

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum* EM NOVILHAS
APÓS VACINAÇÃO OU INFECÇÃO EXPERIMENTAL E
EM AMOSTRAS DE LEITE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Giovana Camillo

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum* EM NOVILHAS APÓS
VACINAÇÃO OU INFECÇÃO EXPERIMENTAL E EM AMOSTRAS DE
LEITE**

por

Giovana Camillo

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**

Orientador: Fernanda Silveira Flores Vogel, Dr.

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum* EM NOVILHAS APÓS
VACINAÇÃO OU INFECÇÃO EXPERIMENTAL E EM AMOSTRAS DE
LEITE**

elaborada por
Giovana Camillo

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora:

Fernanda Silveira Flores Vogel, Dr. (UFSM)
(Presidente/orientador)

Luis Fernando Pita Gondim, Dr. (UFBA)

Sonia De Avila Botton, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 1 de março de 2011.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais João Roque Camillo e Terezinha Bortolotti Camillo pelo exemplo de caráter, honestidade, perseverança e pelo amor e carinho a mim dedicados.

AGRADECIMENTOS

A Deus agradeço a vida, a saúde e a oportunidade de buscar a realização dos meus ideais, colocando em meu caminho pessoas capazes de me instruir para meu crescimento.

A minha orientadora, professora Fernanda Silveira Flôres Vogel, minha mãe científica, por seus ensinamentos profissionais e pessoais, pela amizade, confiança, orientação e por tudo que representa para mim, principalmente como modelo profissional.

Ao professor Luís Antônio Sangioni, pela amizade, confiança e ensinamentos.

Aos meus colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias da UFSM, aos quais sempre pude ter como uma extensão da minha família, por estarem sempre dispostos a ajudar, pelo auxílio nos experimentos e pela amizade demonstrada. As minhas amigas e companheiras Ana Maria Antonello e Patrícia Bräunig, pela ajuda nos experimentos, pela amizade e por compartilharmos agradáveis momentos de descontração.

Aos professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, especialmente aos professores Rudi Weiblen, Eduardo Furtado Flores e Agueda Castagna de Vargas pela disponibilidade e pelos conhecimentos oferecidos.

Aos amigos do Setor de Virologia pela amizade, em especial, a minha grande amiga e colega Eloisa Bianchi, que em muitos momentos trocamos idéias e conhecimentos.

Ao Médico Veterinário Dr. Gabriel Ribas Pereira pela disposição em ajudar nas coletas das amostras.

A minha família, obrigada pelo carinho, dedicação e pela compreensão, principalmente nas horas em que me fiz ausente.

Ao David, pelo amor, carinho, companheirismo e pela paciência.

Aos amigos André e Cirlei Blos, minha família do coração, pelo incentivo, carinho e pela sincera amizade.

Aos sempre amigos Betina e Rodrigo pela grande amizade, carinho e compreensão.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária desta instituição, pela oportunidade de realizar mais uma etapa na minha formação.

Ao conselho nacional de pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa.

Enfim, a todos os verdadeiros amigos, que de forma direta ou indireta estiveram ao meu lado dando apoio, incentivo e estímulo nas horas boas e difíceis, minha eterna gratidão.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum* EM NOVILHAS APÓS VACINAÇÃO OU INFECCÃO EXPERIMENTAL E EM AMOSTRAS DE LEITE

AUTOR: GIOVANA CAMILLO

ORIENTADOR: FERNANDA SILVEIRA FLORES VOGEL

Santa Maria, 1 de março de 2011.

Neosporose é uma doença economicamente importante causada pelo protozoário *Neospora caninum* e caracteriza-se por causar problemas reprodutivos em bovinos, como aborto, retorno ao cio e nascimento de bezerros persistentemente infectados. O diagnóstico é baseado, principalmente, na detecção de anticorpos anti-*N. caninum* através de testes sorológicos, a partir de amostras de soro sanguíneo e também através do leite. O controle dessa enfermidade está relacionado com o descarte dos animais positivos que apresentam desordens reprodutivas, uma vez que a vacina disponível comercialmente não induz resposta imune capaz de prevenir a transmissão transplacentária e assim, o protozoário se mantém no rebanho. Neste estudo, foram realizados trabalhos envolvendo a resposta humoral frente ao protozoário bem como a detecção de anticorpos em amostras individuais e coletivas de leite pela técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Os resultados estão apresentados em três artigos. No capítulo um, o objetivo foi comparar a concentração sérica de imunoglobulinas G e M, em animais infectados experimentalmente com taquizoítos da cepa NC-1 e, em animais vacinados com uma vacina inativada. Os resultados obtidos demonstraram uma evidente oscilação no título de anticorpos, sendo possível observar que nas novilhas inoculadas a resposta imune foi mais duradoura que nas vacinadas. No segundo capítulo, buscou-se diagnosticar anticorpos contra o *N. caninum* a partir de amostras de leite, utilizando como teste, a RIFI. Quando analisadas amostras individuais de leite, observou-se uma boa concordância em relação às amostras de soro sanguíneo. Quanto maior o título sérico, maior é a probabilidade de detectar anticorpos em amostras de leite, tanto individuais, como coletivas. No capítulo três, o objetivo foi avaliar a utilização de amostras coletivas de leite para diagnóstico de rebanho ou para estudos epidemiológicos, através da detecção de anticorpos. Semelhante aos resultados obtidos no capítulo dois, as amostras coletivas de leite, quando analisadas demonstraram estarem correlacionadas com o número de animais

positivos de cada rebanho, assim como, com os títulos apresentados por esses animais. Assim, através desse estudo podemos ressaltar que em relação à vacinação, outros trabalhos precisam ser melhor conduzidos, visando buscar uma resposta imune capaz de proteger o feto por mais tempo e o mais importante, que consiga evitar ou reduzir a transmissão transplacentária. Com relação ao diagnóstico através do leite, pode-se determinar que tanto em amostras individuais como coletivas, a RIFI pode ser utilizada com segurança, sendo considerada uma maneira mais fácil de realizar estudos epidemiológicos em nível de rebanho.

Palavras-chave: vacinação; diagnóstico; RIFI; rebanhos; leite; leite coletivo

ABSTRACT

Master's Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria

ANTIBODIES ANTI-*Neospora caninum* IN HEIFERS AFTER VACCINATION OR EXPERIMENTAL INFECTION AND IN SAMPLES OF MILK

AUTHOR: GIOVANA CAMILLO

ADVISER: FERNANDA SILVEIRA FLORES VOGEL

Santa Maria, March, 1th, 2011.

Neosporosis is an economically important disease caused the protozoan *Neospora caninum* and is characterized by causing reproductive problems in cattle such as abortion, return to estrus and birth of calves persistently infected. The diagnosis is based mainly on detection of antibodies anti-*N.caninum* by serological tests, from samples of blood serum and also through milk. The control of this disease is related to the culling of positive animals that showing reproductive disorders, since no commercially available vaccine induces immune response able of preventing transplacental transmission and thus, the parasite remains in the herd. In this study, we performed studies involving the humoral response against the parasite and the detection of antibodies in individual and bulk milk samples for the indirect immunofluorescence assay (IFA). The results are presented in three manuscripts. In chapter one, the aim was to compare serum immunoglobulin G and M, in animals experimentally infected with tachyzoites of NC-1 strain, and animals vaccinated with an inactivated vaccine. The results showed a clear oscillation in antibody titers, revealing that the heifers inoculated immune response was more durable than in those vaccinated. In the second chapter, it was performed a diagnostic test of the anti-*N.caninum* antibodies from milk samples, using as a test, IFA. When analyzing individual samples of milk, there was a good correlation for samples of blood serum. The higher the serum titer, the greater the probability of detecting antibodies in milk samples, both individual and bulk milk. In chapter three, the aim it was to evaluate the use of bulk milk sample for herd diagnostic or for epidemiological studies, by detecting antibodies. Similar to results obtained in chapter two, the bulk milk sample, when analyzed by IFA demonstrated to be correlated with the number of positive animals in each herd as well as with the titles presented by these animals. Thus, through this study we emphasize that with regard to vaccination, more work needs to be better conducted in order to get an immune response able to protect the fetus longer more time and more importantly, that will prevent or reduce transplacental transmission. Regarding the diagnosis by

using the milk samples it was observed that both samples in individual and bulk milk, the IFA can be used safely and is considered an easier way to carry out epidemiological studies in herd cattle.

Key words: vaccination, diagnosis, IFA, herds, milk, bulk milk

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

FIGURA 1 (Fig.1). Títulos de imunoglobulinas G (a) e M (b) em grupos de novilhas experimentalmente infectadas e em vacinadas.....40

CAPÍTULO III

FIGURA 1. Comparação entre os resultados obtidos para detecção de anticorpos anti-*N. caninum* nas amostras individuais de soro sanguíneo (quantitativo - título de anticorpos detectados) e de leite (qualitativo - positivo/negativo). Na coluna da direita está a correlação do resultado qualitativo de leite em relação ao título de anticorpos encontrados nas amostras de soro. Foram consideradas amostras negativas no soro aquelas em que não foram detectados anticorpos na diluição de 1:50.....67

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

- TABELA 1. (QUADRO 1). Detecção de anticorpos anti-*N. caninum* pela reação de imunofluorescência indireta em amostras de soro sanguíneo e em amostras individuais e coletivas de leite.....53
- TABELA 2. (QUADRO 2). Comparação entre o título de anticorpos anti- *N. caninum* em amostras de soro sanguíneo e a detecção qualitativa de anticorpos em amostras individuais de leite através da técnica de imunofluorescência indireta (RIFI).....54

CAPÍTULO III

- TABELA 1. Análise qualitativa de amostras coletivas de leite relacionadas ao total de positivas no soro sanguíneo e no leite e a variação dos títulos de anticorpos em cada propriedade.....66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3. CAPÍTULO I. IMUNOGLOBULINAS G E M ANTI-<i>Neospora caninum</i> EM NOVILHAS APÓS VACINAÇÃO OU INFECCÃO EXPERIMENTAL.....	25
Abstract.....	25
Resumo.....	26
Introdução.....	28
Material e métodos.....	30
Resultados.....	32
Discussão.....	33
Conclusão.....	36
Agradecimentos.....	36
Referências.....	37
4. CAPÍTULO II. DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-<i>Neospora caninum</i> EM AMOSTRAS INDIVIDUAIS E COLETIVAS DE LEITE DE BOVINOS PELA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	41
Abstract.....	41
Resumo.....	42
Introdução.....	43
Material e métodos.....	46
Resultados.....	47

Discussão.....	48
Conclusão.....	50
Agradecimentos.....	51
Referências.....	51
5. CAPÍTULO III. REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-<i>Neospora caninum</i> EM AMOSTRAS COLETIVAS DE LEITE.....	55
Abstract.....	56
Introdução.....	56
Material e métodos.....	57
Resultados e discussão.....	59
Conclusão.....	62
Referências.....	62
6. CONCLUSÕES.....	68
7. REFERÊNCIAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

A neosporose é uma enfermidade de grande importância econômica, encontra-se distribuída mundialmente e pode ser considerada uma das maiores causas de aborto e perdas neonatais em bovinos. Diante disso, o diagnóstico do protozoário *N.caninum* é de fundamental importância para se determinar as devidas medidas de controle e profilaxia.

O diagnóstico é baseado principalmente em métodos indiretos, sendo a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o teste imunoenzimático (ELISA), os principais testes utilizados para detecção de anticorpos. Os fluídos comumente utilizados na metodologia de ambos os testes são o soro sanguíneo e o soro do leite. Diferentes estudos já foram realizados com o objetivo de detectar anticorpos anti-*N. caninum* através do leite utilizando o ELISA, porém ainda há poucos relatos do uso deste fluído para pesquisa de anticorpos através da RIFI.

O controle dessa enfermidade é baseado principalmente no descarte dos animais positivos que apresentam desordens reprodutivas, uma vez que a vacina disponível comercialmente não induz resposta imune capaz de prevenir a transmissão transplacentária.

Este estudo é composto por três capítulos, nos quais estão apresentados resultados envolvendo a resposta humoral frente ao protozoário *N.caninum* e, além disso, a detecção de anticorpos em amostras individuais e coletivas de leite pela técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

O primeiro capítulo tem como objetivo principal, determinar e comparar a titulação sérica de imunoglobulinas das classes G e M, em novilhas experimentalmente infectadas com uma cepa de *N. caninum* e, da mesma forma, pesquisar em novilhas vacinadas com uma vacina inativada as mesmas imunoglobulinas, buscando observar a magnitude e duração da resposta imune humoral. Já no segundo e terceiro capítulos, os objetivos concentram-se em adaptar a RIFI para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em amostras de leite bovino, avaliando a concordância entre a presença desses anticorpos em amostras de soro sanguíneo e do leite. Além disso, viabilizar o uso da RIFI para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em amostras coletivas de leite como método de detecção de rebanhos infectados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O protozoário *N.caninum* é um parasita intracelular obrigatório, importante agente causador de abortos em bovinos em todo mundo (DUBEY & LINDSAY, 1996). Em cães o parasito é responsável por desordens neurológicas severas (DUBEY et al., 1988b; DUBEY et al., 1999a).

A neosporose foi diagnosticada pela primeira vez nos Estado Unidos, quando DUBEY et al., (1988a), isolaram e descreveram um protozoário em filhotes de cães, que tinham sinais clínicos similares aos descrito por BJERKAS et al.(1984) na Noruega, passando o agente a se chamar *Neospora caninum* (DUBEY, et al., 1988a). Logo que o parasito foi reconhecido como causa de doença em cães, parasitos semelhantes foram identificados em fetos bovinos abortados, mumificados e em bezerros com paralisia neonatal (MARSH et al., 1995).

Quanto a classificação taxonômica, segundo LONG (1990), o protozoário *N. caninum* pertence ao filo Apicomplexa, família Sarcocistidae, com duas espécies descritas no gênero, o *N. caninum* (DUBEY, 1988b), isolado de cérebro de cão, e o *N. hughesi* (MARSH et al., 1998), isolado de cérebro e medula espinhal de equino.

Atualmente, a neosporose é reconhecida como uma das maiores causas de aborto e perdas neonatais em bovinos em todo o mundo, tanto para bovinos de leite, quanto de corte (ANDERSON et al., 2000; DUBEY & SCHARES, 2006). Além do descarte dos animais portadores, o protozoário tem sido associado a uma menor produção de leite, na redução significativa no ganho de peso de bezerros após o desmame e na produção de carcaças leves (BARLING et al., 2000). O *N. caninum* permanece nos bovinos durante várias gerações, como uma infecção crônica, podendo ser transmitida via transplacentária ao feto (BARR et al., 1994; SCHARES et al., 1998).

O ciclo do protozoário envolve três estágios infecciosos: bradizoítos, taquizoítos e oocistos contendo esporozoítos. Os taquizoítos e os bradizoítos são estágios intracelulares encontrados nos hospedeiros intermediários e definitivos, enquanto os oocistos se desenvolvem apenas nos hospedeiros definitivos, e são excretados junto às fezes destes animais. Os oocistos se tornam infectantes após esporulação no meio ambiente. Os taquizoítos são altamente infectantes, sendo que será essa a forma que irá fazer a infecção transplacentária (DUBEY, 2003). Os taquizoítos de *N. caninum* já foram detectados numa variedade de tecidos e tipos celulares, exibindo pouca

especificidade de hospedeiro, infectando células nervosas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, miócitos, células epiteliais dos túbulos renais e hepatócitos (HEMPHILL et al., 1999). Os bradizoítos localizam-se no interior de cistos teciduais (DUBEY et al., 1988b), onde o início da resposta imune do hospedeiro e a presença de outros fatores fisiológicos induzem a entrada dos taquizoítos nas células e a diferenciação em bradizoítos, estabelecendo a infecção pela presença dos cistos, podendo persistir no hospedeiro infectado por vários anos, sem causar nenhuma manifestação clínica (PETERS et al., 2001). A ingestão oral de cistos que contêm bradizoítos por hospedeiros carnívoros promove a diferenciação sexual do parasito nos tecidos intestinais, com a formação de oocistos não esporulados que são excretados nas fezes (DUBEY et al., 2002).

Este protozoário pode difundir-se nos rebanhos através da transmissão horizontal, pela ingestão de oocistos que são excretados pelos hospedeiros definitivos ou pela transmissão vertical. Em bovino, a principal via de transmissão é a vertical, onde a infecção transplacentária pode causar perdas reprodutivas ou pode determinar no nascimento de bezerros normais clinicamente saudáveis, porém persistentemente infectados (PI) (TREES & WILLIAMS, 2005; DUBEY, et al. 2007). A transmissão transplacentária é considerada a principal via de infecção para os bovinos, podendo acontecer com uma frequência de até 95% (DAVISON et al., 1999). É a rota de transmissão mais importante e responsável pela manutenção ou expansão da infecção no rebanho por sucessivas passagens de geração para geração (DUBEY et al., 1999a). Transmissão pós-natal e congênita recebem denominações alternativas na literatura, tais como rotas horizontal e vertical e transmissão transplacentária endógena e exógena, estas duas últimas mais recentes, com a finalidade de descrever com mais precisão a origem e a rota de infecção do feto (INNES et al., 2001). A transmissão transplacentária exógena é definida como a infecção fetal que ocorre como resultado da infecção primária, pela ingestão de oocistos, pela vaca, durante a gestação. Já a transmissão transplacentária endógena é definida como a infecção do feto de uma vaca persistentemente infectada (adquirida antes da prenhez e provavelmente congênita) depois de recrudescência ou reativação da infecção durante a gestação (TREES & WILLIAMS, 2005; DUBEY et al., 2006).

Atualmente, são reconhecidos como hospedeiros definitivos os cães (MCALLISTER et al., 1998), coiotes (GONDIM et al., 2004) e mais recentemente foi descrito em dingoes (*Canis lupus dingo*) na Austrália (KING et al., 2010). Os hospedeiros definitivos excretam oocistos do protozoário nas fezes, que após esporulação são ingeridos pelos hospedeiros intermediários. A

infecção pós-natal pode ser observada quando há o consumo de água e alimento contaminados com oocistos do hospedeiro definitivo. Nos hospedeiros intermediários, ocorrerá a formação de cistos teciduais, com o ciclo completando-se quando algum hospedeiro definitivo ingerir tecidos do hospedeiro intermediário que contenham os cistos (PARÉ et al., 1996; SARTOR et al., 2005).

O espectro de hospedeiros de *N. caninum* na fauna silvestre tem aumentado significativamente, o que dificulta o controle da transmissão do parasito para animais domésticos como bovinos e cães, uma vez que algumas espécies de animais silvestres cohabitam com animais domésticos (GONDIM et al., 2004). Recentemente, infecção natural por *N. caninum* foi confirmada em ratos e camundongos, animais de distribuição cosmopolita e habitantes de ambientes urbanos e rurais (HUANG et al., 2004; FERROGLIO et al., 2007; JENKINS et al., 2007). Recentemente o parasito foi detectado em galinhas, o que confere uma distribuição ainda mais ampla do protozoário e representa, provavelmente, grande importância epidemiológica, uma vez que galinhas são consumidas no mundo inteiro por diversas espécies animais (COSTA et al., 2008). Foi demonstrada a excreção de oocistos por cães que consumiram ovos de galinha embrionados infectados experimentalmente com *N. caninum*, o que é sugestivo que galinhas devem participar na transmissão do parasito (FURUTA et al., 2007).

Para os bovinos, a principal fonte de infecção não se dá através da ingestão dos oocistos esporulados e sim através da infecção vertical, onde durante a gestação de fêmeas soropositivas, pode ocorrer a reativação do protozoário dos cistos teciduais e infecção transplacentária. As conseqüências da infecção transplacentária são as mais diversas, podendo ocorrer morte embrionária ou aborto, refletidas como retorno ao cio com intervalo regular ou irregular, nascimento de bezerros fracos, com sinais nervosos ou nascimento de bezerros PI (DUBEY et al., 2002).

A idade da mãe, número de gestações e histórico de problema reprodutivo são fatores que aparentemente não afetam a taxa de infecção transplacentária, onde fêmeas bovinas são as mais importantes na epidemiologia desta enfermidade, sendo que através da transmissão vertical são estas que vão manter o protozoário no rebanho, estimando-se que até 95% dos animais nascidos de vacas soropositivas são clinicamente sadios, porém com infecção persistente (PI) (DUBEY et al., 2002).

Os animais PI são clinicamente normais, porém soropositivos, abrigando o parasita encistado em seus tecidos, mais comumente em células do sistema nervoso, sendo assim

considerados portadores do agente (SPEER & DUBEY, 1989). A reativação da infecção nas fêmeas prenhes infectadas ocorre, provavelmente, através da imunomodulação fisiológica da gestação, podendo resultar na transmissão transplacentária do agente ao feto, uma vez que através da transmissão vertical são estas que vão manter o protozoário no rebanho (INNES et al., 2002). Durante este processo de reativação, o protozoário deixa os cistos teciduais na forma de taquizoítos que vão fazer a infecção transplacentária e atingir o embrião ou o feto (GUY et al., 2001).

Na reprodução os efeitos da infecção são caracterizados por mortalidade embrionária durante o primeiro terço gestacional e aborto durante o segundo trimestre. Os abortos podem ser endêmicos, epidêmicos ou esporádicos. Geralmente abortos epidêmicos ocorrem pela infecção horizontal primária por meio da ingestão de oocistos presentes em alimentos ou água, enquanto abortos endêmicos ocorrem em animais persistentemente infectados (transmissão vertical), devido à recrudescência da infecção durante a gestação (DUBEY & SCHARES, 2006). No terço final de gestação a infecção normalmente não acarreta em morte fetal e aborto, mas sim no nascimento de bezerros saudáveis, porém PI, o que também pode acontecer no segundo terço gestacional (BIELSA et al., 2005).

Bezerros neonatos com neosporose apresentam sinais clínicos como os membros posteriores e/ou anteriores flexionados ou hiperestendidos, ataxia, diminuição do reflexo patelar, perda de consciência, exoftalmia, assimetria ocular e deformidades associadas com lesões nas células nervosas e, na fase embrionária, geralmente, esses estão abaixo do peso da média e têm poucas chances de sobrevivência (DUBEY & LINDSAY, 1996). As lesões nos fetos podem estar em vários tecidos, contudo, lesões degenerativas e inflamatórias são mais comuns no SNC, coração, músculo esquelético e fígado (BARR et al., 1990; BARR et al., 1991; ANDERSON et al., 1991; WOUDA et al., 1997). As lesões neurológicas se caracterizam por infiltração multifocal não supurativa, com ou sem necrose e infiltração difusa, ou ainda, lesões multifocais não supurativas da meninge. A lesão característica da neosporose no SNC consiste numa infiltração mononuclear ao redor da área central de necrose. A proliferação glial foi observada mais comumente em fetos abortados no terço final da gestação (DUBEY & LINDSAY, 1996).

Rebanhos soropositivos, tanto de leite como de corte, têm maior probabilidade de ocorrência de abortos e até 95% dos bezerros nascidos de mães soropositivas podem ser infectados congenitamente, mas nascem clinicamente normais (DUBEY et al., 2006). Alguns

autores descrevem que ocorre um decréscimo na proporção de bezerros infectados congenitamente em vacas com maior número de partos, o que pode ser explicado pelo aumento da imunidade protetora contra a transmissão transplacentária, ou seja, a transmissão vertical é mais eficiente em fêmeas mais jovens. O desenvolvimento de imunidade protetora contra novos abortos em vacas após a primo-infecção com *N. caninum* tem sido descrito por outros pesquisadores (DUBEY et al., 2006).

A transmissão do protozoário *N. caninum* através do colostro pode ser uma possível rota de transmissão vertical resultante da infecção de recém-nascidos com poucas horas de vida (UGGLA et al., 1998). Embora outro estudo demonstrado por DUBEY et al. (1998) indicou que os taquizoítos de *N. caninum* não são resistentes ao ácido clorídrico (HCL). DAVISON et al., (2001) concluíram que o protozoário *N. caninum* presente no leite e no colostro pode ser transmitidos para bezerros jovens, não infectados congenitamente, por meio do pool de colostro realizado nas fazendas leiteiras tecnificadas do Reino Unido. MOSKWA et al., (2007), descreveram e ainda se especula que em algumas situações, os bezerros podem ser infectados via colostro, se, por exemplo, um grande número de taquizoítos estiver presente no colostro ou leite de um animal individualmente.

Em relação à transmissão venérea, poucos estudos sugerem que o sêmen de touros infectados pode ser potencial vetor de transmissão da neosporose bovina (GAY et al., 2006). De qualquer forma, o DNA do protozoário pode ser encontrado no sêmen de touros naturalmente expostos, porém os resultados sugerem que a viabilidade desses organismos, quando presente, é pequena e infreqüente (DUBEY et al., 2007). A transmissão do *N. caninum* pela via venérea ou por transferência de embriões é improvável, não existindo nenhum relato deste tipo de transmissão. Neste sentido, a transferência de embriões pode ser recomendada como uma das formas de controle da transmissão vertical utilizando-se doadoras soropositivas e receptoras soronegativas (BAILLARGEON et al., 2001).

A invasão e posterior multiplicação de taquizoítos de *N. caninum* nas células do hospedeiro ativa o sistema imunológico para conter a propagação do parasita (INNES et al. 2002). Como o *Neospora caninum* é um protozoário intracelular obrigatório, a imunidade mediada por células (CMI) está amplamente envolvida na resistência do hospedeiro em relação a este parasita. Nesse sentido, KHAN et al., (1997) evidenciaram que a imunidade mediada por células está envolvida na resistência de camundongos à infecção por *N. caninum*, além do que interferon- γ

(IFN γ) e interleucina-12 (IL-12), particularmente, medeiam esta imunidade. Durante a gestação é possível que ocorra imunomodulação e respostas induzidas por INF- γ que podem causar aborto (ALMERIA et al., 2003). Tanto a imunidade inata, quanto a adquirida, estão envolvidas na resistência à neosporose (EPERON et al., 1999; LONG & BASZLER, 2000). Há evidências que enquanto uma resposta Th1 está relacionada a uma infecção aguda pelo *N. caninum* (KHAN et al., 1997; LONG et al., 1998; BASZLER et al., 1999), uma resposta Th2 está diretamente relacionada à susceptibilidade à doença (LONG & BASZLER, 2000).

O papel dos anticorpos na neosporose não está suficientemente esclarecido. Acredita-se que atuem em taquizoítos situados extracelularmente (INNES et al., 2002). Estudos acerca da resposta imune em vacas gestantes infectadas com *N. caninum* têm demonstrado aumento nos níveis de anticorpos específicos no último terço de gestação, o que indica atividade ou reativação do parasita (PARÉ et al., 1997; ANDRIANARIVO et al., 2005). Em bovinos que transmitem a infecção para sua progênie foi observado um aumento nos títulos de anticorpos (CONRAD et al., 1993; STENLUND et al., 1999; GUY et al., 2001). Da mesma forma, GUY, et al (2001) demonstraram que vacas em que não se observou transmissão vertical, conseqüentemente não apresentavam aumento nos níveis de anticorpos.

A avaliação de estudos soroepidemiológicos demonstra que a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* pode variar entre 6,8% (COSTA et al., 2001) a 65,5% (CORBELLINI et al., 2002). Esta ampla variação é em decorrência de alguns fatores como: i. tipo de amostragem utilizada; ii. população estudada; iii. histórico ou não de problemas reprodutivos (SARTOR et al., 2005); iv. vacinação do rebanho. Os primeiros relatos da detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos no país foram por BRAUTIGAM et al. (1996) em bovinos de leite nos Estados de São Paulo e em bovinos de corte no Mato Grosso do Sul. No Rio Grande do Sul, CORBELLINI et al. (2002) determinaram através da técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI) a prevalência de 11,2 % para o *N. caninum* em uma amostragem de 223 animais. Já RAGOZO et al. (2003) pela mesma técnica encontraram 20% de animais soropositivos, analisando amostras de soro de 140 bovinos neste estado. O primeiro relato confirmado de infecção ocorreu no Estado de São Paulo, em um feto bovino abortado com aproximadamente oito meses, de uma propriedade leiteira, onde vinham ocorrendo abortos (GONDIM et al. 1999), e o seu primeiro isolamento, ocorreu a partir do cérebro de um cão com sete anos de idade que apresentava neuropatia, com incoordenação e paresia de membros posteriores (GONDIM et al., 2000). No estado do Paraná, alguns levantamentos

soroepidemiológicos foram realizados com índice de prevalência variando de 21,6% a 54,5% (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2001; GUIMARÃES JUNIOR et al., 2004; CAMILLO et al., 2010).

Os sinais clínicos devem ser considerados na suspeita clínica de neosporose, porém, os exames laboratoriais são necessários para a confirmação do diagnóstico. O quadro clínico sugestivo de neosporose é a presença de sinais neurológicos e de polimiosite em bovinos jovens. Em bovinos adultos, a ocorrência de abortos e o nascimento de bezerros natimortos são sinais sugestivos de infecção por *N. caninum* (ANDERSON et al., 2000).

No diagnóstico da neosporose é importante demonstrar o protozoário *N. caninum* nas lesões e excluir outras causas de abortamento (WOUDA et al., 1997). Se as lesões no cérebro e coração forem muito severas, com a detecção dos taquizoítos do parasita, a causa provável do aborto é *N. caninum* (COLLANTES FERNÁNDEZ et al., 2002). Esse diagnóstico pode ser realizado através de técnicas que permitam a detecção de lesões, o isolamento e identificação do protozoário, detecção de ácidos nucleicos ou a demonstração de anticorpos específicos para *N. caninum* em fluídos fetais (SILVA, 2005). Os materiais de eleição para o diagnóstico de aborto por *N. caninum* em fetos abortados são: placenta, líquidos fetais, cérebro, coração e fígado (DUBEY et al., 2002). Em adultos, o diagnóstico laboratorial é obtido através da detecção de anticorpos específicos no soro sanguíneo, soro do leite ou colostro de vacas infectadas, assim como em fluídos vaginais e na saliva (OOI et al., 2000). Neste sentido, vários métodos sorológicos já foram descritos como, RIFI, ensaio imunoenzimático (ELISA), aglutinação direta e imunoblotting (JENKINS et al., 2002; HOANE et al., 2006).

O primeiro método sorológico aplicado em animais para o diagnóstico de *N. caninum* foi a RIFI, utilizando-se taquizoítos como antígenos, sendo este considerado um método de referência para o diagnóstico sorológico (HEMPHILL et al., 2000). É baseado no princípio da fixação de taquizoítos do protozoário em lâminas de microscopia (BJÖRKMAN & UGGLA, 1999). Como os taquizoítos utilizados como antígeno na RIFI apresentam-se intactos, o teste detecta principalmente anticorpos direcionados para antígenos presentes na superfície celular do parasita (ANDRIANARIVO et al., 2001). Estudos epidemiológicos em diversos hospedeiros têm demonstrado que a RIFI, para *N. caninum*, apresenta uma baixa ocorrência de reação cruzada com outros parasitas (TREES et al., 1999). A técnica é muito utilizada nos laboratórios para o diagnóstico de neosporose, porém, o título de anticorpos (ponto de corte) depende da qualidade do

microscópio de imunofluorescência do laboratório. Conseqüentemente, cada laboratório deveria estabelecer o seu próprio ponto de corte para o teste (DUBEY & SCHARES, 2006).

Com relação ao ELISA a maioria dos testes para detectar anticorpos específicos anti-*N. caninum* utiliza como antígenos taquizoítas lisados. Os valores de especificidade e sensibilidade variam de acordo com o *kit* comercial utilizado, devido ao tipo de antígeno, a sua concentração, diluição do soro e do conjugado, e especificidade do conjugado para um isótipo em particular, causando as diferenças dos valores de absorvância dos diversos ELISA do mercado (BJORKMAN & UGGLA, 1999; DUBEY & SCHARES, 2006).

Outro teste que também pode ser utilizado para avaliar a resposta imune humoral é o imunoblotting. O reconhecimento antigênico de diversos polipeptídios (17, 29, 30, 37 kDa, dentre outros) tem contribuído para a identificação de diferentes estágios de infecção (HEMPHILL et al., 1999; SCHARES et al., 2000; SCHARES et al., 2001; MINEO et al., 2001).

O teste de aglutinação direta apresenta grande vantagem de não necessitar de anticorpos secundários. Esse teste foi descrito por ROMAND et al., (1998), sendo observadas sensibilidade e especificidade semelhante a RIFI (BJÖRKMAN & UGGLA, 1999).

A sorologia é utilizada como método diagnóstico nos estudos epidemiológicos de abortamentos por *N. caninum* e para fornecer informações sobre o estágio de infecção. Em bezerros ou bovinos adultos, os anticorpos específicos IgM e IgG aparecem no sangue poucos dias após infecção primária. O pico máximo dos níveis de IgM ocorre duas semanas após a infecção e os níveis de IgG aumentam durante a primeira semana até três a seis meses após a infecção experimental primária (WILLIAMS et al., 2000).

Todos os testes sorológicos, no entanto, devem ser interpretados com precaução, porque o sistema imune não é estático e os níveis de anticorpos flutuam, principalmente para os parasitas que formam cistos teciduais e podem recrudescer com uma imunossupressão (WALDNER et al., 1998). Nos bovinos os níveis de anticorpos anti-*N. caninum* flutuam durante o período de gestação e em alguns casos podem diminuir abaixo do limite de detecção (CONRAD et al., 1993). Os testes sorológicos têm a vantagem de que podem ser aplicados *antemortem* e podem fornecer informações do estágio da infecção. Níveis de anticorpos específicos podem persistir durante toda a vida, mas flutuam e as vezes estão abaixo do limite de detecção dos testes sorológicos (DUBEY et al., 2006). Entretanto, um dos problemas com os testes sorológicos para *N. caninum* é que a maioria dos laboratórios de pesquisa e de diagnóstico desenvolve seu próprio método e

determinam os pontos de corte a serem utilizados para interpretação dos resultados. A comparação entre títulos ou valores de absorbância obtidos entre os diferentes laboratórios não é possível (BJÖRKMAN & UGGLA, 1999).

Achados de anticorpos contra o *N. caninum* em fetos pode estabelecer um diagnóstico de infecção transplacentária, mas um resultado negativo pode não ser informativo, devido à formação de resposta imunológica fetal depender de seu estágio gestacional, nível de exposição e tempo entre infecção e aborto (DUBEY, 2003). Também se deve ter cuidado na interpretação de resultados sorológicos em bovinos na faixa etária entre 13 e 24 meses de idade, devido a possibilidade de ocorrer resultados falso negativos, pelo declínio de anticorpos nesta idade em animais infectados congenitamente (HIETALA & THURMOND, 1999). Em bovinos adultos, HÄSLER et al. (2006), detectaram um aumento significativo nos níveis séricos de anticorpos anti-*N. caninum* no último mês de gestação, assim como, PARÉ et al. (1996), observaram vacas que apresentavam altos níveis séricos de anticorpos durante o final da prenhez ou um aumento na sua quantidade entre o 3º e o 8º mês de gestação, apresentavam maior probabilidade de transmitir neosporose congenitamente quando comparadas com aqueles animais com baixos níveis de anticorpos ou com níveis decrescentes.

O diagnóstico de aborto por *N. caninum* não deve ser baseado somente no método sorológico (SAGER et al., 2001; PEREIRA-BUENO et al., 2003). O resultado sorológico positivo em um bovino com histórico de aborto indica somente que ocorreu exposição do animal ao parasita, sendo necessário demonstrar o protozoário no feto e, se possível, incluir as lesões histopatológicas para confirmar o diagnóstico (PEREIRA-BUENO et al., 2003), como: encefalite multifocal não supurativa, necrose focal do miocárdio, miocardite não supurativa, com posterior identificação do agente por imunoistoquímica (DUBEY et al., 2006; PESCADOR et al., 2007). Se o exame do soro materno, fluídos corporais fetais ou tecidos fetais é positivo ao *N. caninum* pela sorologia ou PCR, o aborto pode estar associado ao *N. caninum*, mas é importante relacionar outras causas potenciais. Se as lesões no cérebro e coração são graves e os taquizoítos de *N. caninum* estão presentes nas lesões, muito provavelmente a causa do aborto é devido à neosporose (DUBEY e SCHARES, 2006).

O controle e profilaxia da neosporose se restringem em: identificar e descartar as fêmeas soropositivas, realizando a reposição com fêmeas soronegativas ao agente; nas propriedades com animais negativos ao *N. caninum*, impedir a entrada de fêmeas positivas; proteger a ração e a água

dos bovinos contra contaminação pelas fezes de cães e outros hospedeiros definitivos, bem como impedir que estes possam ingerir fetos abortados ou membranas fetais, realizando a remoção de tecidos potencialmente infectantes do ambiente (DUBEY, 1999; DUBEY et al, 2007).

Pesquisas sobre vacinação para a neosporose têm como o objetivo a inibição da transmissão congênita em bovinos que não tiveram contato com o protozoário *N. caninum* (INNES et al., 2005). Existe uma vacina disponível comercialmente, preparada a partir de taquizoítos inativados, a qual é capaz de induzir apenas 46% de proteção (ROMERO et al., 2004), limitando-se em reduzir apenas o índice de abortos, não sendo capaz de proteger contra a transmissão vertical.

Para parasitas intracelulares, como *N. caninum*, as vacinas inativadas não promovem uma resposta imune apropriada, sendo um fator crítico em relação à imunidade protetiva (INNES et al., 2002). Vacinas vivas, quando testadas em camundongos (MILLER et al., 2005) e em bovinos (WILLIAMS et al., 2007) tem demonstrado uma excelente proteção, porém podem apresentar problemas em relação a segurança e meia-vida curta.

ANDRIANARIVO et al., (2005), demonstraram que uma vacina inativada, apesar de aumentar a resposta imune celular e produção de IFN γ , não conseguiu impedir a transmissão vertical do protozoário. Moore et al.(2005), pesquisou uma vacina inativada, durante a gestação, e os animais vacinados apresentaram níveis de anticorpos específicos e de IFN γ em quantidades similares àqueles de animais naturalmente infectados.

Com relação à epidemiologia, controle e profilaxia deste protozoário existem ainda vários pontos sem resposta. Neste sentido, vários trabalhos devem ser realizados principalmente no que diz respeito ao ciclo do protozoário, a resposta imune, ao diagnóstico e a produção de vacinas.

3. CAPÍTULO I

Imunoglobulinas G E M anti-*Neospora caninum* em novilhas após vacinação ou infecção experimental¹

Giovana Camillo², Alfredo Skrebsky Cezar², Gustavo Toscan², Felipe Pivoto², Ana Maria Antonello², Patrícia Bräunig², Luís Antônio Sangioni², Fernanda S.Flôres Vogel²

(Artigo a ser submetido para a revista científica Pesquisa Veterinária Brasileira, 2011)

ABSTRACT.- Camillo G., Cezar A. S., Toscan G., Pivoto F., Antonello A. M., Bräunig P., Sangioni L.A., Vogel F. S. F. 2011. [**Anti-*Neospora caninum* immunoglobulins G and M in ‘heifers after vaccination or experimental infection.**] Imunoglobulinas G e M anti-*Neospora caninum* em novilhas após vacinação ou infecção experimental. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00 (0): 00-00. Laboratório de Doenças Parasitárias, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: giovanacamillo@yahoo.com.br

Neospora caninum infection in cattle has been recognized worldwide and is now accepted as an important cause of abortion in cattle. The control of neosporosis is based mainly on the identification and discard of female carriers and to reduce abortion rates, one can use vaccination. Therefore, the objective of this study was to determine the serum titer of the immunoglobulins (Ig) G (IgG) and M (IgM) in heifers experimentally infected with strain the NC-1 *N. caninum*, and heifers vaccinated with an inactivated vaccine commercially available. To this end, two heifers groups were formed (n = 7) which received, respectively, the dose of 1×10^7 strain tachyzoites NC-1 intravenously and by intramuscular (group NC-1) or 5 mg/Kg^{-1} a commercial

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. *Autor para correspondência: giovanacamillo@yahoo.com.br

vaccine, subcutaneously, with reinforcement at the same dose after 34 days (group VAC). Blood serum samples were evaluated by indirect immunofluorescence assay (IFA) until 180 days after the start of the experiment. Titles of IgM ranged from 50 to 800 and IgG titles, from 50 to 6,400. In both groups IgM and IgG were detectable from the third day post-infection or post-vaccination. In experimentally infected heifers, the peak was at day 14 IgM and IgG in 20 days. In the vaccinated group, there was a peak IgM from 7 days remaining until day 10, and the peak of IgG in day 14. The heifers of the vaccinated group received a booster dose after 34 days, which resulted in new peak of IgG at 45 days of the experiment. However, even after the second dose, at 120 days of the experiment, there were already vaccinated heifers with IgG non-detectable response. Both in experimentally infected heifers and in those vaccinated, there was a gradual decrease of antibody titers. These results demonstrate that both the magnitude and duration of humoral response to infection is higher compared to the heifers vaccinated. Moreover, from this kinetic titration of serum Ig, we can predict that the decrease of the titers will determine susceptibility to reactivation of the parasite in cattle and carriers suggests that vaccination of heifers had to be done at shorter intervals than those recommended by the manufacturer and closer to the reproductive period, probably indicating that anti-vaccine for use if you have to be performed every 60 days during pregnancy.

INDEX TERMS: Antibodies, seroconversion, vaccination, indirect immunofluorescence.

RESUMO.- A infecção por *Neospora caninum* em bovinos tem sido relatada em todo mundo e é atualmente aceita como importante causa de aborto em bovinos. O controle da neosporose é baseado principalmente na identificação e descarte de fêmeas portadoras e para reduzir as taxas de aborto, pode-se utilizar a vacinação. Por isso, o objetivo deste estudo foi determinar a curva de

titulação sérica de imunoglobulinas (Ig) das classes G (IgG) e M (IgM) em novilhas não-prenhes infectadas experimentalmente com a cepa NC-1 de *N. caninum* ou vacinadas com uma vacina inativada, disponível comercialmente. Para tanto, foram formados dois grupos (n=7) de novilhas os quais receberam, respectivamente, a dose de 1×10^7 taquizoítos da cepa NC-1 pelas vias intravenosa e intramuscular profunda (grupo NC-1) ou 5 mg/Kg^{-1} de vacina comercial, via subcutânea, com reforço na mesma dose após 34 dias (grupo VAC). Amostras de soro sanguíneo foram avaliadas por reação de imunofluorescência indireta (RIFI) até decorridos 180 dias do início do experimento. Os títulos de IgM variaram de 50 a 800 e os de IgG, de 50 a 6.400. Em ambos os grupos IgM e IgG foram detectáveis a partir do terceiro dia pós-infecção ou pós-vacinação. Nas novilhas infectadas experimentalmente, o pico de IgM foi no dia 14 e de IgG no dia 20. Já no grupo vacinado, observou-se pico de IgM a partir do dia 7 mantendo-se até o dia 10, e o pico de IgG no dia 14. As novilhas do grupo vacinado receberam dose de reforço após 34 dias, o que resultou em novo pico de IgG aos 45 dias do experimento. Entretanto, a partir dos 120 dias de experimento não detectou-se IgG anti-*N. caninum* em algumas novilhas do grupo vacinado. Tanto nas novilhas infectadas experimentalmente quanto nas vacinadas, houve decréscimo gradual dos títulos de anticorpos. Estes resultados demonstram que tanto a magnitude quanto a duração da resposta humoral à infecção é maior comparando-se à das novilhas vacinadas. Além disto, a partir desta cinética de titulação sérica das Ig, pode-se sugerir que o decréscimo dos títulos determinará a susceptibilidade à reativação do protozoário em bovinos portadores e sugere que a vacinação de novilhas teria que ser feita em intervalos menores do que os preconizados pelo fabricante e mais próxima do período reprodutivo, provavelmente contraindicando essa vacina para o uso, se tiver que ser realizada a cada 60 dias durante a gestação.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Anticorpos, soroconversão, vacina, imunofluorescência indireta

INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário apicomplexa que se encontra amplamente distribuído em todo o mundo (Dubey, 2003). Diversos estudos demonstram a importância deste parasita como causador de doenças reprodutivas em diferentes espécies animais, principalmente nos bovinos, sendo responsável por perdas econômicas significativas para a pecuária (Anderson et al. 2000).

Este protozoário tem o cão (McAllister et al., 1998), o coiote (Gondim et al., 2004) e o dingo (KING et al., 2010), como hospedeiros definitivos e os bovinos, além de outras espécies, como hospedeiros intermediários (Dubey et al., 2003). *N. caninum* se dissemina tanto por transmissão vertical (transplacentária), como por transmissão horizontal, a qual se dá pela ingestão de oocistos que são excretados nas fezes dos hospedeiros definitivos (Dubey et al., 2003). A transmissão vertical é a principal responsável pela manutenção da infecção em rebanhos bovinos, podendo ocorrer em gestações subsequentes de uma mesma vaca e ao longo de várias gerações (Paré et al., 1996). A reativação da infecção nas fêmeas prenhes infectadas tem sido atribuída à imunomodulação fisiológica da gestação, podendo resultar na transmissão transplacentária do agente ao feto. Isto sugere que os bovinos não desenvolvem uma imunidade protetiva contra o protozoário ao ponto de prevenir a transmissão vertical do parasita (Innes et al., 2002).

O aborto causado por *N. caninum* é o resultado da infecção letal do feto a partir da parasitemia durante a gestação ou de danos na placenta. Esses casos podem ocorrer na primoinfecção pela ingestão de oocistos de *N. caninum* ou na reativação da infecção em vacas cronicamente infectadas. Os principais fatores que influenciam no resultado da infecção por este parasita são o período da gestação, o nível e a duração da parasitemia durante a gestação, a

resposta imune materna efetiva e a habilidade do feto em montar uma resposta imune eficaz (Innes et al., 2001).

Em estudos sobre a resposta imune em vacas gestantes infectadas com *N. caninum* têm sido demonstrados aumento nos níveis de anticorpos específicos no último terço de gestação, o que indica atividade ou reativação do parasita (Paré et al., 1997; Andrianarivo et al., 2005). Quando há este aumento dos títulos de anticorpos no final da gestação, existe maior possibilidade de vacas gerarem bezerros infectados congenitamente, além do que, os riscos de aborto diminuem comparando-se a animais que tem baixo título de anticorpos. Isto indica que a resposta imune materna tem grande influência em relação à infecção congênita e aborto (Paré et al., 1997).

Atualmente, existem poucas estratégias eficientes para o controle da neosporose bovina, sendo a vacinação uma alternativa proposta para a redução de abortos na tentativa de impedir a transmissão vertical (Innes & Vermeulen, 2006). Visando reduzir o índice de abortos desencadeados pela neosporose, foi desenvolvida uma vacina comercial (Bovilis® Neoguard), preparada a partir de taquizoítos inativados de *N. caninum*, além do adjuvante SPUR (Bielsa et al., 2004). A vacina é administrada via subcutânea, em duas ocasiões: no primeiro trimestre da gestação e com 3 a 4 semanas de intervalo (Innes & Vermeulen, 2006).

O diagnóstico da neosporose em rebanhos, em geral, baseia-se na detecção de anticorpos contra *N. caninum*. Os animais com sorologia positiva são considerados supostamente cronicamente infectados. Na maioria dos casos utiliza-se a detecção de IgG no soro sanguíneo para o diagnóstico, entretanto, com essa abordagem é possível que animais que tenham sido infectados muito recentemente não sejam detectados, devido à níveis baixos de IgG. Por isso, torna-se de grande importância avaliar a partir de quando IgM e IgG passam a ser detectáveis em bovinos após a infecção experimental por *N. caninum* ou a vacinação com taquizoítos inativados. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar e comparar a titulação sérica de imunoglobulinas

das classes G e M durante 180 dias em novilhas experimentalmente infectadas com *N. caninum* e em novilhas vacinadas com uma vacina inativada comercialmente disponível no mercado.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental

Para a realização deste estudo foram selecionadas 14 novilhas com idade aproximada de 24 meses, soronegativas para *N. caninum* (avaliadas por RIFI com diluição do soro sanguíneo de 1:50; dados não-demonstrados). As novilhas foram divididas, por conveniência, em dois grupos de sete animais cada, sendo denominados grupo NC-1 (animais infectados) e grupo VAC (animais vacinados). Esse trabalho foi realizado conforme indicações do comitê de ética e bem-estar animal.

As novilhas do grupo NC-1 foram infectadas com $1,0 \times 10^7$ taquizoítos da cepa NC-1 do protozoário *N. caninum*. A dose infectante foi dividida em duas alíquotas iguais, as quais foram administradas pelas vias intravenosa e intramuscular profunda. As novilhas do grupo VAC foram vacinadas com duas doses da vacina comercial inativada, via subcutânea, sendo a primeira aplicação realizada no dia zero e a segunda no dia 34 após o início do estudo. Todas as novilhas foram monitoradas durante um período de 180 dias, dentro do qual realizou-se um total de 13 coletas de amostras de sangue para soro sanguíneo, com intervalos representados na figura 1 (a e b).

Cultivo celular e inoculação experimental

O antígeno utilizado para o inóculo, assim como para a preparação das lâminas da RIFI, foi constituído de taquizoítos da cepa NC-1 de *N. caninum*, obtidos através de cultivo em células VERO (*green monkey kidney cells*), mantidas em meio RPMI com soro fetal bovino a 10%. Após

a destruição do tapete celular pelos taquizoítos, o conteúdo total dos cultivos foi centrifugado a 2000xg por 10 min. Seqüencialmente, os taquizoítos foram ressuspensos com meio RPMI e procedeu-se a retirada de uma alíquota para a contagem de taquizoítos em câmara de *Neubauer*. Posteriormente, os taquizoítos foram re-diluídos em meio RPMI, obtendo-se uma concentração de 1×10^7 taquizoítos para cada 2 ml do inóculo. As novilhas do grupo NC-1 foram então infectadas pelas vias intravenosa (1 ml) e intramuscular profunda (1 ml).

Coletas

Amostras de sangue foram coletadas por punção da veia coccígea durante um período de 180 dias, totalizando 13 coletas com intervalos definidos (Figura 1). Seqüencialmente, as amostras de sangue foram submetidas à centrifugação (a 1000xg por 10 min) para a obtenção do soro. O soro foi utilizado para a pesquisa de imunoglobulinas das classes G e M, através da RIFI.

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A RIFI foi baseada na metodologia descrita por Paré et al. (1995). Em um primeiro momento, as amostras de soro foram testadas para a presença de imunoglobulinas G e M na diluição de 1:50. Quando positivas nesta diluição, as amostras foram submetidas à titulação para a determinação do título máximo da reação. Como anticorpos secundários, utilizaram-se anti-IgG^{®4} e anti-IgM^{®5} bovinas conjugadas à fluoresceína, sendo consideradas positivas as reações em que observaram-se taquizoítos com toda superfície fluorescente (Conrad et al., 1993). Em cada lâmina testada, controles negativo e positivo foram utilizados.

⁴ Anti-IgG[®] bovina conjugada à fluoresceína (FITC): *Affinity Purified Antibody Fluorescein*. Clopper Road 910, Gaithersburg, MD 20878 USA. www.kpl.com

⁵ Anti-IgM[®] bovina conjugada à fluoresceína (FITC): *Affinity Purified Antibody Fluorescein*. Clopper Road 910, Gaithersburg, MD 20878 USA. www.kpl.com

Análise dos Dados

Os títulos resultantes de cada RIFI foram transformados ao logaritmo da diluição com expoente 2 e base 5 para 2^x , para permitir que os dados fossem analisados por meio de estatística paramétrica. Com isto tem-se: 1:50 = 1, 1:100 = 2, e assim por diante. Os dados foram agrupados por tratamento (NC-1 e VAC) a cada dia de coleta de soro (0 a 13) e as médias aritméticas dos dados transformados foram extraídas para o cálculo do “Título Médio Geométrico” (GMT). A seguir, os dados foram submetidos à análise estatística, utilizando-se teste não-paramétrico, Mann-Whitney, através do programa estatístico SAS (1997), sendo considerados significativos quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Detectaram-se anticorpos contra *N. caninum* em todas as novilhas, tanto nas experimentalmente infectadas (grupo NC-1) quanto nas vacinadas (grupo VAC) (Figura 1). O nível e a duração da resposta foram de maior magnitude no grupo NC-1 do que no grupo VAC, observando-se resposta mais evidente e duradoura de IgG comparada a IgM em ambos os casos.

Os títulos de IgG variaram de 50 a 6.400 (GMT=1 a 8), tanto nas infectadas experimentalmente quanto nas vacinadas. O pico de IgG no grupo infectado foi observado no dia 20 pós-inoculação (p.i.), com títulos variando desde 200 até 6.400 (GMT = 3 a 6). Os níveis de anticorpos encontrados neste dia foram estatisticamente superiores aos do grupo vacinados ($P < 0,05$). No grupo vacinado, o pico de IgG foi no dia 14 pós-vacinação (p.v.), com títulos entre 100 e 6.400 (GMT = 3,71). Após a revacinação, os títulos de IgG aumentaram. A partir do dia 60 p.v., os títulos séricos de IgG começaram a decrescer não apresentando diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$). No grupo VAC, aos 120 dias p.v., uma novilha já não apresentava anticorpos detectáveis e, no dia 180 p.v., em seis novilhas não foi detectada IgG.

Em relação à detecção de IgM, em ambos os grupos, os títulos variaram de 50 a 800 (GMT=1 a 5). Houve detecção de IgM a partir do dia 03, nos dois grupos, porém não foi observada diferença estatística ($P < 0,05$). Nas novilhas infectadas (NC-1), o pico de detecção de IgM foi observado no dia 14 p.i., com variação dos títulos de 50 a 800 (GMT = 2,85) com diferença significativa ($P < 0,05$). A partir daí, os títulos de anticorpos decresceram gradativamente. No dia 180 p.i., todas as novilhas apresentavam títulos de 50.

No grupo de novilhas vacinadas (VAC), o pico de IgM ocorreu no dia 7 p.v. (GMT = 3). Esta mesma média de titulação manteve-se até o dia 10 p.v., com posterior decréscimo. Após a segunda dose da vacina, e em todas as novilhas, observou-se um leve aumento dos títulos de IgM, porém sem significância estatística. Tanto no grupo das inoculadas quanto das vacinadas, a resposta de IgM regrediu progressivamente, sendo observada diferença estatística ($P < 0,05$) na resposta de IgM no grupo inoculado em relação ao vacinado, a partir do dia 7 até o final do estudo.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo reforçam dados importantes com relação à patogenia, controle e profilaxia da neosporose bovina. Fica evidente o declínio nos títulos de anticorpos tanto após a infecção quanto após a vacinação. Isso está de acordo com Conrad et. al, (1993), que ao acompanharem vacas naturalmente infectadas com *N. caninum*, que haviam abortado, observaram que do primeiro ao quinto mês após o aborto, houve uma variação nos títulos de anticorpos de todas as novilhas, assim como um considerável declínio. Segundo Venturini et al. (1999), essa constatação implica na dificuldade de interpretação dos resultados dos testes para detecção de anticorpos anti-*N. caninum*, que muitas vezes, mesmo apresentando títulos baixos ou sendo soronegativos, não significam necessariamente que o animal não esteja

infectado. Sugere-se que a oscilação, assim como a elevação dos títulos de anticorpos pode indicar uma possível reativação da infecção e uma re-estimulação da produção de anticorpos pelo agente (Paré et al., 1997). Os resultados obtidos no presente estudo, utilizando novilhas não-gestantes, podem ser utilizados como parâmetro para o monitoramento sorológico de matrizes em rebanhos bovinos. Especialmente no que diz respeito a infecções recentes, considerando-se a detecção de IgM como indicativo.

Aos 180 dias p.i., duas das 7 novilhas infectadas eram soronegativas para IgG (diluição = 1:50). Caso considerássemos a diluição de 1:100 ou 1:200, utilizadas como ponto-de-corte no diagnóstico, seis animais seriam considerados negativos. Se o ponto-de-corte fosse de 1:200, todas as novilhas teriam diagnóstico negativo já no dia 120 p.i. Assim, para efeito de diagnóstico, os dados deste estudo indicam um maior grau de segurança da utilização da diluição de 1:100 como ponto-de-corte, e para fins de triagem de animais para serem utilizadas em pesquisa, sugere-se o uso da diluição de 1:50.

A resposta imune das fêmeas bovinas não-gestantes, muitas vezes é suficiente para combater a parasitemia e a infecção sistêmica pelo parasita, induzindo a sua evasão ao sistema imune com a formação de cistos teciduais, especialmente no sistema nervoso central. Do ponto de vista da patogenia da neosporose, a oscilação nos níveis de anticorpos favorece a reativação do protozoário. Teoricamente, quanto maior o nível de anticorpos, menor a chance de ocorrer a infecção vertical durante a gestação. No entanto, de uma gestação para outra, os títulos séricos podem reduzir a níveis favoráveis à reativação e infecção transplacentária (Conrad et al., 1993).

Ainda que anticorpos anti-*N. caninum*, por si só, possam não prevenir a transmissão vertical, já foi demonstrado que vacas soropositivas com altos níveis de anticorpos no terceiro trimestre da gestação têm probabilidade menor de abortar do que vacas com níveis baixos de anticorpos (Paré et al., 1997). Isto pode ser devido ao efeito combinado do nível de anticorpos na

vaca e da imunocompetência do feto neste estágio da gestação. Assim, pode-se dizer que o destino do feto depende da sua idade gestacional, do momento da parasitemia e da carga parasitária (Williams et al., 2000).

Como anteriormente mencionado, os títulos de IgG foram mais altos e mais duradouros no grupo infectado experimentalmente. No entanto, Moore et al. (2005), ao avaliar em animais no segundo trimestre gestacional, sendo um grupo naturalmente infectado e outro vacinado, observou o contrário. Ou seja, o título de anticorpos nas novilhas vacinadas foi maior do que naquelas naturalmente infectadas. Isto pode ter decorrido de variações em relação ao estado fisiológico dos animais (prenhez), à cepa do protozoário utilizada, à via de inoculação e ao título inoculado, bem como ao imunógeno utilizado. Maley et al. (2001) inocularam animais com diferentes títulos (dosagem baixa - 5×10^6 e dosagem alta - 5×10^8) e observaram, através da RIFI, que houve uma pequena flutuação nos níveis de IgG, mantendo-se elevados os títulos durante os 12 meses avaliados. No entanto, no presente estudo, embora a dose administrada tenha sido alta (1×10^7), em apenas 180 dias, pode-se observar que os títulos de anticorpos foram decrescendo gradativamente. Em alguns animais, a resposta por IgG foi inferior a 50.

Em relação a este protozoário, uma vacina ideal deve ser capaz de induzir uma resposta protetiva a grande parte dos animais imunizados, inclusive prevenindo ou diminuindo a ocorrência de infecção transplacentária. Em experimento de campo, Bielsa et al. (2004) apóiam a hipótese de que a vacinação leva a uma resposta imunológica materna, que protege o feto da morte durante seu período de imaturidade imunológica (antes de 6 meses), resultando em um bezerro clinicamente saudável. Este argumento é necessário para defender o uso da vacina aqui utilizada, que produziu títulos pouco duradouros de imunoglobulinas e, portanto, conferiria imunidade passageira aos vacinados. Não obstante, deve-se considerar que o presente experimento não foi realizado para testar a proteção vacinal frente à infecção natural, mas

demonstra que os níveis de anticorpos produzidos pela vacinação decrescem e um curto período de tempo. Além disso, podem-se realizar estudos com o intuito de avaliar a resposta imune celular nestes grupos.

Embora a vacina induza a formação da resposta imune adaptativa com a produção de anticorpos, a partir dos resultados do presente estudo pode-se verificar que os títulos induzidos, bem como a duração dos anticorpos circulantes, podem prejudicar a eficácia desta vacina. Assim, reforça-se a necessidade de vacinar os animais próximo a estação reprodutiva para garantir os níveis de anticorpos entre o 4º e 5º mês de gestação, fase na qual a reativação do *N. caninum* é mais freqüente (Williams et al., 2003). O desejável é que se desenvolva uma vacina atenuada cuja resposta seja mais eficaz e duradoura contra a infecção pelo *N. caninum*.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram títulos detectáveis de imunoglobulinas G e M e que os mesmos oscilaram tanto no grupo das novilhas infectadas experimentalmente com *N. caninum*, quanto no das vacinadas com a vacina inativada principalmente em relação à IgG. Além disso, foi possível observar que nas novilhas inoculadas a resposta imune foi mais duradoura que nas vacinadas, sugerindo que o uso desta vacina, da forma que é preconizada, deverá ser reavaliado. Mais estudos devem ser realizados no sentido de melhor esclarecer a resposta vacinal, e de alguma maneira estabelecer uma forma de controlar a neosporose.

Agradecimentos: Ao professor Luis Felipe Lopes pelo auxílio concedido na análise estatística desse trabalho.

REFERÊNCIAS

- Andrianarivo, A. G., Anderson, M. L., Rowe, J. D., Gardner, I. A., Reynolds, J. P., Choromanski, L. and Conrad, P. A. 2005. Immune responses during pregnancy in heifers naturally infected with *Neospora caninum* with and without immunization. *Parasit. Res.* 96, 24–31.
- Anderson, M.L., Andrianarivo, A.G., Conrad, P.A. 2000. Neosporosis in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61, 417–431.
- Bielsa, J.M., Romero, J.J., Heuer, C. 2004. Controle de neosporose em bovinos com Bovilis Neoguard: a experiência de campo. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 13, 34-37.
- Conrad, P.A., Sverlow, K., Anderson, M., Rowe, J., Bondurant, R., Tuter, G., Breitmeyer, R., Palmer, C., Thurmond, M., Ardans, A., Dubey, J.P., Duhamel, G., Barr, B. 1993. *J. Vet. Diagn. Investig.* 5, 572-578.
- Dubey, J.P. 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean j. Parasitol.* 41, 1-16.
- Gondim, L.F., McAllister, M.M., Pitt, W.C. & Zemlicka, D.E. 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 34, 159-161.
- Innes, E.A., Wright, S.E., Maley, S., Rae, A., Schock, A., Kirvar, E., Bartley, P., Hamilton, C., Carey, I.M., Buxton, D., 2001. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.* 31, 1523–1534.
- Innes, E.A., Andrianarivo, A.G., Björkman, C., Williams, D.J.L., Conrad, P.A. 2002. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol.* 18, 497–504.
- Innes, E.A., Vermeulen, A.N., 2006. Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites *Eimeria*, *Toxoplasma* and *Neospora*. *Parasit.* 133, 145–168.

- Maley, S. W., Buxton, D., Thomson, K., Schriefer, C.E.S., Innes, E. A. 2001. Serological analysis of calves experimentally infected with *Neospora caninum*: a 1-year study. *Vet. Parasitol.* 96, 1-9.
- McAllister, M.M., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Jolley, W.R., Wills, R.A. & McGuire, A.M. 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 28, 1473-1478.
- McAllister, M.M., Björkman, C., Anderson-Sprecher, R., Rogers, D.G., 2000. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 217, 881–887.
- Moore, D. P., Leunda, M. R., Zamorano, P. I., Odeón, A.C., Romera, S.A., Cano, A., De Yaniz, G., Venturini, M.C., Campero, C.M. 2005. Immune response to *Neospora caninum* in naturally infected heifers and heifers vaccinated with inactivated antigen during the second trimester of gestation. *Vet. Parasit.*, 130, 29–39.
- Paré, J., Hietala, S. K., Thurmond, M. C. 1995. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. **J. Vet. Diag. Invest**, 7, 273-275.
- Paré, J., Thurmond, M. C.; Hietala, S.K. 1996. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhoo mortality. *Can. J. Vet. Res.*, 60, 133–139.
- Paré, J., Thurmond, M. C., Hietala, S. K. 1997. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J. Parasitol.*, 83,82–87.
- SAS, Statistical Analysis System. User's guide Stat. 2.ed. Cary, 1997. 456p.
- Thurmond, M., Hietala, S., Blanchard, P.C., 1997. Herd-based diagnosis of *Neospora caninum*-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9, 44–49.
- Venturini, M.C., Venturini, L., Bacigalupe, D., Machuca, M., Echaide, I., Basso, W., Unzaga, J.M., Di Lorenzo, C., Guglielmone, A., Jenkins, M.C., Dubey, J.P. 1999. *Neospora caninum*

infections in bovine foetuses and dairy cows with abortions in Argentina. *Internat. J. Parasit.*, 29, 1705-1708.

Williams, D. J., Guy, C. S., McGarry, J. W., Guy, F., Tasker, L., Smith, R.F., MacEachern, K., Cripps, P.J., Kelly, D.F., Trees, A.J. 2000. *Neospora caninum* associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasit.*, 121, 347–358.

Williams, D.J.L., Guy, C.S., Smith, R.F., Guy, F., McGarry, J.W., Macay, J.S., Trees, A.J. 2003. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. *Int. J. Parasitol.* 33, 1059–1065.

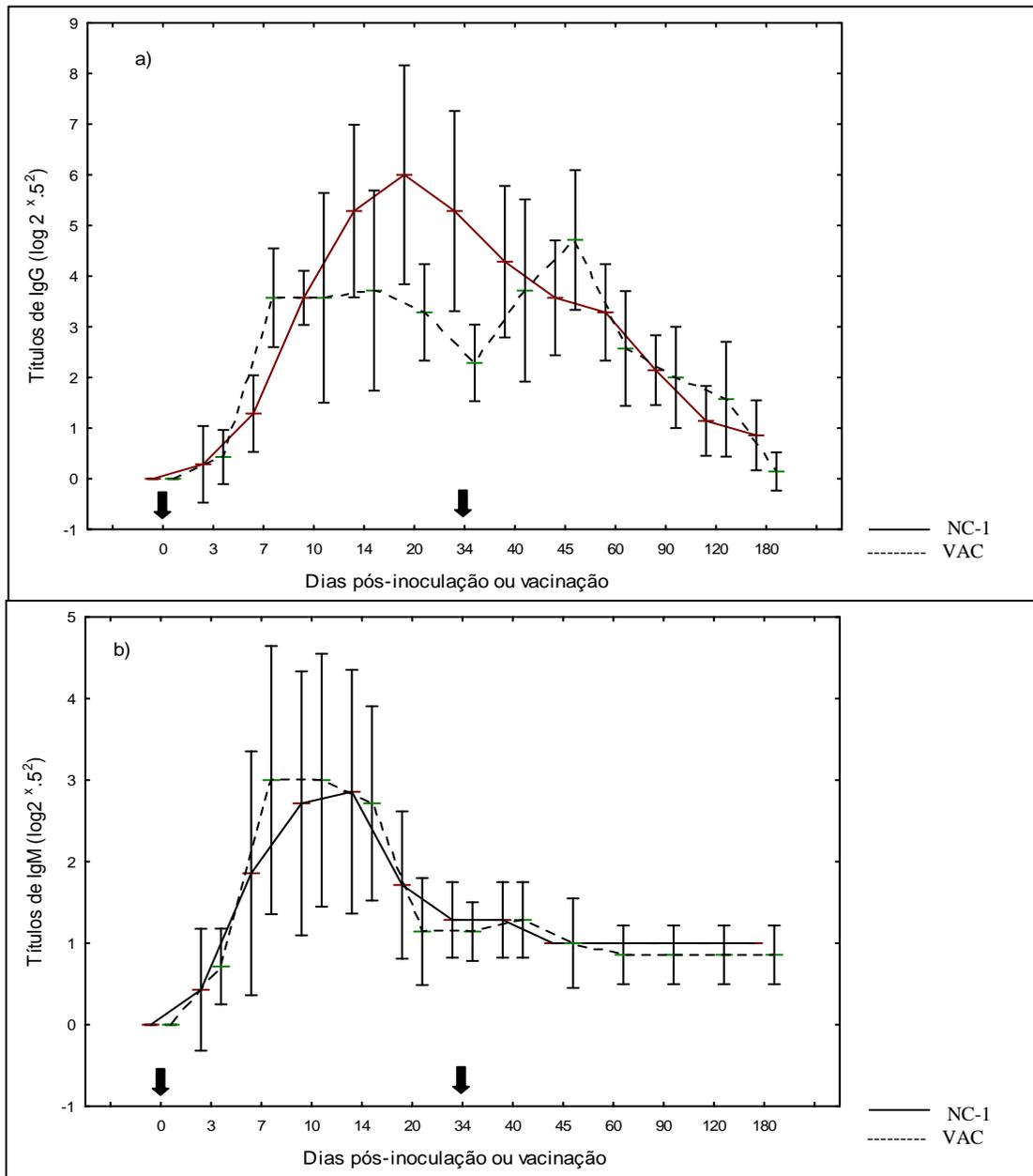


Fig.1. Títulos de imunoglobulinas G (a) e M (b) em grupos de novilhas experimentalmente infectadas e em vacinadas. As setas indicam os dias da vacinação.

4. CAPÍTULO II

Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras individuais e coletivas de leite de bovinos pela reação de imunofluorescência indireta¹

Giovana Camillo^{2*}, Alfredo Skrebsky Cezar², Ana Maria Antonello², Luís Antônio Sangioni², Eduardo Furtado Flores², Gabriel Ribas Pereira³, Paulo Bayard Dias Gonçalves³ e Fernanda Silveira Flôres Vogel²

(Artigo aceito para publicação na revista científica Pesquisa Veterinária Brasileira, 2011)

ABSTRACT.- Camillo G., Cezar A.S., Antonello A.M., Sangioni L.A., Flores E.F., Pereira G.R., Gonçalves P.B.D. & Vogel F.S.F. 2011. [**Detection of antibodies against *Neospora caninum* in individual and bulk milk samples from cattle by the technique of indirect immunofluorescence assay.**] Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras individuais e coletivas de leite de bovinos pela reação de imunofluorescência indireta. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00, 2XXX. Laboratório de Doenças Parasitárias, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: giovanacamillo@yahoo.com.br

Neospora caninum is a major causative agent of reproductive losses in cattle and the diagnosis of neosporosis is essential for control and eradication programs. Therefore, this study aimed to: (1) standardize an indirect immunofluorescence assay (IFAT) for detection of antibodies against *N. caninum* in bovine milk, starting from a standard IFAT used for blood

¹ Recebido em 4 de janeiro de 2011.

Aceito para publicação em

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900. *Autor para correspondência: giovanacamillo@yahoo.com.br

³ Departamento de Clínica de Grandes Animais, CCR, UFSM, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900.

serum samples; (2) check the agreement between antibodies detection by IFAT in blood serum and in milk of cows; (3) evaluate the suitability of IFAT for detection of anti-*N. caninum* antibodies in bulk milk samples. Blood and milk samples were tested samples of blood serum and milk collected from 112 lactating cows and were tested for detection of antibodies against *N. caninum*, furthermore, six bulk milk samples, each one corresponding to each dairy farm studied. Agreement between the detection of antibodies in blood serum (with antibody titer ≥ 50) and in milk, with 90% of sensitivity and 100% of specificity for the IFAT in milk samples were found in 78% of the animals. However, for cows with antibody titers ≥ 100 in blood serum, the agreement, the sensitivity and the specificity of the IFAT in milk were of 100%. It is shown that, considering the dairy farm conditions. The most appropriate diagnostic approach to be adopted regarding the collection of blood serum or milk can elect for search anti-*N. caninum* antibodies by IFAT. Moreover, detection of antibodies in bulk milk samples can serve for diagnosis and screening of herds with infected animals.

INDEX TERMS: *Neospora caninum*, serology, immunoglobulins, IgG, diagnostic, neosporosis.

RESUMO.- *Neospora caninum* é um agente envolvido em perdas reprodutivas em bovinos. O diagnóstico dessa infecção é de grande importância, principalmente para programas de erradicação e controle. Sendo assim, os objetivos deste estudo foram: 1. adaptar uma reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*N. caninum* no leite, a partir de uma RIFI padronizada para a detecção desses anticorpos no soro sanguíneo; 2. analisar a concordância entre a detecção desses anticorpos pela RIFI no soro sanguíneo e no leite de fêmeas bovinas; 3. avaliar a viabilidade da RIFI para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em amostras coletivas de leite. Foram testadas amostras de soro sanguíneo e de leite, coletadas de

112 vacas em lactação, e seis amostras coletivas de leite, correspondentes a cada uma das propriedades avaliadas. Encontrou-se 78% de concordância entre a detecção de anticorpos no soro sanguíneo (com título de anticorpos ≥ 50) e no leite, com sensibilidade de 90% e especificidade de 100% para a RIFI nas amostras de leite. Entretanto, para as vacas com títulos de anticorpos ≥ 100 no soro sanguíneo, tanto a concordância como os valores de sensibilidade e especificidade da RIFI no leite foram de 100%. Todas as amostras coletivas de leite foram positivas na RIFI. Isso demonstra que, conforme a propriedade pode-se eleger com segurança qual a melhor abordagem diagnóstica a ser adotada em relação à coleta de soro sanguíneo ou de leite para a pesquisa de *N. caninum* pela RIFI. Além disso, a determinação da presença de anticorpos em amostras coletivas de leite pode servir para diagnóstico e triagem de rebanhos com animais infectados.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: sorologia, imunoglobulinas, IgG, diagnóstico, neosporose.

INTRODUÇÃO

A infecção por *Neospora caninum* (Apicomplexa: Sarcocystidae) foi relatada, inicialmente, como causa de doença neurológica e músculo-esquelética em cães (Bjerkas et al. 1984). Desde então, a neosporose tem sido considerada uma das principais causas de aborto em bovinos em todo o mundo (Dubey & Lindsay 1996). Nessa espécie, sua patogenia está relacionada, principalmente, com perdas reprodutivas, com destaque para a mortalidade embrionária e para os abortos no primeiro e no segundo terço gestacionais, respectivamente (Dubey et al. 2003). Por outro lado, morte fetal ou aborto são pouco frequentes no terço final de gestação, quando passa a ser comum a produção de bezerros saudáveis, porém, persistentemente infectados (PIs). Essas manifestações induzidas pelo parasito causam relevantes prejuízos ao acometerem rebanhos de corte e leiteiros (Dubey et al. 1999a). Em geral, a infecção não induz imunidade protetiva, podendo acarretar

distúrbios reprodutivos, repetidas vezes ao longo da vida das fêmeas infectadas (Garcia-Vazquez et al. 2002).

O ciclo biológico de *N. caninum* foi esclarecido por McAllister et al. (1998) e envolve hospedeiros definitivos (HDs) e intermediários (HIs). Os primeiros, até o presente momento, cães e coiotes abrigam o agente etiológico e eliminam seus oocistos nas fezes (Gondim et al. 2004). Os oocistos esporulam no ambiente tornando-se infectantes para os HIs (uma ampla gama de espécies de animais vertebrados). Estes, por sua vez, após ingerirem os oocistos esporulados, podem desenvolver cistos teciduais com bradizoítos. Os HDs, então, se infectam ao se alimentarem de tecidos contendo cistos (Dubey 2003). Além de disseminar-se por transmissão horizontal, este agente etiológico pode, ainda, ser transmitido verticalmente por via transplacentária. A transmissão vertical tem grande importância na manutenção deste protozoário em rebanhos bovinos, pois a maioria das infecções congênicas resulta no nascimento de bezerros PIs (Trees & Williams 2005).

Atualmente, a infecção por *N. caninum* em bovinos é investigada pela pesquisa de anticorpos no soro sanguíneo, embora seu diagnóstico definitivo deva se basear na detecção de antígenos ou ácidos nucleicos do protozoário em tecidos - por exemplo, a partir de fetos abortados ou da placenta (Silva 2005). Contudo, devido ao caráter persistente da infecção, a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* geralmente indica o *status* de portador em bovinos adultos. A exceção a isso seriam os anticorpos oriundos de imunidade passiva e de vacinação. Em fetos, ou em neonatos desprovidos de colostro, a presença de anticorpos indica que houve infecção transplacentária e que estes animais são PIs (Dubey 2003). Com isso, demonstra-se que a identificação de animais soropositivos é de grande utilidade caso se deseje erradicar o agente em uma população. As técnicas sorológicas mais utilizadas para esse fim são: ELISA e a RIFI (Dubey & Schares 2006).

Ensaio imunoenzimático (ELISA) têm sido descritos tanto para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em amostras de leite individuais (Björkman et al., 1997; Schares et al. 2005, Chanlun et al. 2006a), quanto naquelas provenientes de tanques (amostras coletivas) (Chanlun et al. 2002, Chanlun et al. 2006b). Embora diferentes testes para detecção de anticorpos anti-*N. caninum* no leite já tenham sido descritos (Schaes et al. 2004, Chanlun et al. 2006b), pouco se estudou a respeito da utilização da RIFI para pesquisa desses anticorpos no leite bovino. A RIFI, entretanto, é utilizada rotineiramente para a pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* em amostras de soro sanguíneo, sendo considerado o teste de referência para esse fim (Uggla et. al. 1998). Já para o diagnóstico direto, ou seja, a detecção de antígenos e/ou de ácidos nucléicos do protozoário em tecidos, diferentes técnicas têm sido utilizadas, com destaque para a imunistoquímica e para a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Dubey & Schares 2006).

O controle da neosporose é baseado, principalmente, na identificação e descarte dos animais portadores (Thurmond & Hietala 1995). Para avaliação prévia de um rebanho, técnicas que possibilitem a detecção de anticorpos em amostras coletivas de leite são desejáveis, destacando-se a praticidade e os menores custos inerentes a essa metodologia. Nesse sentido, a RIFI pode representar uma alternativa ao diagnóstico sorológico para anticorpos anti-*N. caninum* em amostras individuais ou coletivas de leite principalmente em laboratórios que não dispõem de equipamentos para realização do ELISA.

Assim, os objetivos deste trabalho foram: (1) adaptar a RIFI para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em amostras de leite bovino; (2) avaliar a concordância entre a presença desses anticorpos em amostras de soro sanguíneo e do leite de fêmeas bovinas; (3) avaliar a utilidade da RIFI para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em amostras coletivas de leite como método de detecção de rebanhos infectados.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental

Um total de 112 fêmeas bovinas oriundas de seis propriedades produtoras de leite, localizadas na região central do Rio Grande do Sul, foram utilizadas no presente estudo. Foram coletadas amostras de sangue e de leite de vacas em lactação, e também uma amostra coletiva de leite, para a pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum*. O número de animais testados por propriedade está apresentado no Quadro 1.

Coletas de sangue e de leite

Foram coletadas amostras de sangue, por punção da veia coccígea, e identificadas individualmente. As amostras de leite individuais foram coletadas de todos os animais em lactação em tubos de ensaio estéreis. De cada propriedade, foi coletada uma amostra coletiva de leite, 15mL aproximadamente, do tanque refrigerado, o qual continha a totalidade do leite coletado das vacas que foram avaliadas. Sequencialmente, as amostras de sangue foram submetidas à centrifugação a 1000 xG por 10min para obtenção do soro. Da mesma forma, as amostras de leite para extração da camada de gordura. As amostras de soro sanguíneo e de leite foram armazenadas a -20°C.

Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

A pesquisa de imunoglobulinas da classe G, anti-*N. caninum* no soro sanguíneo e no leite foi realizada pela RIFI. A RIFI foi realizada em lâminas de microscopia contendo taquizoítos da cepa NC-1 de *N. caninum* fixados por metanol. As amostras de soro sanguíneo (diluído em PBS, pH 7,2, a 1:50) ou de leite (não-diluído) foram utilizadas como anticorpo primário (e incubadas

por 30 min, a 37°C, em câmara úmida). Como anticorpo secundário foi utilizada anti-IgG^{®4} bovina conjugada com fluoresceína (incubação por 30 min, a 37°C, em câmara úmida). Amostras de soro sanguíneo ou de leite de bovinos, sabidamente positivas ou negativas, foram utilizadas como controle. Todas as amostras de soro sanguíneo positivas nas diluições de 1:50 foram submetidas à titulação para determinação do título máximo da reação. As amostras de leite não foram diluídas, de acordo com a padronização da RIFI, previamente realizada (dados não apresentados).

Foram consideradas positivas as reações com fluorescência periférica ou difusa dos taquizoítos, assim como, fluorescências apicais ou polares foram consideradas reações negativas (Paré et al. 1995). As amostras de soro sanguíneo e de leite foram testadas paralelamente. Os resultados da detecção de anticorpos nos diferentes fluidos testados foram comparados, utilizando-se os resultados da RIFI no soro sanguíneo como referência. Assim, foram calculadas, seguindo as recomendações da OPAS (1997), a sensibilidade, a especificidade e a concordância (índice *kappa*) da detecção de anticorpos no leite pela RIFI.

RESULTADOS

Os resultados do presente estudo estão apresentados nos Quadros 1 e 2. Detectaram-se anticorpos anti-*N.caninum* em todos os rebanhos avaliados, com frequências de detecção de anticorpos no soro sanguíneo variando entre 25% (Rebanho 2) e 64% (Rebanho 6), e com um total de 53,6% de vacas soropositivas (60/112), utilizando-se o ponto de corte de 1:50 (Quadro 1). Nas amostras positivas, os títulos de anticorpos no soro sanguíneo variaram de 50 a 800. A maior parte dessas vacas soropositivas (36/60; 60%) teve títulos de anticorpos de 50 ou 100.

⁴ Anti-IgG[®] bovina conjugada com a fluoresceína (FITC): Affinity Purified Antibody Fluorescein. Clopper Road 910, Gaithersburg, MD 20878 USA. www.kpl.com

A sensibilidade e a especificidade da detecção de anticorpos pela RIFI para o leite foram calculadas utilizando como padrão a detecção de anticorpos nas amostras de soro sanguíneo. A comparação entre os resultados de detecção de anticorpos anti-*N. caninum* no soro sanguíneo e no leite (Quadro 1 e 2) demonstrou 100% de concordância para os animais com título de anticorpos no soro sanguíneo ≥ 100 . No entanto, dentre as amostras cujo título de anticorpos foi de 50, obteve-se apenas 40% de concordância. Por sua vez, quando consideradas todas as amostras de soro sanguíneo (com título de anticorpos de 50, como ponto de corte), obtiveram-se concordância de 78%, sensibilidade de 90% e especificidade de 100%.

DISCUSSÃO

Atualmente, há poucos relatos em relação à detecção de anticorpos anti-*N. caninum* no leite pela RIFI. De maneira geral, os resultados obtidos aqui concordam com aqueles obtidos por Ooi et al. (2000), que utilizaram amostras de leite de vacas com título de anticorpos ≥ 200 no soro sanguíneo e obtiveram 100% de concordância para a RIFI. Embora esses autores tenham utilizado a RIFI para detecção de anticorpos no leite, a maioria dos estudos conduzidos com esse fim utiliza como teste diagnóstico o ELISA. Björkman et al. (1997) ao avaliarem a viabilidade do teste ELISA para demonstração de anticorpos anti-*N. caninum* no leite, utilizando amostras de vacas sabidamente soropositivas e soronegativas, encontraram uma concordância de 95% nos resultados. Da mesma forma, Schares et al. (2004), analisando a adaptação de um ELISA comercial para testar amostras de soro de sangue e de leite, observaram uma boa correlação entre os resultados das amostras pareadas, além de ressaltar que o uso do leite em um teste ELISA comercial é uma alternativa viável para diagnóstico sorológico de aborto, uma vez que, em animais com histórico abortivo, houve maior sensibilidade de detecção através da pesquisa de anticorpos no leite do que no soro sanguíneo. Em outro estudo relacionado, através do teste de

ELISA (iscom), Chanlun et al. (2006a) também encontraram alta correlação entre o nível de anticorpos no soro sanguíneo e no leite de animais positivos. Os resultados foram avaliados a partir de um percentual de positividade, o qual demonstrou uma variação considerável entre soro e leite, porém o leite foi consistentemente mais positivo.

Os resultados obtidos no presente estudo são importantes do ponto de vista diagnóstico por representar uma abordagem alternativa. Além disso, a correlação encontrada entre o título de anticorpos no soro sanguíneo e no leite não é surpreendente e pode ser explicada notando-se que os níveis de imunoglobulinas no leite são influenciados pelo nível de anticorpos no soro sanguíneo (Tizard 2008). No entanto, sabe-se que outros fatores também influenciam nesta correlação, tais como fase da lactação e a produção leiteira diária, o que pode diminuir o título de anticorpos no leite (Chanlun et al. 2006a). Das amostras avaliadas, as que não tiveram concordância, ou seja, que foram positivas na amostra de soro sanguíneo e negativas na de leite (12/60; 20%), foram algumas daquelas cuja titulação no soro sanguíneo foi de 50 (n=18; κ 40%). Considerando que a maioria dos testes realizados utilizam diluições do soro partindo de 1:100, estas amostras seriam irrelevantes do ponto de vista do diagnóstico, uma vez que todas as amostras de soro sanguíneo discordantes seriam negativas na diluição de 1:100 ou superior. Nesses casos, a concordância seria de 100%.

Todas as amostras coletivas de leite das seis propriedades testadas foram positivas para anticorpos anti-*N. caninum* (Quadro 1), inclusive na Propriedade 2, a qual apresentou a menor média geométrica do título de anticorpos (título médio de 2) e a menor frequência de vacas soropositivas (25%). Tal fato demonstra a viabilidade do teste de amostras coletivas de leite nas condições encontradas no presente estudo, destacando-se a praticidade desse tipo de amostragem e sua aplicabilidade para o diagnóstico em nível de rebanho para a detecção da presença de anticorpos anti-*N.caninum* nos rebanhos leiteiros. Chanlun et al. (2002) realizaram um estudo

semelhante, no qual, por meio do teste de ELISA (iscom), obtiveram alta absorvância nas amostras coletivas dos dois rebanhos soropositivos para *N. caninum* e, do contrário, baixa absorvância para os rebanhos soronegativos. Estes resultados aliados aos do presente estudo demonstram a viabilidade da pesquisa de anticorpos anti-*N.caninum* em amostras individuais e coletivas de leite, como alternativas para o diagnóstico das infecções por *N. caninum* em rebanhos leiteiros.

Em resumo, existe boa concordância na detecção de anticorpos anti-*N. caninum* no soro sanguíneo e no leite. A partir disso, pode-se afirmar que o diagnóstico sorológico para *N. caninum* em vacas leiteiras pode ser realizado com segurança a partir do leite. Como vantagem tem-se, ainda, que a coleta do leite não é invasiva e, conseqüentemente, os riscos de transmissão de doenças e de promoção de estresse aos animais são reduzidos. Além disso, a determinação da presença de anticorpos em amostras coletivas de leite pode servir para diagnóstico e triagem de rebanhos com animais infectados.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram boa concordância entre a detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* da classe G no leite e no soro sanguíneo pela RIFI.

Assim, conforme a propriedade pode-se, com segurança, eleger qual a melhor abordagem diagnóstica, ou seja, soro sanguíneo ou leite.

Além disso, o fato de que em todas as propriedades com animais positivos foram encontrados anticorpos na amostra coletiva de leite sugere que esse tipo de amostragem pode representar uma alternativa diagnóstica, em propriedades de leite, visando diagnóstico de rebanho e para estudos epidemiológicos.

Agradecimentos.- Aos professores Rudi Weiblen e Eduardo Furtado Flores por disponibilizarem o Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria. À farmacêutica bioquímica Patrícia Bräunig pelo auxílio concedido para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Bjerkas I., Mohn S.F. & Presthus J. 1984. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenkunde*, 70:271-274.
- Björkman C., Holmdahl O.J.M. & Ugglå A. 1997. An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. *Vet. Parasitol.*, 68:251-260.
- Chanlun A., Näslund K., Aiumlamai S. & Björkman C. 2002. Use of bulk milk for detection of *Neospora caninum* infection in dairy herds in Thailand. *Vet. Parasitol.*, 110:35-44.
- Chanlun A., Emanuelson U., Aiumlamai S. & Björkman C. 2006a Variations of *Neospora caninum* antibody levels in milk during lactation in dairy cows. *Vet. Parasitol.*, 141:349-355.
- Chanlun A., Emanuelson U., Chanlun S., Aiumlamai S. & Björkman C. 2006 b. Application of repeated bulk milk testing for identification of infection dynamics of *Neospora caninum* in Thai dairy herds. *Vet. Parasitol.*, 136:243-250.
- Dubey J.P. & Lindsay D.S. 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.*, 67:1-59.
- Dubey J.P. 1999a. Neosporosis in cattle: Biology and economic impact. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 214:1160-1163.
- Dubey J.P. 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Kor.** *J. Parasitol.* 41:1-16.
- Dubey J. P. & Schares G. 2006. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet. Parasitol.*, 140:1-34.
- García-Vázquez Z., Cruz-Vázquez C., Medina-Espinoza L., García-Tapia D. & Chavarria-Martínez B. 2002. Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, Mexico. *Vet. Parasitol.*, 106:115-120.
- Gondim L.F., McAllister M.M., Pitt W.C. & Zemlicka D.E. 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, 34:159-161.

- McAllister M.M., Dubey J.P., Lindsay D.S., Jolley W.R., Wills R.A. & McGuire A.M. 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, 28:1473-1478.
- Ooi H.K., Huang C.C., Yang C.H. & Lee S.H. 2000. Serological survey and first finding of *Neospora caninum* in Taiwan, and the detection of its antibodies in various body fluids of cattle. *Vet. Parasitol.*, 90:47-55.
- Paré J., Hietala S.K. & Thurmond M.C. 1995. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *J. Vet. Diag. Invest.*, 7:273-275.
- Schares G., Bärwald A., Staubach C., Wurm R., Rauser M., Conraths F.J. & Schroeder C. 2004. Adaptation of a commercial ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. *Vet. Parasitol.*, 120:55-63.
- Schares G., Barwald A. & Conraths F.J. 2005. Adaptation of a surface antigen-based ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. *J. Vet. Med. B, Infect. Dis. Vet. Publ. Hlth.*, 52:45-48.
- Silva A.C. 2005. Diagnóstico da neosporose bovina. *Revta Bras. Parasitol. Vet.*, 13:29-33.
- Thurmond M. & Hietala S.K. 1995. Strategies to control *Neospora caninum* infection in cattle. *Bov. Pract.*, 4:29-32.
- Tizard I.R. 2008. *Imunologia Veterinária*. Elsevier, Rio de Janeiro. 587p.
- Trees A.J. & Williams D.J. 2005. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol.*, 21:558-561.
- Uggla A., Stenlund S., Holmdahl O.J.M., Jakubek E.B., Thebo P., Kindahl H. & Björkman C. 1998. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *Int. J. Parasitol.*, 28:1467-1472.

Quadro 1. Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* pela reação de imunofluorescência indireta em amostras de soro sanguíneo e em amostras individuais e coletivas de leite

Rebanho	Soro sanguíneo		Leite	
	(ponto de corte de 1:50)			
	Positivas/total (%)	Títulos de Ac (média) ^a	Positivas/total ^b (%)	Amostras coletivas (do tanque)
1	5/13(38,4%)	2,4	4/13 (30,7%)	+
2	2/8(25,0%)	2	2/8 (25,0%)	+
3	4/11(36,4%)	3	3/11 (27,2%)	+
4	4/7(54,1%)	2,25	4/7 (54,1%)	+
5	29/48(60,4%)	2,62	28/48 (58,3%)	+
6	16/25(64%)	2,25	7/25 (28%)	+
Total	60/112(53,5%)	2,55	48/112 (42,8%)	6/6 100%

^a Média Geométrica (GMT) expresso no $\log 2^x \cdot 5^2$.

^b Amostras individuais de leite.

Quadro 2. Comparação entre o título de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras de soro sanguíneo e a detecção qualitativa de anticorpos em amostras individuais de leite através da técnica de imunofluorescência indireta (RIFI)

Título de anticorpos no soro sanguíneo	Soro sanguíneo	Leite
	Nº de vacas positivas/total de amostras (%)	Nº de vacas positivas/total de positivas no soro sanguíneo (% , κ^a)
50	18/112 (16,1%)	6/18 (33,3%, 40%)
100	18/112 (16,1%)	18/18 (100%, 100%)
200	8/112 (7,1%)	8/8 (100%, 100%)
400	9/112 (8,0%)	9/9 (100%, 100%)
800	7/112 (6,2%)	7/7 (100%, 100%)
Total	60/112 (53,5%)	48/60 (80%, 78%)

^a Índice KAPPA(κ).

5. CAPÍTULO III

Reação de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti- *Neospora caninum* em amostras coletivas de leite

Indirect fluorescent antibody test to detection of *Neospora caninum* antibodies in samples of bulk milk

**Giovana Camillo^I; Ana Maria Antonello^I; Gabriel Ribas Pereira^{II}; Paulo Bayard Dias
Gonçalves^{II}; Luís Antônio Sangioni^I; Lilian Muller^{III}; Fernanda Silveira Flores Vogel^I**

(Artigo aceito para publicação na Revista científica Ciência Rural)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em amostras coletivas de leite, através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Para isso, foram coletadas amostras do leite dos tanques refrigerados de 36 rebanhos, das quais foram selecionados 14 para coletas de amostras individuais de soro sanguíneo e de leite das vacas. Encontrou-se concordância para 12 dos 14 rebanhos selecionados para a amostragem individual dos animais, em comparação à detecção de anticorpos nas amostras coletivas de leite. Foi observada uma boa correlação da comparação dos resultados individuais de leite e soro

^I Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. *Autor para correspondência: giovanacamillo@yahoo.com.br

^{II} Departamento de Clínica de Grandes Animais (CGA), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

^{III} Médica Veterinária do Departamento Técnico da COSULATI, Pelotas, RS.

sanguíneo. Observaram-se baixos títulos de anticorpos (50) no soro sanguíneo dos animais soropositivos cujos resultados da RIFI no leite coletivo e no sangue foram discordantes. Assim, a partir dos resultados deste estudo, pode-se concluir que a utilização de testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em amostras coletivas de leite através da RIFI é segura para a triagem de rebanhos bem como para estudos epidemiológicos.

Palavras-chave: RIFI, neosporose, rebanhos leiteiros, diagnóstico

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the presence of anti-*N. caninum* in the bulk milk samples by indirect immunofluorescence assay (IFAT). For this, we collected samples of milk from refrigerated tanks from 36 herds, of which 14 were selected to sampling of individual blood serum and milk of cows. It was found concordance for 12 of the 14 herds selected for samples of individual animals, compared to the detection of antibodies in the bulk milk samples. There was a good correlation when comparing the results of individual serum and milk. We observed low antibody titers (50) in the serum of animals positive whose results of IFA of bulk milk and blood were discordant. Thus, with the results of this study, can conclude that the use of serological tests for detection of anti-*N. caninum* in the bulk milk samples from the IFAT is safe for the screening of herds as well as for epidemiological studies.

Key words: IFI, neosporosis, dairy herds, diagnostic

INTRODUÇÃO

A infecção pelo protozoário *Neospora caninum* está amplamente distribuída em todo o mundo e é reconhecida como uma das maiores causas de aborto, contribuindo com importantes perdas econômicas, principalmente em bovinos de leite (DUBEY et al., 2003). O diagnóstico da

neosporose é baseado, principalmente, na pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum*. Diferentes testes têm sido desenvolvidos para a detecção de anticorpos contra o protozoário em soro sanguíneo e amostras individuais e coletivas de leite (BJÖRKMAN AND UGGLA, 1999). Outros estudos também demonstram a utilização de amostras coletivas de leite de bovinos para a pesquisa de anticorpos contra outros agentes, como vírus (PRITCHARD, 2001), bactérias (NIELSEN et al., 2000) e helmintos (SANCHEZ et al., 2002). Atualmente, o principal método utilizado para o diagnóstico da neosporose a partir de amostras coletivas de leite é o ELISA (CHANLUN et al., 2006). Outro método bastante utilizado para detecção de anticorpos específicos é a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), que já foi descrita como teste padrão para detecção de anticorpos anti-*Neospora* spp. em soro sanguíneo (PARÉ et al., 1995). Há poucos relatos com relação ao diagnóstico a partir de amostras de leite pela RIFI (OOI et al., 2000; CAMILLO et al., 2011). Estes estudos têm demonstrado boa concordância entre amostras positivas no soro sanguíneo e no leite.

Assim, o principal objetivo desse estudo é viabilizar a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em amostras coletivas de leite através da RIFI, relacionando com a análise sorológica individual dos animais de cada rebanho.

MATERIAL E MÉTODOS

Em um primeiro momento, foram coletadas amostras coletivas de leite de 36 propriedades leiteiras, escolhidas por conveniência, nas regiões central e sul do Rio Grande do Sul. Não foi levado em consideração o possível diagnóstico prévio de neosporose nesses rebanhos. Após a pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* pela RIFI (conforme a técnica descrita a seguir) foram selecionadas pela disponibilidade dos produtores, 14 propriedades para uma nova amostragem individual de sangue e de leite de todas as vacas lactantes (totalizando 201 animais),

bem como a coleta de uma amostra coletiva de leite de cada rebanho. O intervalo entre as duas coletas de amostras coletivas foi de 45 dias.

Amostras

Amostras coletivas de leite foram obtidas dos tanques de armazenamento, aproximadamente 15 mL por propriedade (n=36). Após a seleção dos 14 rebanhos, amostras de leite individuais (n=201) foram coletadas de todos os animais em lactação em tubos de ensaio estéreis e as de sangue por meio de punção da veia coccígea em tubos de *vacutainer*. As amostras de sangue e de leite foram centrifugadas (a 1000xg por 10min) para obtenção do soro e para extração da camada de gordura, respectivamente, sendo, em seguida, armazenadas a -20°C.

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A pesquisa de imunoglobulinas da classe G (IgG) contra o *N. caninum* no soro sanguíneo foi realizada pela RIFI conforme metodologia descrita por PARÉ et al. (1995). Foram consideradas positivas aquelas amostras nas quais se observou completa fluorescência da superfície dos taquizoítos de *N. caninum* a partir de uma diluição mínima de 1:50 em PBS. Determinou-se o título máximo da reação para cada uma das amostras de soro sanguíneo por meio de diluição seriada. As amostras de leite não foram diluídas seguindo a técnica padronizada previamente (CAMILLO et al., 2011). Amostras de soro sanguíneo ou de leite de bovinos, sabidamente positivas ou negativas, foram utilizadas como controle para a RIFI.

Análise estatística

As amostras de soro sanguíneo e de leite de cada vaca foram testadas paralelamente. Os resultados da detecção de anticorpos nos diferentes fluidos testados foram comparados

utilizando-se os resultados da RIFI no soro sanguíneo como referência. As amostras coletivas foram comparadas com os resultados individuais de soro e/ou leite por rebanho. Assim, foram calculadas, seguindo as recomendações da OPAS (1997), a sensibilidade, a especificidade e a concordância (índice *kappa*) para a detecção de anticorpos nas amostras individuais e coletivas de leite pela RIFI.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Detectou-se a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em 91,7% (33/36) dos rebanhos avaliados por amostragem coletiva de leite. Em virtude da alta frequência de detecção de anticorpos contra o protozoário na população estudada, ressalta-se a ampla distribuição e impacto econômico desta infecção em bovinos. A partir da análise das amostras coletivas de leite, detectaram-se anticorpos anti-*N. caninum* em 78,5% (11/14) dos rebanhos em que foram coletadas amostras individuais de sangue e de leite das vacas. Porém, a análise das amostras individuais demonstrou a presença de animais soropositivos em dois dos três rebanhos considerados negativos pela análise do leite proveniente dos tanques de armazenamento. A propriedade # 13 (Tabela 1) apresentava uma vaca com título 50 para o soro sanguíneo e positiva na amostra individual de leite. Porém, deve-se ressaltar que o título encontrado neste animal foi de 50, o que é abaixo da diluição utilizada normalmente na rotina. Assim, se a diluição utilizada no soro sanguíneo fosse de 1:100, o resultado seria negativo e concordante. Da mesma forma, na propriedade # 10, em cinco animais (5/10) foram detectados anticorpos apenas no soro, todos com título de 50. Em nenhum destes animais foram detectados anticorpos na amostra individual de leite.

Avaliando-se a totalidade dos animais, com relação ao soro sanguíneo, na maioria das vacas lactantes foram detectados anticorpos contra o protozoário (107/201; 53,3%). Em todos os

rebanhos em que os animais apresentaram título de anticorpos ≥ 100 no soro sanguíneo foi possível a detecção de soropositividade em amostras coletivas de leite. A detecção de anticorpos em amostras coletivas de leite em rebanhos que apresentem poucos animais com títulos de anticorpos ≥ 100 pode estar condicionada, particularmente, a uma maior ou menor produção de leite destes animais em relação aos demais. Neste sentido, BARTELS et al., (2007) analisaram amostras coletivas de leite durante um ano e meio e observaram que o principal fator atribuído para a flutuação dos níveis de anticorpos foi a proporção de animais soropositivos que contribuem com o volume do leite. Os títulos de anticorpos no leite podem variar conforme os níveis séricos de anticorpos, estágio de lactação, produção leiteira e presença de reações inflamatórias na glândula mamária, entre outros (PERINO et al., 1995). Desta forma, pode-se esperar algum resultado falso positivo ou negativo a partir de amostras individuais e coletivas de leite. No entanto, nas amostras individuais de leite esta probabilidade é menor, como demonstrado por CAMILLO et al. (2011).

Analisando os resultados obtidos a partir das amostras individuais de soro sanguíneo e de leite (figura 1), semelhantemente ao encontrado por CAMILLO et al. (2011), pode-se observar que a frequência de animais com anticorpos detectáveis no leite aumenta conforme aumentam os títulos no soro sanguíneo. No presente estudo, dos animais com título de anticorpos séricos de 50 (47/201) a maioria foi negativo na amostra individual de leite (36/47). Desta forma, a concordância entre as amostras com título de 50 foi de apenas 27% e a sensibilidade foi de 57%. No entanto, considerando a detecção paralela de anticorpos no leite e soro sanguíneo da totalidade das amostras obteve-se concordância de 64%, sensibilidade de 74% e especificidade de 100%. A sensibilidade da RIFI foi inferior ao índice de 90% relatado por CAMILLO et al. (2011), nestas mesmas condições, quando utilizou esse mesmo teste para detectar anticorpos em

amostras individuais de leite. Quando analisada a correlação das amostras coletivas com as amostras individuais de leite obteve-se 42% de concordância.

Sabe-se que determinados fatores afetam a sensibilidade e especificidade da RIFI, tais como a diluição e a concentração de anticorpos, o estágio de lactação, a amostragem (CHRISTENSEN AND GARDNER, 2000) e a produção de leite (STENLUND et al., 1999). Supondo-se que os níveis de anticorpos no leite refletem os níveis de anticorpos no soro sanguíneo (SCHARES et al., 2004), vacas no início da lactação têm níveis intermediários de anticorpos combinados com alta produção de leite, enquanto vacas que estão produzindo baixos volumes diários de leite apresentam concentração de anticorpos mais alta no leite. SANCHEZ et al., (2002), demonstraram em um estudo com *Ostertagia ostertagi*, que os altos níveis de anticorpos encontrados em amostras coletivas de leite estão associados à baixa produção diária de leite.

CHANLUN et al. (2006) demonstraram, a partir de três coletas de amostras coletivas repetidas, dos mesmos rebanhos, que os resultados de um único teste devem ser interpretados com cautela, uma vez que apenas as vacas em lactação contribuem para o *status* do rebanho. Além disso, em determinadas propriedades, as vacas infectadas podem ser descartadas por apresentarem outros problemas reprodutivos, sem que os proprietários saibam que são animais soropositivos para *N. caninum* (THURMOND AND HIETALA, 1996), o que pode contribuir para diminuir as chances de que amostras coletadas dos tanques permaneçam positivas ao longo do tempo.

Um resultado negativo em uma amostragem coletiva não exclui a presença da infecção por diversos já discutidos anteriormente. Embora, neste trabalho não se tenha verificado diferença na detecção de anticorpos anti-*N. caninum* nas amostras dos mesmos tanques em um intervalo de 45 dias pode-se preconizar que avaliações semestrais sejam realizadas para

minimizar estes fatores anteriormente discutidos. A recomendação semestral deve-se a oscilação dos níveis de anticorpos presentes no soro de animais sabidamente positivos (CHANLUN et al., 2006).

CONCLUSÃO

Para o diagnóstico da neosporose, a detecção em amostras coletivas de leite é de grande importância, pela praticidade de coleta e pelos custos reduzidos deste tipo de avaliação em comparação ao processamento de amostras de cada vaca do rebanho. Pode-se utilizar este tipo de procedimento para estudos epidemiológicos de bacias leiteiras ou regiões obtendo-se uma boa estimativa da frequência mínima de rebanhos infectados nesses locais, podendo fornecer informações sobre a prevalência e distribuição dos rebanhos positivos para *N.caninum*.

REFERÊNCIAS

- BARTELS, C.J.M. et al. Factors associated with variation in *Neospora caninum* bulk-milk S/P ratios in initially bulk-milk negative testing Dutch dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v.81, p.265–273, 2007. Disponível em: <
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TBK-4NYBM8G> Acesso em 16 nov. 2010. doi:10.1016/j.prevetmed.2007.04.019.
- BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**. v.29, p.1497–1507, 1999. Disponível em <
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T7F-3Y9HGBR > Acesso em 17 nov. 2010. doi:10.1016/S0020-7519(99)00115-0.

CAMILLO, G. et al. Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras individuais e coletivas de leite de bovinos pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2011 (no prelo).

CHANLUN, A. et al. Application of repeated bulk milk testing for identification of infection dynamics of *Neospora caninum* in Thai dairy herds. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p.243-250, 2006. Disponível em < http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TD7-4J022WT-3> Acesso em: 17 nov. 2010. doi:10.1016/j.vetpar.2005.11.025.

CHRISTENSEN, J.; GARDNER, I.A. Herd-level interpretation of test results for epidemiologic studies of animal diseases. **Preventive Veterinary Medicine**. v.45, p.83–106, 2000. Disponível em < http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TBK-408BJCN-6 > Acesso em 17 nov. 2010. doi:10.1016/S0167-5877(00)00118-5

DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Korean Journal of Parasitology**, v.41, n.1, p.1-16, 2003. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2717477/>> Acesso em: 16 nov. 2010. doi: 10.3347/kjp.2003.41.1.1.

NIELSEN, S.S. et al. Bulk tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v.44, p.1–7, 2000. Disponível em < http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TBK-3YVD89C-1> Acesso em 17 nov. 2010. doi:10.1016/S0167-5877(00)00098-2

OOI, H.K. et al. Serological survey and first finding of *Neospora caninum* in Taiwan, and the detection of its antibodies in various body fluids of cattle. **Veterinary Parasitology**, v.90, p.47-55, 2000. Disponível em <

http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TD7-40BG4H5-5> Acesso

em: 17 nov. 2010. doi:10.1016/S0304-4017(00)00211-9

OPAS. Métodos de investigação epidemiológica em doenças transmissíveis. **Organização Pan-Americana da Saúde**, v.1, 1997, 182p.

PARÉ, J. et al. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.7, p.273-275, 1995.

Disponível em < <http://jvdi.org/cgi/reprint/7/2/273.pdf> > Acesso em: 16 nov. 2010.

PERINO L.J. et al. Effects of various risk factors on plasma protein and serum immunoglobulin concentrations of calves at post partum hours 10 and 24. **American Journal of Veterinary Research**, v.56, p.1144-1148, 1995.

PRITCHARD, G. Milk antibody testing in cattle. **In Practice**, v. 23, p.542–549, 2001. Disponível em < <http://inpractice.bmj.com/content/23/9/542.abstract> > Acesso em: 17 nov. 2010. doi:10.1136/inpract.23.9.542.

SANCHEZ, J. et al. A longitudinal study of gastrointestinal parasites in Canadian dairy farms. The value of an indirect *Ostertagi ostertagi* ELISA as monitoring tool. **Veterinary Parasitology**, v.107, p.209–226, 2002. Disponível em <

http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TD7-468SSWP-2 > Acesso

em: 17 nov. 2010. doi:10.1016/S0304-4017(02)00158-9

SCHARES, G. et al. Adaptation of a commercial ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. **Veterinary Parasitology**, v.120, p.55–63, 2004. Disponível

em < http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TD7-4BMCB33-1 >

Acesso em 16 nov. 2010. doi:10.1016/j.vetpar.2003.11.016

STENLUND, S. et al. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary**

Parasitology, v.85, p.227–234, 1999. Disponível em <
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TD7-3X4W5VT-F> Acesso
em: 17 nov. 2010. doi:10.1016/S0304-4017(99)00120-X.

THURMOND, M.C.; HIETALA, S.K. Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. **American Journal of Veterinary Research**, v.57, p.1559–1562, 1996.

Tabela 1. Análise qualitativa de amostras coletivas de leite relacionadas ao total de positivas no soro sanguíneo e no leite e a variação dos títulos de anticorpos em cada propriedade.

Rebanho	Amostra coletiva de leite	Amostras individuais de leite Positivas/total	Soro sanguíneo Positivas/total	Variação dos títulos de anticorpos
1	+	4/13	5/13	(50 - 800)
2	+	2/8	2/8	(100)
3	+	3/11	4/11	(50-800)
4	+	4/7	4/7	(100-200)
5	+	28/48	29/48	(50-800)
6	+	7/25	16/25	(50-800)
7	+	7/10	7/10	(100-400)
8	-	0/7	0/7	(< 50)
9	+	5/25	10/25	(50-400)
10	-	0/11	5/11	(50)
11	+	2/12	7/12	(50-400)
12	+	7/10	8/10	(50-400)
13	-	1/4	1/4	(50)
14	+	1/10	9/10	(50)
Total		71/201	107/201	

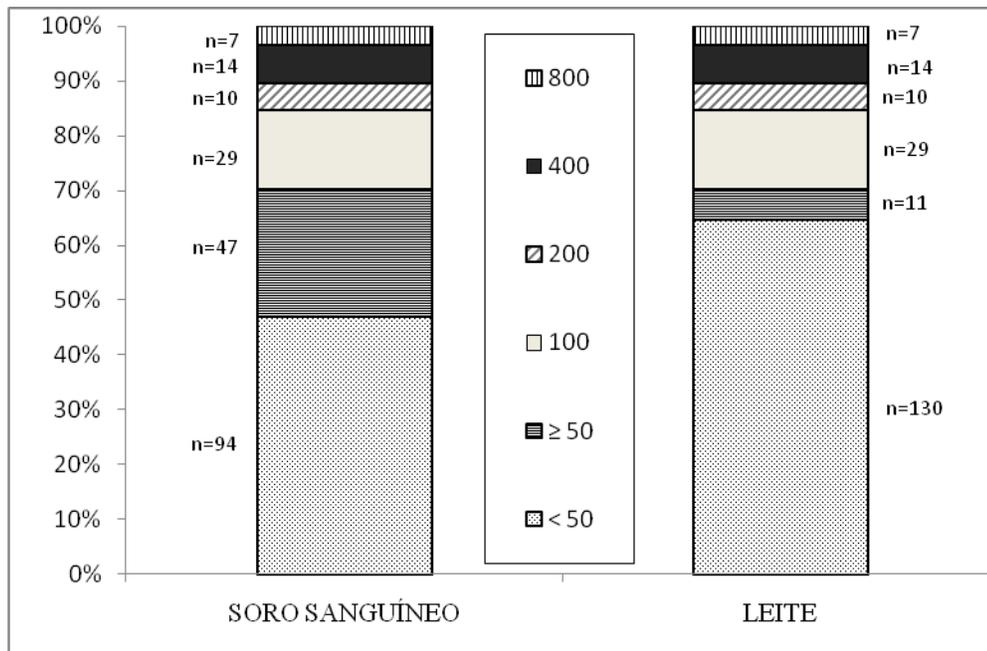


Figura 1. Comparação entre os resultados obtidos para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* nas amostras individuais de soro sanguíneo (quantitativo - título de anticorpos detectados) e de leite (qualitativo - positivo/negativo). Na coluna da direita está a correlação do resultado qualitativo de leite em relação ao título de anticorpos encontrados nas amostras de soro. Foram consideradas amostras negativas no soro aquelas em que não foram detectados anticorpos na diluição de 1:50.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir dos trabalhos desenvolvidos permitem concluir que:

1. Após a vacinação contra o *Neospora caninum* e/ou inoculação com este protozoário os títulos séricos tanto de IgG como de IgM foram baixa magnitude e curta duração;
2. A produção de anticorpos de animais inoculados com o protozoário foi superior a dos animais imunizados, tanto nos títulos induzidos quanto na manutenção desta resposta;
3. A comparação paralela entre os resultados de detecção de IgG anti-*N. caninum* nas amostras individuais de leite e de soro apresentou uma boa correlação;
4. A técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) pode ser utilizada com segurança em amostras individuais e coletivas de leite para detecção de imunoglobulinas da classe G anti- *Neospora caninum*;
5. A detecção de anticorpos contra o protozoário em amostras individuais e coletivas de leite pode ser utilizada como opção no diagnóstico.

7. REFERÊNCIAS

ALMERIA, S. et al. Cytokine gene expression in dams and foetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. **Parasite Immunology**, v. 25, n. 7, p. 383-392, Jul.2003.

ANDRIANARIVO, A. G. et al. Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, v.87, p.817–825, 2001.

ANDRIANARIVO, A. G. et al. Immune responses during pregnancy in heifers naturally infected with *Neospora caninum* with and without immunization. **Parasitology Research**, v.96, p. 24–31, 2005.

ANDERSON, M. L. et al. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.198, p.241-244, 1991.

ANDERSON, M. L. et al. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.417-431, 2000.

BAILLARGEON, P. G. 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 the American Veterinary Medical Association**, v.218, p.1803-1806, 2001.

BARLING, K.S. et al. Association of serologic status for *Neospora caninum* with post weaning weight gain and carcass measurements in beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.217, p.1356-1360, 2000.

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.; ANDERSON, M. L.; DUBEY, J.P.; CONRAD, P.A. Neospora-like protozoal infections associated with bovine abortions. **Veterinary Pathology**, v.28, p. 110-116, 1991.

BARR, B. C. et al. Experimental fetal and transplacental Neospora infection in the non human primate. **Laboratory Investigation**, v.71, p.236-242, 1994.

- BASZLER, T. V. et al. Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1635–1646, 1999.
- BIELSA, J. M. et al. Controle de neosporose em bovinos com Bovilis^o Neoguard: a experiência de campo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n.1, p.34-37, 2005.
- BJERKAS, I. et al. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v.70, p.271-274, 1984.
- BJÖRKMAN, C., UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**. v.29, p.1497–1507, 1999.
- BRAUTIGAM, F. E. et al. Resultados de levantamento sorológico para espécie *Neospora* em bovinos de corte e leite. In: Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias, Campo Grande. **Anais ...**, p.284, 1996.
- CAMILLO, G. et al. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos de leite do sudoeste do Estado do Paraná, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, p.1511-1513, 2010 .
- COLLANTES-FERNANDEZ, E. et al. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.1194-1198, 2002.
- CONRAD, P. A. et al. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. **Journal of Veterinary Diagnostics Investigations**, v.5 p. 572-578, 1993.
- 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.
- COSTA, G. H. N. et al. Freqüência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em soros de bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Semina: Ciências Agrárias**, v.22, p.57-62, 2001.

COSTA, K. S. et al. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.38, p.157-159, 2008.

DAVISON, H.C. et al. In vitro isolation of *Neospora caninum* from a stillborn calf in the UK. **Research Veterinary Science**, v.67, p.103-105, 1999.

DAVISON, H.C et al. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. **Research Veterinary Science**, v.70, p.163-168, 2001.

DUBEY, J. P. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.192, p.1269-1285, 1988a.

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, p.1259-1263, 1988b.

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

DUBEY, J.P.et al. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.1293-1304, 1998a.

DUBEY, J. P. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.214, p.1160-1163, 1999a.

DUBEY, J. P. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal Parasitology**, v.32, p.929-946, 2002.

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

DUBEY, J. P. et al. Pathogenesis of Bovine Neosporosis. **Journal Comparative Pathology**, v.134, p.267-289, 2006.

- DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.140, p.1-34, 2006.
- DUBEY, J. P.; et al. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 20, p. 323- 367, 2007.
- EPERON, S. et al. Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (microMT) mice to *Neospora caninum* infection. **Parasite Immunology**, v.21, p.225–236, 1999.
- FERROGLIO, E. et al. Evidence of *Neospora caninum* DNA in wild rodents. **Veterinary Parasitology**, v.148, p.346-349, 2007.
- FURUTA, P. I. et al. *Neospora caninum* infection in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. **Parasitology**, v.134, p.1931-1939, 2007.
- GARCIA-VAZQUEZ, Z. et al. Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, Mexico. **Veterinary Parasitology**, v.106, p.115-120, 2002.
- GAY, J.M. Neosporosis in dairy cattle: An update from an epidemiological perspective. **Theriogenology**, v.66, p.629-632, 2006.
- GONDIM, L. F. P. et al. *Neospora caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 47, p. 35, 1999.
- GONDIM, L.F.P. et al. Um caso de neosporose canina no Município de Salvador, Bahia: Diagnóstico, isolamento e manutenção do agente. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.7 p.102, 2000.
- GONDIM, L. F. P. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, v.34, n.2, p.159-161, 2004.
- GUIMARÃES JUNIOR, J. S. et al. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.124, p.1-8, 2004.

GUY, C. S. et al. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: Spontaneous transplacental infection is associated with an acute rise in maternal antibody. **Veterinary Record**, v.149, p.443-449, 2001.

HÄSLER, B. et al. *Neospora caninum*: Serological follow-up in dairy cows during pregnancy. **Veterinary Parasitology**, v.137, p.222-230, 2006.

HEMPHILL, A. et al. The antigenic composition of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1175-1188, 1999.

HEMPHILL, A. et al. An European perspective on *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.877-924, 2000.

HIETALA, S. K., THURMOND, M.C. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. **International Journal for Parasitology**, v.29, n.10, p.1669-1676, 1999.

HOANE, J. S. et al. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora spp.* infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. **Veterinary Parasitology**, v.136, p.155-159, 2006.

HUANG, C. C. et al. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). **Veterinary Research**, v.35, p.283-290, 2004.

INNES, E.A. et al. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. **International Journal Parasitology**. v. 31, p. 1523–1534, 2001.

INNES, E. A. et al. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, v.18, p.497-504, 2002.

INNES, E. A. et al. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.108, p.29–36, 2005.

JENKINS, M. C. et al. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum* associated bovine abortion. **International Journal for Parasitology**, v.32, p.631-636, 2002.

JENKINS, M. C. et al. *Neospora caninum* detected in feral rodents. **Veterinary Parasitology**, v.143, p.161-165, 2007.

KHAN, I. A. et al. *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. **Experimental Parasitology**, v.85, p.24-34, 1997.

KING, J. S. et al. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**. V.40, p.945-950, 2010.

LOCATELLI-DITTRICH, R. et al. Detecção de anticorpos contra *Neospora caninum* em vacas leiteiras e bezerros no Estado do Paraná. **Archives of Veterinay Science**, v. 6, p. 37-41, 2001.

LONG, M. T. et al. Comparison of intracerebral parasite load, lesion development, and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, v.84, p.316-320, 1998.

LONG, M. T. & BASZLER, T. V. Neutralization of maternal IL-4 modulates congenital protozoal transmission: comparison of innate versus acquired immune responses. **Journal of Immunology**, v.164, p.4768-4774, 2000.

LONG, P.L. **Coccidiosis of man and animals**. Boca Raton: CRC Press, 1990, p.356.

MARSH, A.E. et al. Sequence analysis and comparison of ribosomal DNA from bovine *Neospora caninum* to similar coccidial parasites. **Journal of Parasitology**, v.81, p.530-535, 1995.

MARSH, A. E. et al. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **The Journal of Parasitology**, v.84, p.530-535, 1998.

MCALLISTER, M. M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, v.28, n.9, p.1473-1478, 1998.

MILLER, C. M. et al. Reduction in transplacental transmission of *Neospora caninum* in outbred mice by vaccination. **International Journal for Parasitology**, v.35, p.821-828, 2005.

MINEO, T. W. P. et al. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.98, p.239-245, 2001.

MORALES, E. et al. Soroprevalence study of bovine Neosporosis in Mexico. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, p.413-415, 2001.

MOORE, D. P. et al. Immune response to *Neospora caninum* in naturally infected heifers and heifers vaccinated with inactivated antigen during the second trimester of gestation. **Veterinary Parasitology**, v.130, p. 29-39, 2005.

MOSKWA, B. et al. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. **Parasitology Research**, v.100, p.633-636, 2007.

OOI, H. K. et al. Serological survey and first finding of *Neospora caninum* in Taiwan, and the detection of its antibodies in various body fluids of cattle. **Veterinary Parasitology**, v.90, p.47-55, 2000.

PARÉ, J. et al. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfood mortality. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.60, p.133-139, 1996.

PARÉ, J. et al. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. **Journal of Parasitology**, v.83, p.82-87, 1997.

PEREIRA-BUENO, J. et al. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. **Veterinary Parasitology**, v.111, p. 143-152, 2003.

PESCADOR, C. A. et al. Histopathological and immunohistochemical aspects of *Neospora caninum* diagnosis in bovine aborted fetuses. **Veterinary Parasitology**, v.150, p.159-163, 2007.

PETERS, M. et al. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **International Journal Parasitology**, v.31, p.1144-1148, 2001.

RAGOZO, A. M. A. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis Estados brasileiros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, p.33-37, 2003.

ROMERO, J. J. et al. Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v.123, p.149-159, 2004.

ROMAND, S. et al. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. **Parasitology Research**, v.84, p. 50-53, 1998.

SARTOR, I. F. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros e de corte da região de Presidente Prudente, SP. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v.72, n.4, p.413-418, 2005.

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. Structural analysis of free and protein-bound glycosyl-phosphatidylinositols of *Neospora caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.105, p.155–161, 2000.

SCHARES, G. et al. *Hammondia heydorni*-like oocysts shed by a naturally infected dog and *Neospora caninum* NC-1 cannot be distinguished. **Parasitology Research**, v.87, p.808-816, 2001.

SILVA, A. C. Diagnóstico da neosporose bovina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, p.29-33, 2005.

SPEER, C. A., DUBEY, J.P. Ultraestrutura de tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum*. **The Journal of Protozoology**, v.36, p.458-463, 1989.

STENLUND, S. et al. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v.85, p.227–234, 1999.

THURMOND, M. C. et al. Predictive values of fetal histopathology and immunoperoxidase staining in diagnosing bovine abortion caused by *Neospora caninum* in a dairy herd. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, p.90-94, 1999.

TREES, A. J. et al. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1195–1200, 1999.

TREES, A. J., WILLIAMS, D. J. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, v.21, p.558-561, 2005.

WALDNER, C.L. et al. Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.213, p.685-690, 1998.

WILLIAMS, D. J., et al. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. **Parasitology** v.121, p.347–358, 2000.

WILLIAMS, D.J. et al. Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. **Infection Immunity**, v.75, p.1343–1348, 2007.

WOUDA, W. et al. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. **Journal of Parasitology**, v.83, p.545-547, 1997.

WOUDA, W. et al. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. **Theriogenology**, v.49, p.1311-1316, 1998.