove a ampliação dos “primers”, os quais possuem uma sequência mapeada dos componentes da PCR padrão (ZIMMERMANN e MANNHALTER, 1996).

Conclusão

Neste trabalho, destaca-se a importância da neosporose bovina como causa de problemas reprodutivos e de prejuízos econômicos para a produção de bovinos. Apesar da doença apresentar envolvimento comprovado em abortos e morte de neonatos no Brasil e no mundo, ainda é necessária à realização de outros estudos que avaliem criticamente as diferentes técnicas utilizadas rotineiramente no diagnóstico da infecção, além da utilização de técnicas complementares para incrementar a detecção da infecção fetal. Outro aspecto importante está relacionado com a validação dos testes sorológicos, como a RIFI e ELISA, entre os diferentes laboratórios de diagnóstico da doença. No Brasil, a inclusão de técnicas como a PCR tem aumentado

consideravelmente a especificidade e sensibilidade do diagnóstico do aborto causado por *N. caninum*, assim como viabiliza a realização de estudos epidemiológicos.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Luis Miguel Ortega Mora, do Departamento de Sanidade Animal da Universidade Complutense de Madrid, pela revisão e sugestões neste artigo. À CAPES, pela concessão de bolsa de pós-doutorado, sem a qual não seria possível este tipo de cooperação técnica entre os grupos de pesquisa.

Referências

- AHN, H.J. et al. ELISA detection of IgG antibody against a recombinant major surface antigen (Nc-p43) fragment of *Neospora caninum* in bovine sera. **Korean Journal of Parasitology**, v.41, p.175-177, 2003.
- ÁLVAREZ-GARCÍA, G. et al. Pattern of recognition of *Neospora caninum* tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted fetuses. **Veterinary Parasitology**, v.107, p.15-27, 2002.
- ÁLVAREZ-GARCÍA, G. et al. Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. **Veterinary Research**, v.34, p.341-352, 2003.
- ANDERSON, M.L. et al. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.60, p.417-431, 2000.
- ANDERSON, M.L. et al. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.198, p.241-244, 1991.
- ATKINSON, R.A. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in a dairy cattle herd. **Australian Veterinary Journal**, v.78, p.262-266, 2000b.
- ATKINSON, R. et al. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections in cattle. **Parasitology Today**, v.16, p.110-114, 2000a.
- BAILLARGEON, P. et al. 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 American Veterinary Medical Association**, v.218, p.1803-1806, 2001.
- BARR, B.C. et al. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. **Veterinary Pathology**, v.27, p.354-361, 1990.
- BARR, B.C. et al. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. **Veterinary Pathology**, v.28, p.110-116, 1991.
- BARR, B.C. et al. Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. **Veterinary Record**, v.137, p.611-613, 1995.
- BASZLER, T.V. et al. Validation of a commercially available monoclonal antibody-based competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to *Neospora caninum* in cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.3854-3857, 2001.
- BASZLER, T.V. et al. Serological diagnosis of bovine neosporosis by *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.1423-1428, 1996.
- BASZLER, T.V. et al. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.4059-4064, 1999.
- BJÖRKMAN, C. et al. An indirect enzymelinked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. **Veterinary Parasitology**, v.68, p.251-260, 1997.
- BJÖRKMAN, C. et al. *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. **Parasite Immunology**, v.16, p. 643-648, 1994.
- BJÖRKMAN, C. et al. Application of the *Neospora caninum* IgG avidity ELISA in assessment chronic reproductive losses after an outbreak of neosporosis in a herd of beef cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigations**, v.15, p.3-7, 2003.
- BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection.

- International Journal for Parasitology**, v.29, p.1497-1507, 1999.
- BRITAIN, R. A review of current reports on bovine neosporosis. **AETE Newsletter**, v.11, p.8-10, 2000.
- BRAUTIGAM, F.E. et al. Resultados de levantamento sorológico para a espécie *Neospora* em bovinos de corte e leite. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15. 1996, Campo Grande, MS. **Anais...** Campo Grande: Associação Panamericana de Ciências Veterinárias, 1996, p.284.
- BRYAN, L.A. et al. Bovine neonatal encephalomyelitis associated with a *Neospora* sp. Protozoan. **Canadian Veterinary Journal**, v.35, p.111-113, 1994.
- BUXTON, D. et al. Neosporosis and bovine abortions in Scotland. **Veterinary Record**, v.141, p.649-651, 1997.
- CAETANO-DA-SILVA, A. et al. Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. **Theriogenology**, v.62, p.1329-1336, 2004.
- CHAHAN, B. et al. Serodiagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle by enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant truncated NcSAG1. **Veterinary Parasitology**, v.118, p.177-185, 2003.
- CHALUN, A. et al. Use of bulk milk for detection of *Neospora caninum* infection in dairy herds in Thailand. **Veterinary Parasitology**, v.110, p.35-44, 2002.
- CORBELLINI, L.G. et al. Aborto bovino por *Neospora caninum* no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v.30, p.863-868, 2000.
- CORBELLINI, L.G. et al. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.103, p.195-202, 2002.
- CRAWSHAW, W.M.; BROCKLEHURST, S. Abortion epidemic in a dairy herd associated with horizontally transmitted *Neospora caninum* infection. **Veterinary Record**, v.152, p.201-206, 2003.
- DANNATT, L. *Neospora caninum* antibody levels in an endemically infected dairy herd. **Cattle Practice**, v.5, p.335-337, 1997.
- DAVISON, H.C. et al. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infection in dairy cattle. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1683-1689, 1999.
- DE-MAREZ, T. et al. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1647-1657, 1999.
- DIJKSTRA, T.H. et al. A high rate of seroconversion for *Neospora caninum* in a dairy herd without an obvious increased incidence of abortions. **Veterinary Parasitology**, v.109, p.203-211, 2002.
- DIJKSTRA, T.H. et al. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.209-215, 2001.
- DUBEY, J.P. Neosporosis in cattle. **The Journal of Parasitology**, v.89, p.S42-S56, 2003a.
- DUBEY, J.P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.84, p.349-367, 1999.
- DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Korean Journal of Parasitology**, v.41, p.1-16, 2003b.
- DUBEY, J.P. *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals. In: JP Kreier **Parasitic Protozoa**. 6. Academic Press, NY. 1-158, 1993.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.67, p.1-59, 1996.
- DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.140, p.1-34, 2006.
- DUBEY, J.P. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v.32, p.929-946, 2002.
- DUBEY, J.P. et al. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.193, n.10, p.1259-1263, 1988.

- DUBEY, J.P. et al. Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and different enzyme-linked immunosorbent assays. **The Journal of Parasitology**, v.83, n.6, p.1063-1069, 1997.
- DUBEY, J.P. et al. Serologic prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in horses in Brazil. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.215, p.970-972, 1999.
- DUBEY, J.P. et al. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. **American Journal of Veterinary Research**, v.57, p.329-336, 1996.
- ELLIS, J.T. Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.1053-1060, 1998.
- ELLIS, J.T. et al. Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1589-1596, 1999.
- FRENCH, N.P. et al. Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1691-1704, 1999.
- FROSSLING, J. et al. Validation of a *Neospora caninum* iscom ELISA without a gold standard. **Preventive Veterinary Medicine**, v.57, p.141-153, 2003.
- FUJJI, T.U. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* in female water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the southeastern region of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.99, p.331-334, 2001.
- GONDIM, L.M. et al. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. **Journal of Parasitology**, v.88, p.1159-1163, 2002.
- GONDIM, L.F.P. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.34, p.159-161, 2004.
- GONDIM, L.F.P. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.86, p. 71-75, 1999a.
- GONDIM, L.F.P. et al. *Neospora caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil. **New Zealand Veterinary Journal**, v.47, p.35, 1999b.
- GONZÁLEZ, L. et al. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. **Veterinary Record**, v.144, p.145-150, 1990.
- GOTTSTEIN, B. et al. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.679-691, 1998.
- HIETALA, S.K.; THURMOND M.C. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1669-1676, 1999.
- HO, M.S.Y. et al. Detection of *Neospora* sp. from infected bovine tissue by PCR and hybridization. **The Journal of Parasitology**, v.83, p.508-511, 1997.
- HOLMDAHL, O.J.M.; MATTSO, J.G. Rapid and sensitive identification of *Neospora caninum* by in vitro amplification of the internal transcribed spacer. **International Journal for Parasitology**, v.82, p.112-177, 1996.
- JENKINS, M. et al. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **International Journal for Parasitology**, v.32, p.631-636, 2002.
- KUNDE, J.M. et al. Protozoal encephalitis in a bovine fetus. **Southwest Veterinary**, v.33, p.231-232, 1980.
- LALLY, N.C. et al. Evaluation of two *Neospora caninum* recombinant antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine neosporosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.3, p.275-279, 1996.
- LINDSAY, D.S. et al. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v.82, p.327-333, 1999.
- LOCATELLI-DITTRICH, R. et al. Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Paraná, southern Brazil. **Veterinary Record**, v.153, p.366-367, 2003.
- LOCATELLI-DITTRICH, R. et al. Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in

- southern Brazil. **Journal of Parasitology**, v.87, p.1493-1494, 2001.
- McALLISTER, M.M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.1473-1478, 1998.
- MELO, D.P.G. et al. Prevalência de anticorpos anti- *Neospora caninum* em bovinos das microrregiões de Goiânia e Anápolis, Goiás, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, n.15, v.3, p.105-109, 2006.
- MELO, C.B. et al. Infection by *Neospora caninum* associated with bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in cattle from Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.119, p.97-105, 2004.
- MELO, C.B. et al. 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**, v.10, n.2, p.67-74, 2001.
- MOORE, D.P. et al. Neosporosis bovina: una actualización. **Veterinaria Argentina**, v.18, n.180, p.752-775, 2001.
- MINEO, T.W. et al. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.98, p.239-245, 2001.
- MORALES, E. et al. Neosporosis in Mexican dairy herds: lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. **Journal of Comparative Pathology**, v.125, p.58-63, 2001.
- ORTEGA-MORA, L.M. et al. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Veterinary Parasitology**, v.117, p.301-308, 2003.
- PARE, J. et al. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.213, p.1595-1598, 1998.
- PARÉ, J. et al. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigations**, v.7, p.273-275, 1995.
- PARÉ, J. et al. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.60, p.133-139, 1996.
- PEREIRA-BUENO, J. et al. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: pattern of transmission and age-related antibody fluctuations. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.906-909, 2000.
- PICOUX, J.B. et al. La neosporose bovine: une cause mafeure d'avortement? **Bulletin de la Sociedad Veterinaria Practice de France**, v. 82, n.4, p.177-201, 1998.
- QUINTANILLA-GOZALO, A. et al. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.900-906, 2000.
- QUINTANILLA-GOZALO, A. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1201-1208, 1999.
- REBORDOSA, X. et al. Desarrollo de un ELISA indirecto para la valoración de anticuerpos contra *Neospora caninum*. **Laboratorio Veterinario Avedila**, v.17, p.5-8, 2001.
- REICHEL, M.P.; DRAKE, J.M. The diagnosis of *Neospora caninum* abortions in cattle. **New Zealand Veterinary Journal**, v.44, p.151-154, 1996.
- 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**, v.107, p.197-207, 2002.
- ROMAND, S. et al. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. **Parasitology Research**, v.84, p.50-53, 1998.
- SAGER, H. et al. Assessment of antibody avidity in aborting cattle by a somatic *Neospora caninum* tachyzoite antigen IgG avidity ELISA. **Veterinary Parasitology**, v.112, p.1-10, 2003.
- SARTOR, I.F. et al. Ocorrência de anticorpos de *Neospora caninum* em vacas leiteiras avaliados pelos métodos ELISA e RIFI no município de Avaré, SP. **Semina: Ciências Agrárias**, v.24, n.1, p.3-10, 2003.
- SCHARES, G. et al. p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine

- abortion. **Veterinary Parasitology**, v.106, p.293-305, 2002.
- SCHARES, G. et al. Regional distribution of bovine *Neospora caninum* infection in the German State of Rhineland-Palatinate modelled by logistic regression. **International Journal for Parasitology**, v.33, p.1631-1640, 2003.
- SCHARES, G. et al. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. **Veterinary Parasitology**, v.80, p.87-98, 1998.
- SCHARES, G. et al. Use of purified tachyzoite surface antigen p38 in an ELISA to diagnose bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.1123-1130, 2000.
- SCHARES, G. et al. Serological evidence for naturally occurring transmission of *Neospora caninum* among foxes (*Vulpes vulpes*), **International Journal for Parasitology**, v.31, p. 418-423, 2001.
- SÖNDGEN, P. et al. Bovine neosporosis: immunoblot improves foetal serology. **Veterinary Parasitology**, v.102, p.279-290, 2001.
- SOUZA, S.L.P. et al. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Parana, Brazil. **Journal of Parasitology**, v.88, p.408-409, 2002.
- STENLUND, S. et al. A long-term study of *Neospora caninum* infection in a Swedish dairy herd. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.44, p.63-71, 2003.
- THURMOND, M.C.; HIETALA, S.K. Effect of congenitally-acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.58, p.1381-1385, 1997.
- THURMOND, M.C.; HIETALA, S.K. Strategies to control *Neospora* infection in cattle. **Bovine Practitioner**, v.29, p.60-63, 1995.
- THURMOND, M.C. et al. Herd-based diagnosis of *Neospora caninum*-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigations**, v.9, p.44-49, 1997.
- TREES, A.J. et al. *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. **Veterinary Parasitology**, v.109, p.147-154, 2002.
- UGGLA, A. et al. Serological responses in *Sarcocystis cruzi* infected calves challenged with *Toxoplasma gondii*. **Research Veterinary Science**, v.43, p.127-129, 1987.
- UGGLA, A. et al. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.1467-1472, 1998.
- VON BLUMRÖDER, D. et al. Comparison and standardisation of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. **Veterinary Parasitology**, v.120, p.11-22, 2004.
- WILLIAMS, D.J. et al. Novel ELISA for detection of *Neospora*-specific antibodies in cattle. **Veterinary Record**, v.140, p.328-331, 1997.
- WOUDA, W. et al. Serological diagnosis of bovine foetal neosporosis. **Journal of Parasitology**, v.83, p.545-547, 1997.
- ZIMMERMAN, K.; MANNHALTER, J.W. Technical aspects of quantitative competitive PCR. **Bio Techniques**, v.14, p. 244-249, 1996.