



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CÉSAR AUGUSTO BARBOSA DE MACEDO

NEOSPORA CANINUM:

FREQUÊNCIA DA TRANSMISSÃO VERTICAL E EM
ABORTAMENTOS DE VACAS LEITEIRAS DA REGIÃO SUL
DO BRASIL

CÉSAR AUGUSTO BARBOSA DE MACEDO

NEOSPORA CANINUM:

FREQUÊNCIA DA TRANSMISSÃO VERTICAL E EM
ABORTAMENTOS DE VACAS LEITEIRAS DA REGIÃO SUL
DO BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (área de concentração-Sanidade Animal) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M141n Macedo, César Augusto Barbosa de.

Neospora caninum : frequência da transmissão vertical e em abortamentos de vacas leiteiras da região sul do Brasil / César Augusto Barbosa de Macedo. – Londrina, 2013.
69 f. : il.

Orientador: João Luis Garcia.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Bovino de leite – Doenças – Teses. 2. Neosporose bovina – Teses. 3. Aborto nos animais – Teses. 4. Parasitologia veterinária – Teses. I. Garcia, João Luis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:636.2

CÉSAR AUGUSTO BARBOSA DE MACEDO

Neospora caninum:

FREQUÊNCIA DA TRANSMISSÃO VERTICAL E EM ABORTAMENTOS
DE VACAS LEITEIRAS DA REGIÃO SUL DO BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (área de concentração-Sanidade Animal) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Prof.orientador Dr. João Luís Garcia
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Luís Fernando Pita Gondim
UFBA – Salvador – BA

Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley
UNOPAR – Londrina – PR

Prof. Dr. Odilon Vidotto
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. José da Silva Guimarães Júnior
UEL – Londrina – PR

Londrina, 22 de Fevereiro de 2013.

DEDICO, COM AMOR

À minha esposa Madlaine,

Aos meus filhos César Augusto e João Pedro.

Aos meus pais, Renato e Marília.

Aos meus irmãos, Mônica e Júnior.

As minha avós (in memoriam), Paulina (Vó Lilita) e Erotides (Vó Tica).

AGRADECIMENTOS

A Deus, nosso Pai criador, que me proporcionou uma família que muito amo, o privilégio de possuir muitos amigos e de trabalhar com o que mais gosto.

A minha esposa Madlaine, aos meus filhos César Augusto e João Pedro, pelo amor, carinho, paciência, compreensão e estímulo em todos os momentos, pois estão sempre torcendo pelo meu sucesso.

Aos meus pais Renato e Marília, pela vida, educação, carinho, e por acreditarem que esta seria apenas mais uma etapa a ser vencida.

A minha sobrinha Camila, pelas brincadeiras, companheirismo, risadas, caronas até a rodoviária, empréstimos do carro, do apartamento, das bolachas e pelas nossas conversas. Tudo foi muito bom e agradeço do fundo do coração. Obrigado Camila!

Ao Richard e a Mônica, pelo apoio, por acreditar e entender a importância desta etapa da minha vida.

Aos meus sogros Luiz Paulo e Terezinha, os quais estão sempre prontos a ajudar em nas nossas lutas.

Ao professor João Luís, por todos os ensinamentos, sugestões, orientações e por acreditar e abraçar este trabalho desde o primeiro momento que lançamos a idéia deste projeto.

À Prefeitura Municipal de Presidente Getúlio, especialmente aos motoristas da secretaria da saúde, os quais não mediram esforços no auxílio de envio dos materiais à UEL.

Ao Laboratório de Análises Clínicas Dr. Ney Scheffer pela colaboração na centrifugação das amostras.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal por ter-me possibilitado desenvolver esta tese.

Aos colegas Daniel, Alessandra, Ivo, Dauton, Fernando, Jonatas, Sérgio, Fernanda, Maria Paula, pela amizade, colaboração e agradável convivência durante esta etapa da minha vida.

À todos os professores do programa da pós-graduação, residentes, estagiários, funcionários, demais colegas que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado a todos!

MACEDO, César Augusto Barbosa de. **Neospora caninum**: frequência da transmissão vertical e em abortamentos de vacas leiteiras da região sul do Brasil. 69f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

Neospora caninum é um protozoário indutor de abortamentos em bovinos, sendo considerado uma das principais causas desta patologia em todo o mundo, principalmente em vacas leiteiras. O presente estudo teve como objetivo determinar a frequência de anticorpos e transmissão vertical, em vacas leiteiras naturalmente infectadas abatidas em frigorífico, bem como estudar a ocorrência de *N. caninum* em abortamentos de bovinos em propriedades leiteiras no município de Presidente Getúlio, estado de Santa Catarina, Sul do Brasil. Cento e vinte vacas, 60 gestantes (com seus respectivos fetos) e 60 não gestantes abatidas em um abatedouro com inspeção municipal, foram utilizadas para avaliar a transmissão vertical. Além desses animais, 43 vacas leiteiras que abortaram e seus respectivos abortos foram avaliados. Amostras de sangue (das vacas e fetos do abatedouro), líquido intratorácico e tecidos (cérebro, coração, fígado, rim, pulmão e baço) dos fetos abortados foram utilizados para a pesquisa de *N. caninum*. A sorologia foi realizada através de ELISA, e a positividade considerada com títulos ≥ 100 para animais adultos e ≥ 25 para fetos. PCR foi realizada após extração de DNA de sangue total, líquidos intratorácicos, fragmentos de tecidos fetais. Das 120 vacas abatidas no frigorífico verificou-se uma frequência de anticorpos de 42,5% (51/120), sendo que 41,6% (25/60) das vacas gestantes e 43,3% (26/60) das vacas não gestantes foram soropositivas. A frequência de anticorpos das fêmeas que abortaram foi de 52,38% (22/42). A transmissão vertical do *N. caninum* nas vacas gestantes abatidas foi de 1,6% (7/60), no entanto, a ocorrência do parasita em abortamentos das vacas leiteiras foi 37,8 % (14/37), levando-se em conta os resultados positivos do ELISA e da PCR. Pode-se concluir que embora a taxa de transmissão do *N. caninum* em bovinos de leite naturalmente infectados seja relativamente baixa, a ocorrência deste parasita em vacas que sofreram abortamentos e em seus abortos foi alta.

Palavras-Chave: *Neospora caninum*. Bovino leiteiro. ELISA. PCR. Transmissão vertical. Abortamento.

MACEDO, César Augusto Barbosa de. **Neospora caninum**: frequency of vertical transmission and abortion in dairy cows in southern Brazil. 69f. Thesis (Doctorate in Science Animal) – State University of Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

Neospora caninum is a protozoan primary that induces abortion in cattle and is one of the major causes of this pathology worldwide, especially in dairy cows. The present study aimed to determine the frequency of antibodies and vertical transmission in naturally infected slaughtered in abattoir, as well as to study the occurrence of *N. caninum* in abortions from dairy farms in the municipality of Presidente Getúlio, state of Santa Catarina, southern Brazil. One hundred and twenty cows, 60 pregnant cows, 60 non-pregnant cows from a local slaughterhouse were used to evaluate the transmission. Besides these animals, 43 cows aborted and their abortions were evaluated. Blood samples (cows and fetuses abattoir), fluid intrathoracic and tissues (brain, heart, liver, kidney, lung and spleen) of aborted fetuses were used for the detection of *N. caninum*. Serology was performed by ELISA (Idexx Laboratories), and considered positive with titers ≥ 100 for adults and ≥ 25 for fetuses. PCR was carried out after DNA extraction from whole blood, fluid intrathoracic, fragments of fetal tissues. Of the 120 cows slaughtered in the abattoir there was a prevalence of 42.5% (51/120) and 41.6% (25/60) of pregnant cows and 43.3% (26/60) of non-pregnant cows were seropositive. The frequency of antibodies in cows that aborted was 52.38% (22/42). The vertical transmission of *N. caninum* in slaughtered pregnant cows was 1.6% (7/60) however, the occurrence of the parasite in abortions from dairy cows was 37.8% (14/37), taking into account the positive results of ELISA and PCR. It can be concluded that although the transmission rate of *N. caninum* in naturally infected dairy cattle was relatively low, the occurrence this parasite in abortions from dairy cows was high.

Key words: *Neospora caninum*. Dairy cattle. ELISA. PCR. Vertical transmission. Abortion.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Anticorpos contra <i>Neospora caninum</i> em bovinos no Brasil, 1999 – 2012	16
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida <i>Neospora caninum</i>	15
Figura 2 – Diferença entre a transmissão transplacentária endógena (a) e exógena (b) de <i>Neospora caninum</i>	17
Figura 3 – Aspectos imunológicos da relação hospedeiro-parasita em vacas gestantes e não gestantes	22

LISTA DE TABELAS

ARTIGO A

- Table 1** – Demonstration of the association between the variables studied and the presence of antibodies for *Neospora caninum* in slaughtered pregnant dairy cows (*Bos taurus*), in state of Santa Catarina, 2010.....38
- Table 2** – Outcomes regarding *Neospora caninum* infection in slaughtered pregnant dairy cows (*Bos taurus*) and their fetuses, in state of Santa Catarina, 201039

ARTIGO B

- Table 3** – Results of ELISAs from dams compared with serology (ELISAs) and PCR from fetuses52
- Table 4** – Demonstration of the association between the ages of cows, gestational period and the presence of antibodies for *Neospora caninum* from dairy cows that aborted.....53
- Table 5** – The outcome of *Neospora caninum* infection in dairy cows (*Bos taurus*) and their aborted fetuses.....54
- Table 6** – Association between the presence of antibodies for *Neospora caninum* in cows and fetuses, age of gestation, mean of OD, and PCR results55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 – HISTÓRICO	13
2.2 – ESTRUTURA E CICLO DE VIDA.....	14
2.3 – PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS EM BOVINOS	16
2.4 – TRANSMISSÃO VERTICAL	17
2.5 – TRANSMISSÃO HORIZONTAL	19
2.6 – ABORTAMENTO	20
2.7 – CONCLUSÃO	23
2.8 – REFERÊNCIAS	24
3 OBJETIVOS	32
3.1 – OBJETIVOS GERAIS	32
3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4 ARTIGOS	33
ARTIGO A: <i>Neospora caninum</i> : Avaliação da Transmissão Vertical em Vacas Leiteiras (<i>Bos Taurus</i>).....	33
ARTIGO B: Ocorrência de <i>Neospora Caninum</i> em Abortamentos de Bovinos Leiteiros no Sul do Brasil.....	46
5 CONCLUSÕES	59
APÊNDICE	60
APÊNDICE A.....	61
ANEXO	66
ANEXO A	67

1 INTRODUÇÃO

Entre os maiores produtores mundiais de leite, o Brasil ocupa a sétima posição no ranking, o equivalente a 4,2% da produção mundial. Contribuindo para este cenário, o estado de Santa Catarina destaca-se como quinto maior produtor, responsável por 7,7% da produção nacional. No período de 2005-2009, a produção catarinense cresceu em média 9,5% ao ano, mais que o dobro do crescimento médio brasileiro (CEPA, 2012).

A viabilidade da produção pecuária está diretamente ligada aos índices reprodutivos do rebanho, o que faz com que profissionais e pesquisadores da área estejam empenhados na busca de novas soluções e na descoberta de fatores que contribuem para os baixos índices reprodutivos nos rebanhos bovinos de corte e leite. Um dos fatores responsáveis pelos baixos índices produtivos e reprodutivos dos rebanhos são as doenças infecciosas. Diante disso, destaca-se a neosporose em bovinos, doença reconhecida em todo o mundo e atualmente aceita como importante causa de problemas reprodutivos e considerada a maior causa de abortos em bovinos (DUBEY; LINDSAY, 1996; ANDERSON; ANDRIANARIVO; CONRAD, 2000).

Outros prejuízos associados a neosporose incluem ainda ocorrência de fetos mumificados, natimortos, nascimento de bezerros com problemas neurológicos, aumento do intervalo de partos, diminuição da produção de leite, reposição de animais, além de custos com medicamentos e diagnóstico da doença (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – HISTÓRICO

Um protozoário semelhante a *Toxoplasma gondii* foi reportado como causador de severa encefalomielite em sete cães na Noruega no ano de 1984, os quais não apresentaram anticorpos anti-*T. gondii* (BJERKAS; MOHN; PRESTHUS, 1984). Diferenças na estrutura deste novo parasita, em relação ao *T. gondii* foram descritas por Bjerkas, Mohn e Presthus (1984). Estudando tecidos formalizados de cães nos Estados Unidos, anteriormente diagnosticados como *T. gondii*, Dubey et al. (1988a) baseados nas características que o diferenciava dos demais protozoários, passaram a denominar este novo protozoário de *Neospora caninum*. Três pontos levaram à diferenciação entre estes parasitas: os sinais clínicos eram paralisia de membros posteriores, os cistos teciduais eram morfologicamente diferentes e os parasitas não reagiram contra anticorpos para *T. gondii* na imunohistoquímica (DUBEY et al., 2002).

Dubey et al. (1988b) isolaram em cultura celular *N. caninum*, bem como, encontraram cistos teciduais em camundongos a partir de tecidos de filhotes de cães infectados congenitamente e que apresentavam os mesmos sinais clínicos descritos por Bjerkas, Mohn e Presthus (1984). McAllister et al. (1998) demonstraram que os cães são os hospedeiros definitivos de *N. caninum*. Um teste sorológico (DUBEY et al., 1988b) e um teste imunohistoquímico (LINDSAY; DUBEY, 1989) foram desenvolvidos para diferenciação de *N. caninum* e *T. gondii*.

A primeira descrição como agente causador de abortamentos em bovinos ocorreu em uma propriedade leiteira no Novo México, onde se verificou a presença de *N. caninum* em dois cérebros e um rim de fetos abortados (THILSTED; DUBEY, 1989). *N. caninum* foi apontado como o principal causador de abortamentos em bovinos na Califórnia (ANDERSON et al., 1991). O primeiro relato de isolamento em fetos bovinos abortados foi descrito por Conrad et al. (1993). O desenvolvimento da técnica de ELISA para diagnóstico sorológico da neosporose bovina e a primeira revelação do DNA de *N. caninum* através da PCR, estão descritos nos trabalhos de Paré, Hietala e Thurmond (1995) e Payne e Ellis (1996).

No Brasil, a primeira descrição de *N. caninum* em feto bovino abortado foi realizada por Gondim et al. (1999a), os quais observaram cistos

teciduais do protozoário em um feto abortado de oito meses de gestação de uma pequena propriedade leiteira com histórico de aborto.

2.2 – ESTRUTURA E CICLO DE VIDA

Neospora caninum é um parasita coccídio com um grande número de hospedeiros e o seu ciclo de vida envolve três estágios: taquizoítos, cistos teciduais e oocistos (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Os taquizoítos apresentam forma oval, lunar ou globular, medem 3-7 X 1-5 μm e se dividem em dois taquizoítas por endodiogenia. Nos animais infectados podem estar em vários tipos de células como as do sistema nervoso, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, miócitos, células renais e hepatócitos. Penetram no interior das células por invasão ativa e se localizam no citoplasma das mesmas formando um vacúolo parasitóforo (DUBEY; LINDSAY, 1996; DUBEY et al., 2002).

Os cistos teciduais são encontrados principalmente no sistema nervoso central, no entanto, cistos na musculatura esquelética também podem ser observados. Apresentam a forma oval ou arredondada, com espessura de parede de 4 μm e um diâmetro de até 107 μm . No interior destes cistos encontram-se os bradizoítos, que são estruturas alongadas e que medem 8 x 2 μm . (DUBEY; LINDSAY, 1996; DUBEY et al., 2002; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Já os oocistos são estruturas resistentes ao meio ambiente, medem aproximadamente 11,7 x 11,3 μm e são eliminados não esporulados pelas fezes dos hospedeiros definitivos. No seu interior há dois esporocistos (8,4 x 6,1 μm), os quais contém quatro esporozoítos (6,5 x 2,0 μm). Estes oocistos esporulam 24 horas após a sua eliminação, entretanto não se tem conhecimento da sobrevivência destes oocistos no meio ambiente (DUBEY; LINDSAY, 1996; DUBEY et al., 2002; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

De acordo com estudos experimentais foram identificados como hospedeiros definitivos de *N. caninum* o cão doméstico, dingo Australiano, o coiote (*Canis latrans*) e o lobo cinza (*Canis lupus*) (MCALLISTER et al., 1998; GONDIM et al., 2004; KING et al., 2010; DUBEY et al., 2011).

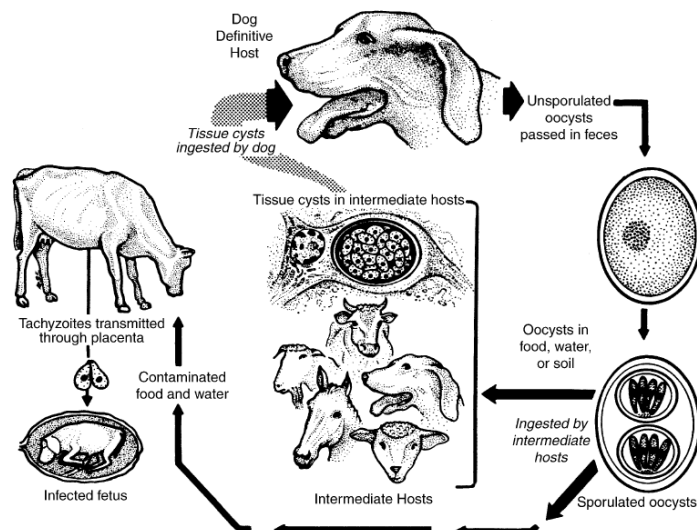
Os bovinos, búfalos, ovinos, caprinos, eqüinos, cães, aves, roedores, lagomorfos e uma série de animais silvestres são considerados como hospedeiros intermediários. Isto demonstra que um grande número de animais

domésticos e selvagens tem sido expostos ao *N. caninum*, o que pode ser observado na revisão de Dubey e Schares (2011). Os estágios de taquizoítos e cistos teciduais (formas assexuadas) são encontrados intracelularmente nos hospedeiros intermediários (DUBEY, 2005; GONDIM, 2006).

Os hospedeiros definitivos, ao ingerirem tecidos infectados de hospedeiros intermediários, irão eliminar pelas fezes os oocistos, que são as formas resistentes no ambiente e resultantes da reprodução sexuada que ocorre no intestino dos hospedeiros definitivos (GONDIM, 2006). Os estágios de taquizoítos e cistos teciduais (formas assexuadas) são encontrados intracelularmente nos hospedeiros intermediários e definitivos (DUBEY, 2005; DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006; GONDIM, 2006).

N. caninum pode ser transmitido após o nascimento (transmissão horizontal) pela ingestão de tecidos infectados com taquizoítos ou cistos teciduais, pela ingestão de alimento ou água contaminada pelos oocistos esporulados. Outra forma de infecção é a via transplacentária (transmissão vertical) que ocorre quando os taquizoítos são transmitidos da mãe para seu feto durante a gestação (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Figura 1 – Ciclo de vida *Neospora caninum*.



Fonte: Dubey (2005).

2.3 – PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS EM BOVINOS

A infecção por *N. caninum* em bovinos de corte e leite tem sido reportada em várias partes do mundo, o que pode ser verificada em detalhes na revisão de Dubey, Schares e Ortega-Mora (2007). No Brasil o primeiro estudo de soroprevalência do *N. caninum* em bovinos foi realizado por Gondim et al. (1999b), que detectaram os anticorpos foram em 63 (14,09 %) dos 447 soros testados de bovinos da raça holandesa e mestiços. A partir desta data, várias pesquisas em diversos estados foram realizadas, onde se verifica que a infecção está amplamente distribuída em várias regiões brasileiras (Quadro 1).

As freqüências de anticorpos em bovinos de leite podem variar de 9,5% a 91,2 % de acordo com os trabalhos de Aguiar et al. (2006) e Guedes et al. (2008). Em bovinos de corte as pesquisas revelaram valores de 6,7% a 29,9% (RAGOZO et al., 2003). Estes diferentes resultados nas diferentes regiões do país, nos leva a tomar alguns cuidados na interpretação destes resultados.

Quadro 1 – Prevalência de anticorpos contra *Neospora caninum* em bovinos no Brasil, 1999 - 2012.

Região	Estado	Bovino de leite	Bovino de corte	Número de amostras	Teste	Ponto de corte	Referência
Sul	PR	34,8%	-	172	ELISA	1:100	Locatelli-Dittrich et al., 2001
	PR	14,3%	-	623	IFAT	1:25	Guimarães Jr. et al, 2004
	PR	12%	-	385	IFAT	1:200	Ogawa et al., 2005
	PR	21,3%	26,7%	90	IFAT	1:25	Ragozo et al., 2003
	SC	23,1%	-	373	IFAT	1:200	Moura et al., 2012
	RS	18,6%	21,4%	140	IFAT	1:25	Ragozo et al., 2003
Sudeste	RS	17,8%	-	1549	IFAT	1:200	Corbellini et al., 2006
	SP	35,5%	20%	913	ELISA	-	Sartor et al., 2005
	SP	27,3%	-	150	IFAT	1:25	Ragozo et al., 2003
	MG	34,4%	11,1%	162	IFAT	1:25	Ragozo et al., 2003
	MG	91,2%	-	559	IFAT	1:200	Guedes et al., 2008
Centro-Oeste	RJ	22,7%	6,7%	150	IFAT	1:25	Ragozo et al., 2003
	MT	53,5%	-	932	IFAT	1:200	Benetti et al., 2009.
	MS	21,7%	29,9%	110	IFAT	1:25	Ragozo et al., 2003
Norte	GO	30,4%	29,6%	900	IFAT	1:250	Melo et al., 2006
	RO	9,5%	11,2%	1595	IFAT	1:25	Aguiar et al., 2006
	PA	17,5%	19,2%	160	IFAT	1:100	Minervino et al., 2008
Nordeste	TO	25%	-	192	IFAT	1:25	Martins et al., 2011
	BA	14,9%	-	447	IFAT	1:200	Gondim et al., 1999(b)
	MA	50,7%	-	812	IFAT	1:200	Teixeira et al., 2010

Fonte: O autor.

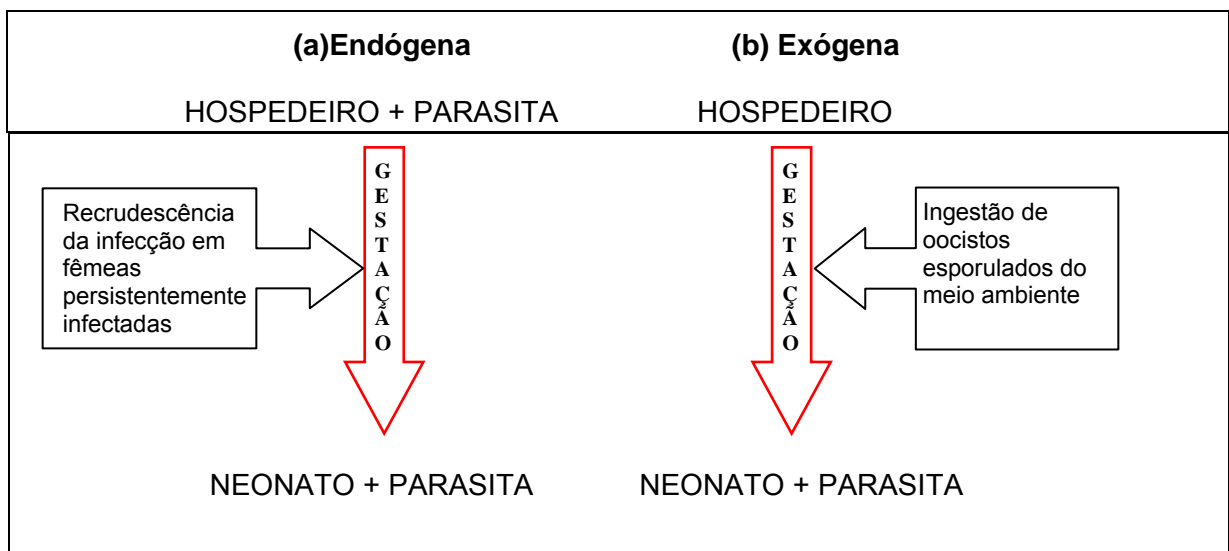
De acordo com as técnicas utilizadas, país ou região estudada, tamanho de amostras, sistema de produção, aptidão animal (corte ou leite), pode-se encontrar uma grande diferença na prevalência de anticorpos contra *N. caninum* em bovinos (DUBEY, 2003, 2005; DUBEY; SCHARES, 2011).

2.4 – TRANSMISSÃO VERTICAL

N. caninum é um dos microorganismos mais eficientemente transmitidos pela via transplacentária em bovinos, a que pode ocorrer por sucessivas gestações, proporcionando um meio eficaz de manter o agente dentro do rebanho (BJORKMANN et al., 1996; SCHARES et al., 1998; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; DUBEY; SCHARES, 2011).

Para uma melhor compreensão da origem da infecção transplacentária, recentemente passou-se a usar os seguintes termos: transmissão transplacentária endógena e exógena (Figura 2).

Figura 2 – Diferença entre a transmissão transplacentária endógena (a) e exógena (b) do *Neospora caninum*.



Fonte: Adaptado de Trees e Williams (2005).

A transmissão transplacentária exógena ocorre quando há a ingestão de oocistos esporulados presentes no meio ambiente pela fêmea gestante, todavia, quando ocorre a recrudescência ou reativação da infecção nas fêmeas persistentemente infectadas, denominamos de transmissão transplacentária

endógena (Figura 2) (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; TREES; WILLIAMS; 2005; DUBEY; SCHARES, 2011).

O estudo sorológico pré-colostral é uma importante maneira de mensurar a infecção congênita. A frequência da transmissão vertical pode ser estimada pelo número de bezerros soropositivos antes de ingerirem o colostro em relação ao número de vacas soropositivas (MORÉ et al., 2009; DUBEY; SCHARES, 2011).

A transmissão vertical é considerada a mais importante, pois o *N. caninum* é um dos microorganismos mais eficientes com relação a transmissão transplacentária em bovinos, podendo manter o agente por diversas gerações (INNES, 2007; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007). Diversos estudos comprovaram esta eficiência como nos trabalhos de Schares et al. (1998), Wouda, Moen e Schukken (1998), Davison, Otter e Trees (1999), Hall, Reichel e Ellis (2005), Bartels et al. (2007), Dijkstra et al. (2008), Cardoso et al. (2012), os quais encontraram as seguintes taxas, 93%, 82%, 95%, 74%, 61,8%, 58% e 83,33%, respectivamente. Porém Moré et al. (2009) encontraram uma baixa transmissão vertical em seus estudos (37,1%).

Bergeron et al. (2000), Chanlum et al. (2007) e Cardoso et al. (2012) sugerem que estas disparidades nas taxas de transmissões verticais podem ser explicadas pelas diferenças nas prevalências de anticorpos entre rebanhos, onde rebanhos com uma maior prevalência apresentam maior transmissão vertical. Maiores taxas podem estar relacionadas com o status sorológico da vaca, sendo que animais que apresentavam títulos mais altos de anticorpos apresentaram maior taxa de transmissão vertical conforme os trabalhos de Paré, Hietala e Thurmond (1995), Moré et al. (2009) e Oliveira et al. (2010).

Dijkstra et al. (2003), sugerem que a infecção congênita decresce com o aumento da idade vaca, possivelmente um indicativo de aumento de imunidade nesses animais mais velhos. Paré, Hietala e Thurmond (1995), citam que uma menor transmissão vertical pode estar relacionada a uma contínua estimulação do sistema imune, principalmente em condições endêmicas.

2.5 – TRANSMISSÃO HORIZONTAL

A ingestão de oocistos esporulados de *N. caninum* do meio ambiente é o principal modo de transmissão em bovinos após o nascimento (GONDIM; GAO; McALLISTER, 2002; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; MCCANN et al., 2007). Como é de conhecimento que a infecção pré-natal ocorre em menos de 100% dos casos, é evidente assim a importância da transmissão horizontal para a manutenção da infecção, pois sem esta a neosporose se extinguiria.

Não há nenhuma evidência que *N. caninum* está presente em excreções e secreções de animais adultos assintomáticos, sendo assim, a transmissão de bovino para bovino não tem sido observada (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

A soroconversão em bovinos para *N. caninum* foi observada por Cardoso et al. (2012), que obtiveram os valores de 0,37%, 3% e 6,94% ao estudarem três rebanhos leiteiros. Valores semelhantes foram encontrados por Davidson, Otter e Trees (1999), Bartels et al. (2007), 1,9 %, 4,5%, respectivamente. Valores superiores foram apontados por Moré et al. (2009) os quais obtiveram uma taxa de transmissão horizontal de 47%. Estas discrepâncias podem ser explicadas pelos diferentes métodos de diagnósticos e pontos de corte aplicados, bem como as condições de manejo e a presença de cães nas propriedades estudadas.

Embora demonstrada por Serrano et al. (2006) a transmissão venérea em bovinos é improvável de acontecer, sugerindo que o risco da transmissão sexual é baixo e com pequena importância epidemiológica. Serrano-Martinéz et al. (2007) observaram a parasitemia, soroconversão, e níveis de IFN- γ em novilhas inseminadas com sêmen experimentalmente contaminados com taquizoítos nas doses de 10^2 , 5×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5 , respectivamente. Neste mesmo experimento, avaliando fêmeas multíparas, os autores não observaram a parasitemia e apenas um animal apresentou soroconversão, demonstrando que animais adultos podem apresentar uma maior resistência à infecção. Já Osoro et al. (2009) não observaram transmissão venérea em condições naturais, onde touros infectados artificialmente foram mantidos com fêmeas soronegativas e as mesmas não soroconverteram após o período de monta natural.

Já a transferência de embriões é recomendada como técnica de prevenção para evitar a transmissão de *N. caninum*, desde que se utilize receptoras negativas (BAILLARGEON et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2010).

Uglla et al. (1998) demonstraram a possibilidade da transmissão lactogênica, ao alimentar bezerros com mamadeiras contendo colostro com taquizoitos, e verificaram a soroconversão desses animais, bem como detectaram DNA de *N. caninum* no cérebro dos bezerros. Dijkstra et al. (2001) citam que não é bem conhecido o papel dos anticorpos específicos presentes no colostro de vacas soropositivas sobre a influência na sobrevivência de taquizoitos no leite. Entretanto, não existe um estudo conclusivo sobre a ocorrência da transmissão lactogênica de *N. caninum* de maneira natural em bovinos.

2.6 – ABORTAMENTO

O abortamento é o principal sinal clínico da neosporose em bovinos de corte e leite (DUBEY; LINDSAY, 1996; ANDERSON; ANDRIANARIVO; CONRAD, 2000; HADDAD; DOHOO; VANLEEWEN, 2005; DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006). Pode ser definido como a expulsão do feto entre 42 e 260 dias após a inseminação ou pela suposta perda fetal em um intervalo maior que 120 dias entre duas inseminações (WOUDA; MOEN; SCHUKKEN, 1998).

Abortamentos epidêmicos são temporários e podem ser considerados quando 15% das fêmeas bovinas que estão em reprodução abortam dentro de um período de 4 semanas, ou se 12,5 % abortarem dentro de 8 semanas, ou quando 10% das fêmeas bovinas abortarem em 6 semanas (MOEN et al., 1998; WOUDA; MOEN; SCHUKKEN, 1998; SCHARES et al., 2002). Já os abortos endêmicos são aqueles que persistem no rebanho por vários meses ou anos (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

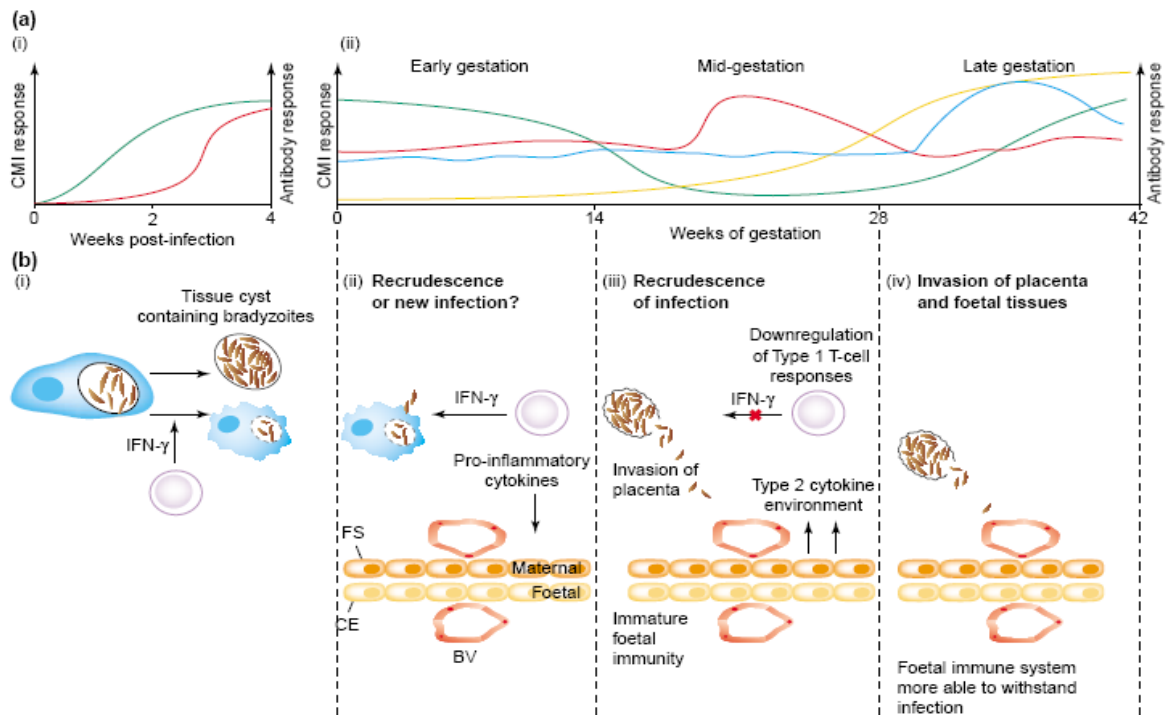
Na neosporose os abortamentos podem ocorrer a partir dos três meses de idade, sendo que a maioria ocorre em torno do quinto e sexto meses de gestação (DUBEY; SCHARES, 2011), entre o quarto e o sexto mês (ANDERSON; ANDRIANARIVO; CONRAD, 2000) e entre o quarto e o sétimo mês de gestação (DUBEY; LYNDASAY, 1996). Pescador et al. (2007) encontraram uma média das idades dos fetos abortados com lesões sugestivas de *N. caninum* de 4,47 ($\pm 1,09$) meses, ao avaliar 89 fetos abortados entre três e oito meses de gestação.

Collantes-Fernández et al. (2006) sugerem que a distribuição de *N. caninum* pelos tecidos fetais ocorre com maior intensidade no início e meio da gestação. Em fetos abortados nos estágios iniciais, DNA do parasita foi demonstrado na maioria dos órgãos fetais, bem como foi encontrado uma alta carga parasitária nos tecidos, principalmente no cérebro e coração. Já no terço médio a detecção do parasita foi menos frequente e alta carga parasitária foi verificada somente no cérebro. Nos estágios finais, DNA do parasita pode ser detectado em baixos níveis no cérebro e esporadicamente no coração, diafragma e linfonodos fetais. Dubey, Buxton e Wouda (2006) afirmam que no primeiro trimestre de gestação, o feto é extremamente vulnerável ao *N. caninum* e que dificilmente sobrevive quando infectados neste estágio.

Para que ocorra o abortamento, o feto ou a sua placenta devem apresentar lesões, inviabilizando assim a gestação (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006). As lesões placentárias irão comprometer a sobrevivência fetal diretamente, ou causar a liberação de prostaglandinas maternas que levarão à luteólise e conseqüentemente ao abortamento (DUBEY; SCAHRES, 2011). Análises histológicas demonstraram necrose focal das vilosidades fetais nos placentomas, acompanhados da presença de taquizoítos de *N. caninum* aos 14 dias após inoculação pela via endovenosa (MACALDOWIE et al., 2004).

Os danos causados ao feto ocorrem pela multiplicação do parasito em seus tecidos e pela deficiente oxigenação e nutrição devido as lesões na placenta (DUBEY; SCAHRES, 2011). Lesões na musculatura esquelética, coração, pulmão, cérebro, fígado e rins foram observadas em fetos abortados (PESCADOR et al., 2007). Os fatores importantes na determinação destas lesões, bem como o aparecimento do aborto são: o período gestacional e o estado de desenvolvimento da imunocompetência fetal (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006). É no terço médio (4-6 meses) que o feto está iniciando o desenvolvimento de uma resposta imune específica frente a parasitas, tornando-se capaz de reconhecer e responder frente a estes antígenos (BARTLEY et al., 2004; INNES et al., 2005). Sendo assim, fetos infectados nos estágios finais de gestação terão maior chance de sobrevivência, pois no início da gestação o sistema imune está imaturo levando a morte fetal (GIBNEY et al., 2008).

Figura 3 –Aspectos imunológicos da relação hospedeiro-parasita em vacas gestantes e não gestantes.



Fonte: Innes et al. (2002).

De acordo com a figura 3 verifica-se o desenvolvimento da imunidade mediada por células (verde) e produção de anticorpos (vermelho) em vacas não gestantes [(a)(i)]. A produção de interferon pelas células $CD4^+$ T (violeta) é capaz de limitar a multiplicação intracelular do parasita [(b)(i)]. Em vacas gestantes observa-se a imunidade mediada por células (verde), bem como a parasitemia no terço médio (vermelho) e final (azul) da gestação. O desenvolvimento da imunidade fetal está representada em amarelo[(a)(ii)]. No início da gestação ocorre uma forte ação da imunidade celular, onde citocinas Th 1 vão atuar na interface materno –fetal (CE: epitélio coriônico; FS: sincício materno-fetal; BS: vasos sanguíneos) podendo levar ao abortamento [(b)(ii)]. No terço médio da gestação ocorre uma imunomodulação celular e incapacidade de manter a produção de IFN γ , favorecendo a recrudescência do parasita. Neste período ocorre a ação de citocinas Th 2 no intuito de manter a gestação [(b)(iii)]. Na fase final da gestação a probabilidade de ocorrer o abortamento é mínima em função do desenvolvimento da imunidade fetal [(b)(iv)] (INNES et al., 2002)

Patógenos intracelulares, como *N. caninum*, apresentam uma resposta imune mediada por células (CMI), as quais estimulam a produção de citocinas Th 1, tais como interferon gamma (IFN γ), interleucina 2 (IL-2) e fator de necrose α (TNF- α) que podem ser prejudiciais à gestação, podendo levar ao abortamento ou rejeição fetal (ENTRICAN, 2002; INNES et al., 2002; REICHEL; ELLIS, 2009). As rotas de produção destas citocinas levam à formação de radicais livres e de óxido nítrico, os quais são letais para protozoários, mas extremamente prejudiciais ao feto (QUINN; ELLIS; SMITH, 2002). Portanto, a estimulação das citocinas Th 1 em fêmeas no início da gestação é, provavelmente, responsável pelas mortes embrionárias na neosporose bovina (HADDAD; DOHOO; VANLEEWEN, 2005).

No terço médio gestacional ocorre uma imunomodulação, onde as fêmeas bovinas vão apresentar uma incapacidade de manter a imunidade mediada por células (CMI) e a produção de interferon gamma (IFN γ), o que pode ser responsável pela excitação ou recrudescência do parasita (INNES et al., 2005; DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006). Nesta fase ocorre também a produção de citocinas Th 2, as quais atuarão na manutenção da gestação, através da neutralização dos efeitos da resposta tipo Th 1, porém vai facilitar a invasão do parasita na placenta e feto (INNES et al., 2002). Portanto, é no terço médio gestacional que teremos a maioria dos abortamentos ou o nascimentos de bezerros fracos com problemas neurológicos (HADDAD; DOHOO; VANLEEWEN, 2005).

No terço final da gestação o feto já apresenta um sistema imunológico mais desenvolvido capaz de exercer uma defesa contra o parasita (INNES, 2007). Nestas circunstâncias as possíveis lesões nos fetos serão bem menores em relação aos fetos infectados no terço inicial e médio da gestação (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006). Assim, ocorrerá a transmissão transplacentária, em que os bezerros irão nascer sem sinais clínicos, porém infectados com o parasita (INNES et al., 2005).

2.7 – CONCLUSÃO

A neosporose tem emergido como uma grave doença em bovinos. Atualmente é reconhecida como a principal causa de abortos em todo o mundo. Outros problemas como o nascimento de animais mortos, bezerros com

sintomatologia nervosa, mumificação fetal, aumento do intervalo de partos, diminuição da produção de leite e carne, demonstram que a neosporose acarreta grandes perdas econômicas ao sistema de produção de bovinos.

Diante desta realidade tornam-se necessários maiores estudos relacionados a prevalência, transmissão vertical, resposta imunológica fetal, avaliação de ferramentas de diagnóstico, bem como o envolvimento deste protozoário em abortos bovinos.

2.8 – REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; RODRIGUES, A. A. R.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; CAMARGO, E. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of anti-*N. caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil in association with some possible risk factors. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 142, p. 71-77, 2006.
- ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61, p. 417-431, 2000.
- ANDERSON, M. L.; BLANCHARD, P. C.; BARR, B. C.; DUBEY, J. P.; CONRAD, P. A. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. **Journal of The American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 198, n. 2, p. 141-144, 1991.
- BAILLARGEON, P.; FECTEAU, G.; PARÉ, J.; LAMOTHE, P.; SAUVÉ, R. Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 218, n. 11, p. 1803-1806, 2001.
- BARTELS, C. J. M.; HUININK, I.; BEIBOER, M. L.; VAN SCHAIK, G.; WOUDA, W.; DIJKSTRA, T.; STEGEMAN, A. Quantification of vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* infection in Dutch dairy herds. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 148, n. 2, p. 83-92, 2007.
- BARTLEY, P. M.; KIRVAR, E.; WRIGHT, S.; SWALES, C.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D.; MALEY, S. W.; SCHOCK, A.; RAE, A. G.; HAMILTON, C.; INNES, E. A. Maternal and fetal immune responses of cattle inoculated with *Neospora caninum* at mid-gestation. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 130, p. 81-91, 2004.

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

BERGERON, N.; FECTEAU, G.; PARÉ, J.; MARTINEAU, R.; VILLENEUVE, A. Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Québec. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 41, p. 464-469, 2000.

BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, Berlin, v. 70, n. 2, p. 271-274, 1984.

BJORKMAN, C.; JOHANSSON, O.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O. J. M; UGLA, A. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. **Journal of The American Veterinary Association**, Ithaca, v. 208, p. 1441-1444, 1996.

CARDOSO, J. M. S; AMAKU, M.; ARAÚJO, A. J. U. S.; GENNARI, S. M. A. longitudinal study of *Neospora caninum* infection on three dairy farms in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 187, n. 3-4, p. 553-557, 2012.

CEPA. **Síntese anual da agricultura de Santa Catarina 2010-2011**. Disponível em: <http://cepa.epagri.sc.gov.br/Publicacoes/Sintese_2011/sintese%202010-2011.pdf>. Acesso em: 8 out. 2012.

CHANLUN, A.; EMANUELSON, U.; FRÖSSLING, J.; AIUMLAMAI, S.; BJÖRKMANN, C. A longitudinal study of seroprevalence and seroconversion of *Neospora caninum* infection in dairy cattle in northeast Thailand. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 146, p. 242-248, 2007.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; RODRÍGUES-BERTOS, A.; ARNÁIZ-SECO, I.; MORENO, B.; ADURIZ, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine fetuses. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, p. 629-641, 2006.

CONRAD, P. A.; SVERLOW, K.; ANDERSOM, M.; ROWE, J.; BON DURANT, R.; TUTER, G.; BREITMEYER, R.; PALMER, C.; THURMOND, M.; ARDANS, A.; DUBEY, J. P.; DUHAMEL, G.; BARR, B. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 5, p. 572-578, 1993.

CORBELLINI, L. G.; SMITH, D. R.; PESCADOR, C. A.; SCHMITZ, Z.; CORREA, A.; STEFFEN, D. J.; DRIEMEIER, D. Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 74, p. 130-141, 2006.

DAVISON, H. C.; OTTER, A.; TREES, A. J. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 29, p. 1683-1689, 1999.

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H. W.; EYSKER, M.; BEIBOER, M. L.; WOUDA, W. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 110, p. 161-169, 2003.

DIJKSTRA, T.; LAM, T. J. G. M.; BARTELS, C. J. M.; EYSKER, M.; WOUDA, W. Natural postnatal *Neospora caninum* infection in cattle can persist and lead to endogenous transplacental infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 152, p. 220-225, 2008.

DIJKSTRA, T. H.; EYSKER, M.; SCHARES, G.; CONRATHS, F. J.; WOUDA, W.; BARKEMA, H. W. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 31, p. 747-752, 2001.

DUBEY, J. P. Neosporosis in Cattle. **The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 21, p. 473-483, 2005.

_____. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2003.

DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 32, p. 929-946, 2002.

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of The American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988a.

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

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

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structure of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites biology of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, p. 267-299, 1988.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 140, n. 1-2, p. 1-34, 2006.

_____. Neosporosis in animals: the last five years. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 180, p. 90-108, 2011.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007.

DUBEY, J. P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 134, p. 267-289, 2006.

DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; RAJENDRAM, C.; MISKA, K.; FERREIRA, L. R.; MARTINS, J.; KWOK, O. C. H.; CHOUDHARY, S. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *N. caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 181, p. 382-387.
ENTRICAN, G. Immune Regulation during Pregnancy and Host-Pathogen Interactions in Infectious Abortion. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 126, p. 79-94, 2002.

GONDIM, L. F. P. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 247-252, 2006.

GONDIM, L. F. P.; GAO, L.; MCALLISTER, M. M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 88, n. 6, p. 1159-1163, 2002.

GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 34, p. 159-161, 2004.

GONDIM, L. F. P.; SARTOR, I. F.; HASEGAWA, M.; YAMANE, I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 86, p. 71-75, 1999(b).

GONDIM, L. F. P.; SARTOR, I. F.; MONTEIRO JR, N. A.; HARITAMI, M. *Neospora caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 47, n. 1, p. 35, 1999(a).

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

GUIMARÃES JR, J. S.; SOUZA, S. L. P.; BERGAMASCHI, D. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 124, p. 1-8, 2004.

- GIBNEY, E. H.; KIPAR, A.; ROSBOTTOM, A.; GUY, C. S.; SMITH, R. F.; HETZEL, U.; TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* in early and late gestation correlates with foetal death. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 38, n. 2, p. 579-588, 2008.
- HADDAD, J. P. A.; DOHOO, I. R.; VANLEEWEN, J. A. A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle – a Canadian perspective. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 46, p. 230-243, 2005.
- HALL, C. A.; REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 128, p. 231-241, 2005.
- INNES, E. A. The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. **Parasitology**, Cambridge, v. 134, p. 1903-1910, 2007.
- INNES, E. A.; ANDRIANARIVO, A. G.; BJÖRKMAN, C.; WILLIAMS, D. J. L.; CONRAD, P. A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, p. 497-504, 2002.
- INNES, E. A.; WRIGHT, S.; BARTLEY, P.; MALEY, S.; MACALDOWIE, C.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 108, p. 29-36, 2005.
- KING, J. S.; SLAPETA, J.; JENKINS, D. J.; AL-QASSAB, S. E.; ELLIS, J. T.; WINDSOR, P. Australian dingoes are definitive host of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 40, p. 945-950, 2010.
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **American Journal of Veterinary Research**. Chicago, v. 50, p. 1981-1983, 1989.
- LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V. T.; RICHARTZ, R. R. T. B.; GASINO-JOINEAU, M. E.; VINNE, R.; PINCKNEY, R. D. Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in southern Brazil. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 87, n. 6, p. 1493-1494, 2001.
- MACALDOWIE, C.; MALLEY, S. W.; WRIGHT, S.; BARTLEY, P.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D.; INNES, E. A. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 131, p. 142-156, 2004.
- MARTINS, N. E. X.; FRESCHI, C. R.; BAPTISTA, F.; MACHADO, R. Z.; FREITAS, F. L. C.; ALMEIDA, K. S. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas lactantes do município de Araguaína, estado de Tocantins, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, Goiania, v. 40, n. 31, p. 231-238, 2011.

MCALLISTER, M. M.; DUBEY J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; MCGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, 1998.

MCCANN, C. M.; MCALLISTER, M. M.; GONDIM, L. F. P.; SMITH, R. F.; CRIPPS, P. J.; KIPAR, A.; WILLIAMS, D. J. L.; TREES, A. J. *Neospora caninum* in cattle: Experimental infection with oocysts can result in exogenous transplacental infection, but not endogenous transplacental infection in the subsequent pregnancy. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 37, p. 1631-1639, 2007.

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

MINERVINO, A. H. H.; RAGOZO, A. M.; MONTEIRO, R. M.; ORTOLANI, E. L.; GENNARI, S. M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle from Santarém, Pará, Brazil. **Research in Veterinary Science**, London, v. 84, n. 2, p. 254-256, 2008.

MOEN, A. R.; WOUDA, W.; MUL, M. F.; GRAAT, E. A. M.; VAN WERVEN, T. Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. **Theriogenology**, Stoneham, v. 49, p. 1301-1309, 1998.

MORÉ, G.; BACIGALUPE, D.; BASSO, W.; RAMBEAUD, M.; RAMIREZ, B.; VENTURINI, M. C.; VENTURINI, L. Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 160, p. 51-54, 2009.

MOURA, A. B.; SOUZA, A. P.; SARTOR, A. A.; BELLATO, V.; TEIXEIRA, E. B. *Neospora caninum* antibodies in dairy cattle of Lages municipality, Santa Catarina, Brazil. **Archivos de Medicina Veterinária**, Valdívia, v. 44, p. 117-122, 2012.

OGAWA, L.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O.; GONDIM, L. F. P.; NAVARRO, I. T. Ocorrência de anticorpos contra *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em bovinos leiteiros da região Norte do estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 3, p. 312-316, 2005.

OLIVEIRA, V. S. F.; ÁLVAREZ-GARCIA, G.; ORTEGA-MORA, L. M.; BORGES, L. M. F.; SILVA, A. C. Abortions in bovines and *Neospora caninum* transmission in an embryo transfer center. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 173, p. 206-210, 2010.

OSORO, K.; ORTEGA-MORA, L. M.; MARTÍNEZ, A.; SERRANO-MARTÍNEZ, E.; FERRE, I. Natural breeding with bulls experimentally infected with *Neospora caninum* failed to induce seroconversion in dams. **Theriogenology**, Stoneham, v. 71, p. 639-642, 2009.

PARÉ, J.; HIETALA, S. K.; THURMOND, M. C. Na enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp Infection in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 7, p. 325-359, 1995.

PAYNE, S.; ELLIS, J. Detection of *Neospora caninum* DNA by the polymerase chain reaction. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 26, n. 4, p. 347-351, 1996.

PESCADOR, C. A.; CORBELLINI, L. G.; OLIVEIRA, E. C.; RAYMUNDO, D. L.; DRIEMEIER, D. Histopathological and immunohistochemical aspects of *Neospora caninum* diagnosis in bovine aborted fetuses. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 150, p. 159-163, 2007.

QUINN, H. E.; ELLIS, J.T.; SMITH, N. C. *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 391-394, 2002.

RAGOZO, A. M. A.; PAULA, V. S. O.; SOUZA, S. L. P.; BERGAMASCHI, D. P.; GENNARI, S. M. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis estados brasileiros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 33-37, 2003.

REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. *Neospora caninum* - How close are we to development of an efficacious vaccine that prevents abortion in cattle? **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 39, p. 1173-1187, 2009.

SAGER, H.; FISCHER, I.; FURRER, K.; STRASSER, M.; WALDVOGEL, A.; BOERLIN, P.; AUDIGÉ, L.; GOTTSTEIN, B. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 102, p. 1-15, 2001.

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

SCHARES, G.; PETERS, M.; WURM, R.; BÄRWALD, A.; CONRATHS, F. J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 80, n. 2, p. 87-98, 1998.

SCHARES, G.; BÄRWALD, A.; STAUBACH, C.; ZILLER, M.; KLÖSS, D.; SCHRÖDER, R.; PETERS, M.; WURM, R.; SELHORST, T.; CONRATHS, F. J. P38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 106, p. 293-305, 2002.

SERRANO, E.; FERRE, I.; OSORO, K.; ADURIZ, G.; MATEOS-SANZ, A.; MARTÍNEZ, A.; ATXAERANDIO, R.; HIDALGO, C. O.; ORTEGA-MORA, L. M. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 135, p. 197-203, 2006.

SERRANO-MARTÍNEZ, E.; FERRE, I.; OSORO, K.; ADURIZ, G.; MOTA, R. A.; MARTÍNEZ, A.; DEL-POZO, I.; HIDALGO, C. O.; ORTEGA-MORA, L. M. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. **Theriogenology**, Stoneham, v. 67, p. 729-737, 2007.

TEIXEIRA, W. C.; UZÊDA, R. S.; GONDIM, L. F. P.; SILVA, M. I. S.; PEREIRA, H. M.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* (Apicomplexa: Sarcocystidae) em bovinos leiteiros de propriedades rurais em três microrregiões no estado do Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 9, p. 729-734, 2010.

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

TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 12, p. 558-561, 2005.

UGGLA, A.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O. J. M.; JAKUBEK, E. B.; THEBO, P.; KINDAHL, H.; BLORKMANN, C. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, p. 1467-1472, 1998.

WOUDA, W.; MOEN, A. R.; SCHUKKEN, Y. H. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. **Theriogenology**, Stoneham, v. 49, p. 1311-1316, 1998.

3 OBJETIVOS

3.1 – OBJETIVO GERAL

Estudar *N. caninum* em vacas leiteiras naturalmente infectadas, seus fetos e abortamentos no município de Presidente Getúlio, Santa Catarina.

3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a ocorrência de anticorpos contra *N. caninum* em vacas gestantes, seus respectivos fetos, e vacas não gestantes abatidas em frigorífico.
- b) Avaliar a transmissão vertical do parasita em vacas prenhas abatidas por meio da PCR e sorologia.
- c) Estudar a ocorrência de *N. caninum* em vacas que sofreram abortamentos e seus abortos.

4 ARTIGOS

ARTIGO A¹

***Neospora Caninum*: Evaluation of Vertical Transmission in Slaughtered Dairy Cows (*Bos Taurus*)**

***Neospora Caninum*: Avaliação da Transmissão Vertical em Vacas Leiteiras (*Bos Taurus*)**

César Augusto Barbosa de Macedo²

Abstract: *Neospora caninum* is a worldwide parasite recognized as one of the main parasites responsible for abortion in cattle. The objective of this study was to evaluate vertical transmission of *N. caninum* in dairy cows (*Bos taurus*) that were slaughtered at an abattoir in the state of Santa Catarina, southern Brazil. Blood samples (with and without EDTA) from 60 pregnant dairy cows and blood and tissue samples (brain, lung, heart and liver) from their fetuses were collected and used for PCR and serological evaluation. Blood samples from 60 non-pregnant cows were collected and used to detect antibodies. Anti-*N. caninum* antibodies were detected by indirect ELISA. Antibodies against *N. caninum* were observed in 41.6% (25/60) of the pregnant cows and in 43.3% (26/60) of the non-pregnant cows. Antibodies against the parasite were detected in three fetuses (5.5%). PCR analysis revealed that 3.3% (2/60) of the cows and 6.6% (4/60) of the fetuses evaluated were positive for specific *N. caninum* primers. These positive fetuses were between 4-6 months of age. Therefore, considering PCR and serological tests to be indicative of vertical transmission in fetuses, 11.6% (7/60) of the fetuses were infected by *N. caninum* during gestation.

Keywords: *Neospora caninum*. Dairy cattle. Vertical transmission. *Bos taurus*.

Resumo: *Neospora caninum* é um parasita de distribuição mundial reconhecido como um dos principais responsáveis por abortamento em bovinos. O objetivo deste estudo foi avaliar a transmissão vertical de *N. caninum* em vacas leiteiras (*Bos taurus*) que foram submetidas ao abate em matadouro no Estado de Santa Catarina, sul do Brasil. Sangue (com e sem EDTA) de 60 vacas leiteiras prenhas e amostras de sangue e tecidos (cérebro, pulmão, coração e fígado) de seus fetos foram coletados e utilizados para PCR e avaliação sorológica. Amostras de sangue de 60 vacas não-gestantes foram obtidas e utilizadas para detecção de anticorpos. A determinação de anticorpos séricos contra *N. Caninum* foi avaliada por ELISA teste indireto. Anticorpos contra *N. caninum* foram observados em 41,6% (25/60) das vacas prenhas e em 43,3% (26/60) das

¹ O artigo será enviado a Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.

² Laboratório de Protozoologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Caixa Postal 6001, 86050-970, Londrina, PR, Brasil.

vacas não-gestantes. Anticorpos contra o parasita foram detectados em três fetos (5,5%). Análise pela PCR revelou que 3,3% (2/60) das vacas e 6,6% (4 /60) dos fetos avaliados foram positivos para *N. caninum*. As idades dos fetos positivos eram de 4 a 6 meses. Portanto, considerando a PCR e a sorologia como indicativo de transmissão vertical em fetos, 11,6% (7/60) dos fetos foram infectados por *N. caninum* durante a gestação.

Palavras-chaves: *Neospora caninum*. Vacas leiteiras. Transmissão vertical. *Bos taurus*.

Introduction

Neospora caninum is a protozoan parasite that is distributed worldwide and is a major cause of abortion in cattle (DUBEY; SCHARES, 2006). Animals may be infected via three routes: ingestion of sporulated oocysts; transmission from dams to fetuses (vertical); and through meat containing tissue cysts. Cattle, as herbivorous animals, are infected via the first and second routes. In dairy herds, transmission principally occurs vertically (SCHARES et al., 1998; BARTELS et al., 2007). Vertical transmission can occur throughout the gestation period; however, abortions are most prevalent at 3 to 6 months of pregnancy (DUBEY; SCHARES, 2006). However, female calves can be born infected without any sign of infection and can keep the parasite in their tissue while they are raised, such that when they become pregnant, they may transmit the parasite to their offspring. This type of transmission is known as endogenous transplacental infection (TREES; WILLIAMS, 2005).

Neosporosis has been described as an important cause of abortion in southern Brazil (CORBELLINI et al., 2001; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2001; CORBELLINI et al., 2002). Locatelli-Dittrich et al. (2001) reported that the abortion risk in *N. caninum*-seropositive dairy cows was four times higher than in seronegative dairy cows. Corbellini et al. (2002) used both histopathological and serum sample examination from bovine aborted fetuses, and described a high rate of occurrence of *N. caninum* as the cause of abortion throughout the state of Rio Grande do Sul.

Although several studies relating to neosporosis among dairy cattle have been conducted, the documentation of vertical transmission in Brazilian herds remains inadequate. Thus, the aim of the present study was to evaluate anti-*N. caninum* antibody occurrence in serum samples, and vertical transmission of *N.*

caninum from dairy cows slaughtered at an abattoir located in the southern region of Brazil.

Materials and Methods

STUDY AREA AND SAMPLING

The 120 samples were obtained from 60 non-pregnant and 60 pregnant dairy cows (*Bos taurus*) and their respective fetuses at an abattoir located in the municipality of Presidente Getulio, state of Santa Catarina, southern Brazil during 2010 year. The present study was approved by the Animal Ethics Committee of the State University of Londrina (N. 018/2009).

BLOOD AND TISSUE SAMPLES

Blood samples with EDTA were collected individually in sterile tubes from the pregnant cows after they had been bled along the inspection line (during bleeding of the animals) and from their fetuses by means of cardiac puncture. The white blood cells were separated by centrifugation (550g for 10 minutes), and were used for DNA extraction and subsequent PCR analyses. The uterus of the dams was obtained individually with the fetuses inside. Each uterine horn containing the fetuses was aseptically opened, the fetuses were taken out from the uterus, and organ material was collected on individual sterilized Petri plates. At the laboratory, approximately 10 g of tissue fragments (brain and myocardium) were collected from fetuses ≥ 3 months of age, while similar tissue fragments (10 g) for fetuses ≤ 2 months were pooled for DNA extraction. The tissue samples were homogenized with 10 ml of saline solution (0,14M of NaCl), after which the homogenate was filtered, and 2ml were used for DNA extraction.

ANTI-Neospora caninum ANTIBODY DETECTION

Antibodies against *N. caninum* were detected by means of the HerdCheck *Neospora caninum* Antibody Test Kit (Idexx Laboratories). Serum samples from the cows were diluted 1:100, and serum from fetuses 1:25. The

presence or absence of antibodies to *N. caninum* was determined by calculating the ratio of sample to the positive control (S/P) for each sample. Serum samples with ratio (S/P) < 0.50 are classified as negative and ratio (S/P) ≥ 0.50 are positive. The ratio (S/P) was calculated as follows: (sample optical density – mean negative control)/(mean positive control – mean negative control). The sensitivity (Se) and specificity (Sp) of the test is 99% and 97,5%, respectively (VON BLUMRÖDER et al., 2004).

DNA EXTRACTION AND PCR

The DNA extraction was performed using the DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN Sample & Assay Technologies, Brazil), following the manufacturer's recommendations. PCR analyses were performed as previously described (MARQUES et al., 2011). Amplification of *N. caninum* DNA was done by using the Np21 and Np6 primers (MÜLLER et al., 1996). The PCR cycle was performed on a mixture (final volume of 25 µl) containing 5 µl of extracted DNA admixed with 20 µl of a solution containing 1.0 mM of each primer, 100 mM of dNTP (Invitrogen, Life Technologies, USA), 60 mM of Tris-HCl (pH 9.0), 15 mM of (NH₄)₂SO₄, 1.5 mM of MgCl₂, and 0.5 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Life Technologies, USA). Amplification of parasitic genomic DNA was done over 35 cycles in a PTC-100 thermocycler (MJ-Research), using the following cycling conditions: 5 minutes at 94°C, followed by 35 cycles of 30 seconds at 94 °C, 30 seconds at 65 °C and 60 seconds at 72 °C; the 35th cycle was followed by a final extension of 7 minutes at 72 °C. Aliquots from each PCR were viewed by means of electrophoresis on 2% agarose gel. For positive controls, DNA extracted from tachyzoites of the NC-1 strain (10⁶/ml) of *N. caninum*, diluted in TE buffer, were used. The negative control consisted of commercially prepared water samples without *N. caninum*. One positive and one negative control was included in each assay.

All variables were analyzed by means of the chi-square test (χ^2), with Yates correction, using the Epi Info software (CDC, version 6.04b). *P*-values ≤ 0.05 were taken to be significant.

Results

The serological results for *N. caninum* are presented in Table 1. Out of a total of 120 cows, samples from 51 (42.5%) reacted positively to *N. caninum*. Positive seroreactivity to *N. caninum* occurred in samples from 41.6% (25/60) of the pregnant cows, while the positivity rate among non-pregnant animals was 43.3% (26/60); these values were not statistically different ($p = 1.0$). There was no statistical difference in relation to the breed of cattle (Table 1, $p = 1.0$). When the period of gestation was evaluated, there were no differences in the prevalence of *N. caninum* relative to the first (50%), second (35.7%) or third trimester (44.4%). Considering that almost all of the cows were more than four years old (116 animals), no comparisons regarding prevalence and proportionality with age were calculated.

The average optical density (OD) of the positive samples obtained from the pregnant animals was 1.64 ± 0.92 , compared with 1.82 ± 0.105 among their non-pregnant counterparts (Table 2). In relation to the period of gestation, the mean OD was 1.18 ± 0.89 for the first, 2.16 ± 0.90 for the second and 1.28 ± 0.83 for the third trimester ($p = 0.051$). Comparative analysis on the PCR and serological results revealed that one of the two cows that was PCR-positive was also serologically negative, while the other was seropositive (mean OD = 1.83). Only one (cow no. 131) out of the four cows that had positive fetuses in the PCR analysis was positive in the serological test (OD = 0.55). The serological test revealed three positive fetuses; however, one of the dams was negative in ELISA.

Sixty fetuses were collected for evaluation: 14 were in the first, 28 in the second and 18 in the third trimester of gestation. Additionally, six fetuses were less than two months of age, and serum samples were not obtained from these animals. Thus, 54 serum samples from the fetuses were evaluated, and three (5.5%) of these samples were serologically positive with high antibody titers (OD > 3.1).

During this study, vertical transmission was demonstrated in 11.6% (7/60) of the fetuses by means of PCR and serological tests. Cerebral-derived DNA from the fetuses of cow no. 87 and cow no. 111 was positive in PCR analysis. Myocardial-derived DNA from the fetuses of cow no. 74 and cow no. 131 was positive in PCR reactions (Table 2). The DNA-derived blood samples from two cows (animals no.13 and 95) were PCR-positive, but only one animal (no. 26) had a

corresponding serum titer (OD = 1.83). However, the fetuses of these animals were PCR-negative.

Table 1– Demonstration of the association between the variables studied and the presence of antibodies for *Neospora caninum* in slaughtered pregnant dairy cows (*Bos taurus*), in state of Santa Catarina, 2010.

Variables	Positives (%)	Negative (%)	Total (%)	P
<i>Neospora</i>				
Cows				
Pregnant	25 (41.6)	35 (58.4)	60 (50)	1 ¹
Non-pregnant	26 (43.3)	34(56.7)	60 (50)	
	51 (42.5)	69(57.5)	120 (100)	
Trimester of gestation				
First	7 (50)	7 (50.0)	14 (23.3)	
Second	10 (35,7)	18 (64.3)	28 (46.7)	0,87 ¹
Third	8 (44,4)	10 (55.6)	18 (30.0)	

Font: author.

¹Chi-square with Yates correction.%percentage.

Table 2 – Outcomes regarding *Neospora caninum* infection in slaughtered pregnant dairy cows (*Bos taurus*) and their fetuses, in state of Santa Catarina, 2010.

Cow no.	ELISA ¹		Age of fetus (months)	PCR			
	Cow	Fetus		Cow		Fetuses*	
				Blood	Brain	Pool of organs ²	Myocardium
2	2.18	N	4	-	-	-	-
13	1.83	NO	1	+	-	-	-
25	2.25	N	7	-	-	-	-
26	2.17	N	3	-	-	-	-
28	0.55	N	6	-	-	-	-
53	3.05	N	6	-	-	-	-
54	0.6	N	7	-	-	-	-
58	1.13	3.3	8	-	-	-	-
62	0.59	NO	1	-	-	-	-
64	2.48	N	5	-	-	-	-
74	N	N	6	-	-	-	+
78	2.7	N	5	-	-	-	-
79	2.48	N	3	-	-	-	-
85	2.7	N	5	-	-	-	-
87	N	N	7	-	+	-	-
91	0.73	N	8	-	-	-	-
92	2.54	N	4	-	-	-	-
95	N	NO	2	+	-	-	-
97	0.74	NO	2	-	-	-	-
105	2.02	N	7	-	-	-	-
111	N	N	3	-	+	-	-
113	0.62	N	7	-	-	-	-
116	N	3.12	5	-	-	-	-
119	N	N	8	-	-	-	-
121	0.574	N	3	-	-	-	-
124	0.50	N	4	-	-	-	-
125	2.7	3.3	7	-	-	-	-
126	2.16	N	6	-	-	-	-
130	2.7	N	5	-	-	-	-
131	0.55	N	7	-	-	-	+
133	0.55	N	3	-	-	-	-

Font: author.

¹Optical density from ELISA (Idexx); N, negative; +, positive. * fetuses that were less than two months of age were macerated and evaluated using PCR. NO, not obtained.

Discussion

In our study, we investigated vertical transmission of *N. caninum* in dairy cattle slaughtered in southern Brazil. The overall results demonstrated an *N. caninum* vertical transmission rate of 11.6% (7/60). Three fetuses (3/7) had antibodies that were detected by ELISA (high levels of antibodies) and were *N. caninum* DNA negative in their tissue samples. One dam was serologically negative, and two others had higher antibody titers. Conversely, the other fetuses (4/7) were positive for the presence of *N. caninum* DNA in their tissues and were serologically negative, and their dams had low titers of antibodies (OD = 0.2 to 0.5). Fluctuations in the results similar to these have previously been described (MCINNES et al., 2006; DIJKSTRA et al., 2008; MORÉ et al., 2009; YAO et al., 2009; MARQUES et al., 2011). McInnes et al. (2006) reported that there was no correlation between the serological tests on dams and the PCR on their fetuses, and a high percentage of infected fetuses had serologically negative dams. Moré et al. (2009) showed that transplacental infection in dairy cattle may occur when antibody titers are low in adult cows.

Cabral et al. (2009) used histology, immunohistochemistry and nested-PCR to evaluate 105 aborted fetuses that were sent to the Biological Institute of São Paulo, Brazil, and found a neosporosis rate of 24.8%. In addition, Corbellini et al. (2006) found that 23% of the aborted fetuses that they collected in Rio Grande do Sul, Brazil, were infected by *N. caninum*. The rate of vertical transmission of neosporosis may vary between cattle herds, and it can range from 4.0 to 100% (DUBEY; SCHARES, 2011).

Just three cows in the present study had positive blood samples in PCR, in spite of the relatively high prevalence of IgG anti-*N. caninum* in serum samples. Yao et al. (2009) reported that negative PCR results of blood samples did not exclude *N. caninum* infection, which corroborates the observation that few *N. caninum* are present in the blood of intermediate hosts. Additionally, Okeoma et al. (2005) observed greater variation in the concentration of *N. caninum* DNA in blood samples than in heifer brain samples, which indicated that this organ should be chosen for isolating DNA from the parasite.

Therefore, since seronegative dams generate congenitally infected fetuses, the presence or absence of antibodies for *N. caninum* possibly neither

supports nor rules out vertical transmission. Yao et al. (2009) stated that seronegative abortion cases should be confirmed by means of PCR analysis on the fetus tissues. The mechanism for *Neospora* infection in seronegative dams might be explained in terms of: a) early-stage infection; b) the sensitivity of the serological assay (low antibody levels); or c) seronegative conversion in infected cows and immunotolerance of early in-utero infection (MCINNES et al., 2006; WILLIAMS; TREES, 2006; YAO et al., 2009). Under natural conditions, most infections caused by *N. caninum* are “in utero”, and parasite-induced reactions can be classified as self-infections (as are observed in some viral infections) without producing an immune response.

Previously, Marques et al. (2011) studied vertical transmission in zebu cattle in southern Brazil and found a rate of 4.8%, which is a lower rate than what was observed in the present study (11.6%). This phenomenon might represent the manifestation associated with each management system, i.e. the difference between having or not having access to infectious sources, nutritional differences and emphasis on production activity (such as milking or weaning), or the variability in the duration of time for which the animals are kept within breeding programs (MARQUES et al., 2011).

The prevalence of *N. caninum* among the cows in the present study was similar to what was described in some previous reports (RAGOZO et al., 2003; SARTOR et al., 2003; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2008; BENETTI et al., 2009), but was lower than in other studies (COSTA et al., 2001; GUIMARÃES JR et al., 2004; MINERVINO et al., 2008; MUNHOZ et al., 2009; EIRAS et al., 2011). The prevalence of *N. caninum* in dairy cattle in Brazil was previously described as ranging from 9.5% to 91.2% (RAGOZO et al., 2003; AGUIAR et al., 2006; GUEDES et al., 2008). Therefore, caution is needed in evaluating the results from prevalence studies, since the differences in results might be directly related to the serological techniques used, the cutoff values, the sample size or the type (breed and/or species) of animal that is being investigated.

Locatelli-Dittrich et al. (2008) and Munhoz et al. (2009) in Brazil, Wang et al. (2010) and Xia et al. (2011) in China and Eiras et al. (2011) in Spain evaluated anti-*N. caninum* antibodies in dairy cattle by using ELISA (Idexx). These authors observed a seroprevalence range from 13.3 to 38.2%. Thus, the results

obtained from these previous studies might be easier to compare with those from the present study.

In our study, it was difficult to precisely determine whether endogenous or exogenous transmission had higher or lower importance. We could speculate, considering that 5/6 of the *N. caninum*-positive fetuses had ≥ 5 months of gestation and were almost ready to be born, that endogenous transplacental infection could be considered to be a major infection source for fetuses, but further studies need to be performed to confirm this hypothesis. Bartels et al. (2007) described rates of 44.9% and 4.5%, respectively, for vertical and horizontal transmission in Dutch dairy herds.

We did not observe any statistical difference between seropositive pregnant (41.6%) and non-pregnant cows (43.3%) during this study. This finding could mean that natural immune suppression during the gestational period does not change the prevalence of antibodies against *N. caninum*. The events that occur during pregnancy and the influences of prenatal exposure to the parasite on the development of an immune response are critical issues (INNES et al., 2002) that have to be addressed if the associated mechanism is to be completely understood (WILLIAMS; TREES, 2006).

In conclusion, this study demonstrated a vertical transmission rate for *N. caninum* of 11.6% in naturally infected pregnant dairy cows in southern Brazil. Additionally, this study was the first description of the occurrence of anti-*N. caninum* antibodies in dairy cattle (42.5%) in the state of Santa Catarina.

References

- Aguiar, DM, Cavalcante, GT, Rodrigues, AAR, Labruna, MB, Camargo, LMA, Camargo, EP, Gennari, SM. Prevalence of anti-*N. caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil in association with some possible risk factors. **Vet Parasitol.** 2006; 142: 71-77.
- Bartels CJM, Huinink I, Beiboer ML, Van Schaik G, Wouda W, Dijkstra T, Stegeman A. Quantification of vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* infection in Dutch dairy herds. **Vet Parasitol.** 2007; 148(2): 83-92.
- Beneti AH, Schein FB, Dos Santos TR, Toniollo GH, Da Costa AJ, Mineo JR, et al. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais da região Sudoeste do Estado de Mato Grosso. **Rev Bras Parasitol Vet.** 2009; 18(1): 29-33.

Cabral AD, Camargo CN, Galleti NTC, Okuda LH, Pituco EM, Fava CD. Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histology, immunohistochemistry, and nested-PCR. **Rev Bras Parasitol Vet.** 2009; 18(4): 14-19.

Corbellini LG, Driemeier D, Mori AM, Traverso S.D. Evaluation of *Neospora caninum*-associated abortion storm in a dairy herd in Santa Catarina, Brazil. **Rev Bras Reprod Anim.** 2001; 25(2): 258-259.

Corbellini LG, Driemeier D, Cruz CFE, Gondim LFP, Wald V. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Vet Parasitol.** 2002; 103(3): 195-202.

Corbellini LG, Smith DR, Pescador CA, Schmitz Z, Correa A, Steffen DJ, Driemeier D. Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. **Prev Vet Med.** 2006; 74: 130-141.

Costa GHN, Cabral DD, Varandas NP, Sobral EA, Borges FA, Castagnolli, KC. Frequency of antibodies for *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle, São Paulo and Minas Gerais States. **Semina: Ciênc Agrár** 2001; 22(1):61-66.

Dijkstra T, Lam TJGM, Bartels CJM, Eysker M, Wouda W. Natural postnatal *Neospora caninum* infection in cattle can persist and lead to endogenous transplacental infection. **Vet Parasitol.** 2008; 152: 220-225.

Dubey JP, Schares G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Vet Parasitol.** 2006; 140(1-2): 1-34.

Dubey JP, Schares, G. Neosporosis in animals – The last five years. **Vet Parasitol.** 2011; 180: 90-108.

Eiras C, Arnaiz I, Álvarez-García G, Ortega-Mora LM, Sanjuán ML, Yusc E, et al. *Neospora caninum* seroprevalence in dairy and beef cattle from the northwest region from Spain, Galicia. **Prev Vet Med.** 2011; 98(2-3):128-132. PMID: 21145605. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.10.014>.

Guedes MHP, Guimarães AM, Rocha, CMBM, Hirsch, C. Frequência de anticorpos anti- *Neospora caninum* em vacas e fetos provenientes de municípios do sul de Minas Gerais. **Rev Bras Parasitol Vet.** 2008; 17(4): 189-194.

Guimarães JR JS, Souza SLP, Bergamaschi DP, Gennari SM. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. **Vet Parasitol.** 2004. 124: 1-8.

Innes EA, Andrianarivo AG, Björkman C, Williams DJL, Conrad PA. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends Parasitol.** 2002; 18: 497-504.

Locatelli-Dittrich R, Machado JR PC, Fridlund-Pluge N, Richartz RRTB, Montiani-Ferreira F. et al. Determinação e correlação de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos e cães do Paraná, Brasil. **Rev Bras Parasitol Vet.** 2008; 17(1): 191-196.

Locatelli-Dittrich R, Soccol VT, Richartz RRTB, Gasino-Joineau ME, Vinne R, Pinckney RD. Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in southern Brazil. **J Parasitol**. 2001; 87(6): 1493-1494.

Marques FAC, Headley AS, Figueredo-Pereira V, Taroda A, Barros LD, Cunha IAL, et al. *Neospora caninum*: evaluation of vertical transmission in slaughtered beef cows (*Bos indicus*). **Parasitol Res**. 2011; 108(4): 1015-1019.

McInnes LM, Ryan UM, O'Handley R, Sager H, Forshaw D, Palmer DG. Diagnostic significance of *Neospora caninum* DNA detected by PCR in cattle serum. **Vet Parasitol**. 2006; 142(3-4): 207-213.

Minervino AHH, Ragozo AM, Monteiro RM, Ortolani EL, Gennari SM. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle from Santarém, Pará, Brazil. **Res Vet Sci**. 2008; 84(2): 254-256.

Moen AR, Wouda W, Mul MF, Graat EAM, Van Werven T. Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. **Theriogenology**. 1998; 49: 1301-1309.

Moré G, Bacigalupe D, Basso W, Rambeaud M, Ramirez B, Venturini MC, et al. Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. **Vet Parasitol**. 2009; 160: 51-54.

Müller N, Zimmermann V, Hentrich B, Gottstein B. Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* by PCR and DNA hybridization immunoassay. **J Clin Microbiol**. 1996; 34(11): 2850-2852.

Munhoz AD, Pereira MJS, Flausino W, Lopes CWG. *Neospora caninum* seropositivity in cattle breeds in the South Fluminense Paraíba Valley, state of Rio de Janeiro. **Pesq Vet Bras**. 2009. 29(1): 29-32.

Ogawa L, Freire RL, Vidotto O, Gondim LFP, Navarro IT. Ocorrência de anticorpos contra *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em bovinos leiteiros da região Norte do estado do Paraná. **Arq Bras Med Vet Zootec**. 2005; 57(3): 312-316.

Okeoma CM, Stowell KM, Williamson NB, Pomroy WE. *Neospora caninum*: Quantification of DNA in the blood of naturally infected aborted and pregnant cows using real-time PCR. **Exp Parasitol**. 2005; 110(1): 48-55.

Ragozo AMA, Paula VSO, Souza SLP, Bergamaschi DP, Gennari SM. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis estados brasileiros. **Rev Bras Parasitol Vet**. 2003; 12(1): 33-37.

Sartor IF, Hasegawa MY, Canavessi AMO, Pinckney RD. Occurrence of *Neospora caninum* antibody in dairy cows assayed by ELISA and IFAT from Avaré country, SP. **Semin: Ciênc Agrar**. 2003; 24(1): 3-10.

Schaes G, Peters M, Wurm R, Bärwald A, Conraths FJ. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. **Vet Parasitol**. 1998; 80(2): 87-98.

Trees AJ, Williams DJL. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends Parasitol.** 2005; 21(12): 558-561.

Von Blumröder D, Schares G, Norton R, Williams DJL, Esteban-Redondo I, Wright S, et al. Comparison and standardization of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. **Vet Parasitol.** 2004; 120: 11-22.

Wang C, Wang Y, Zou X, Zhai Y, Gao J, Hou M, Zhu XQ. Seroprevalence of *Neospora caninum* Infection in Dairy Cattle in Northeastern China. **J Parasitol.** 2010; 96(2): 451-452.

Williams DJL, Trees AJ. Protecting babies: vaccine strategies to prevent foetopathy in *Neospora caninum*-infected cattle. **Parasite Immunol.** 2006; 28(3): 61-67.

Xia HY, Zhou DH, Jia K, Zeng XB, Zhang DW, She LX, et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* Infection in Dairy Cattle of Southern China. **J Parasitol.** 2011; 97(1): 172-173.

Yao L, Yang N, Liu Q, Wang M, Zhang W, Qian WF, et al. Detection of *Neospora caninum* in aborted bovine fetuses and dam blood samples by nested PCR and ELISA and seroprevalence in Beijing and Tianjin, China. **Parasitol.** 2009; 136(11): 1251-1256.

ARTIGO B ³**Occurrence of *Neospora caninum* abortions in dairy cattle from Southern Brazil
Ocorrência de *Neospora caninum* em abortamentos de bovinos leiteiros no Sul
do Brasil**César Augusto Barbosa de Macedo⁴

Abstract: *Neospora caninum* is a protozoan parasite that infect animals, and this is considered a major cause of abortion in cattle throughout the world, particularly in dairy cattle. The aim of the present study was to determine the occurrence of *N. caninum* in 43 abortions of dairy cattle from Santa Catarina State, Southern Brazil. Blood from dairy cows that aborted and intrathoracic fluid and tissue samples (brain, lung, heart, and liver) from their fetuses were collected and used for PCR and serologic evaluation. Antibodies anti-*N. caninum* were detected by indirect ELISA (Idexx). Twenty two cows (52.4%), and eight fetuses (25%) were serologically positive. Dams with more than thirty-six months of age had higher risk to be serum positives than younger animals (OR=0.05; 0.00<OR<0.46; p=0.002). PCR analysis revealed that 44% (16/36) of the fetuses were positive to *N. caninum*. Dams with result positive in serology had higher chance to have either serum (p=0.0003) or PCR (OR=16; 2.4<OR<130; p=0.0014) positive fetuses. The average gestational of aborted fetuses was 6.75 (\pm 1.2) months. In the present study, considering seropositive cows and the positive results of PCR or serology of the aborted fetuses, the occurrence of the *Neospora caninum* in abortions from dairy cows was 37.8%.

Keywords: *Neospora caninum*. Dairy cattle. Abortions. PCR. ELISA.

Resumo: *Neospora caninum* é um protozoário parasita dos animais e é considerado a maior causa de abortamentos de bovinos em todo o mundo, principalmente nos bovinos leiteiros. O objetivo deste estudo foi determinar o envolvimento de *N. caninum* em 43 abortos de fêmeas bovinas leiteiras no estado de Santa Catarina, Sul do Brasil. Sangue de fêmeas bovinas leiteiras que abortaram, líquido intratorácico e amostras de tecidos (cérebro, pulmão, coração e fígado) de seus fetos foram colhidos e usados para PCR e sorologia. O soro das 42 fêmeas bovinas e o líquido intratorácico dos fetos foram utilizados para a detecção de anticorpos através de ELISA indireto (Idexx). Vinte e duas fêmeas bovinas (52,4%) e oito fetos (25%) foram sorologicamente positivos. Fêmeas acima de 36 meses apresentaram maior chance de serem soropositivas (OR=0.05; 0.00<OR<0.46, p=0.002). Pela PCR detectou-se que 44% (16/36) dos fetos foram positivos para *N. caninum*. Fêmeas soropositivas apresentaram maior chance de apresentarem fetos soropositivos (p=0.0003) e PCR positivos (OR=16; 2.4<OR<130, p=0.0014). A idade média gestacional dos fetos abortados foi 6.75 (1,2 \pm) meses. No presente estudo,

³ O artigo será enviado a Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.

⁴ Laboratório de Protozoologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Caixa Postal 6001, 86050-970, Londrina, PR, Brasil.

considerando as vacas soropositivas e os resultados positivos da PCR ou sorologia dos fetos abortados, a ocorrência de *Neospora caninum* em abortamentos de vacas leiteiras foi de 37.8%.

Keywords: *Neospora caninum*. Dairy cattle. Abortions. PCR. ELISA.

Introduction

Neospora caninum is a protozoan parasite of animals and it was misdiagnosed as *Toxoplasma gondii* until 1988 (DUBEY, 2005; DUBEY et al., 2007, DUBEY; SCHARES, 2011). Dogs (*Canis lupus familiaris*), coyotes (*Canis latrans*), dingoes (*Canis lupus dingo*), and gray wolves (*C. lupus*) were described as definitive hosts (MCALLISTER et al., 1998; GONDIM et al., 2004; KING et al., 2010; DUBEY et al., 2011). Several productive and wild animal species have been identified as intermediate hosts of *N. caninum* (DUBEY; LINDSAY, 1996). Surveys in several countries have identified *N. caninum* infection as the major diagnosed cause of bovine abortion (ANDERSON et al., 2000), particularly among dairy cattle (DUBEY; LINDSAY, 1996).

N. caninum can be either transmitted postnatally (horizontally) by ingestion of food, drinking water with sporulated oocysts, or transplacentally (DUBEY, 2005; DUBEY et al., 2007). Vertical transmission of *N. caninum* through generations of cattle appears to be the major way by which the infection is maintained in herds (WOUDA et al., 1988; DAVIDSON et al., 1999; HALL et al., 2005). Fetuses may die in utero, be reabsorbed, mummified, autolyzed, stillborn, born alive with clinical signs, or born clinically normal but chronically infected (DUBEY, 2003; HADDAD et al., 2005).

Diagnosis of neosporosis abortion is difficult, and often expensive. Serologic examination of the dam and fetus (DUBEY; LINDSAY, 1996), histologic lesions and immunohistochemistry (ANDERSON et al., 2000) and parasite detection by PCR techniques (ORTEGA-MORA et al., 2006) are some tools that may contribute to a successful diagnosis of bovine *Neospora* abortion.

The aim of the present study was to investigate the occurrence of *N. caninum* in dairy cattle abortions from Southern Brazil, through the techniques enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and polymerase chain reaction (PCR).

Materials and Methods

STUDY AREA AND SAMPLING

The survey was carried out in the city of Presidente Getulio (27° 03' 03" S, 49° 37' 22" N), located in the river valley Itajaí of the Santa Catarina State, southern Brazil, at an altitude of 255 m. Forty-three dairy cows (*Bos Taurus*) and their aborted fetuses were analysed during may of 2008 to april of 2010 from thirty-five dairy farms. After 30 days of abortion all farms were visited to obtain a second blood sample from the dam.

BLOOD, INTRATHORACIC FLUID AND TISSUE SAMPLES

Blood samples with and without EDTA were collected from dairy cows that aborted and intrathoracic fluid from their fetuses. The white blood cells were separated by centrifugation (550xg – 10min), and it was used for DNA extraction and PCR. A pool of tissues from fetuses (brain, heart, liver, lung) were obtained. The tissue samples were homogenized in a blender with 10 ml of saline solution (0.14M NaCl). Thus, the homogenate was filtered through 2 layers gauze, and 2 ml were used for DNA extraction.

ANTI-Neospora caninum ANTIBODY DETECTION

Antibodies against *N. caninum* were detected using a commercial indirect ELISA test (Idexx HerdCheck) that employed *N. caninum* tachyzoite-soluble proteins as the antigen. Serum from cows were diluted 1:100 and fetuses 1:25. The presence or absence of antibodies to *N. caninum* was determined by calculating the ratio of sample to the positive control (S/P) for each sample. Serum samples with ratio (S/P) < 0.50 are classified as negative and ratio (S/P) ≥ 0.50 are positive. The ratio (S/P) was calculated as follows: (sample optical density – mean negative control)/(mean positive control – mean negative control). The sensitivity (Se) and specificity (Sp) of the test is 99% and 97,5%, respectively (VON BLUMRÖDER et al., 2004).

DNA EXTRACTION AND PCR

DNA extractions from blood, intrathoracic fluid and tissues were performed by PureLink™ Genomic DNA Purification (Invitrogen) following manufacture's recommendations. PCR analyses were performed as previously described (MARQUES et al., 2011). The amplification of *N. caninum* DNA was held by Np21 and Np6 primers as previously described (MÜLLER et al., 1996). PCR was performed in a mixture containing 5 µl of DNA extracted plus 20 µl (final volume of 25 µl) of mixture of 1.0 mM of each primer, 100mM dNTP (Invitrogen, Life Technologies. USA), 60mM Tris-HCl (pH 9.0), 15mM (NH₄)₂SO₄, 1.5 mM MgCl₂ and 0.5U Taq DNA polymerase (Invitrogen, Life Technologies. USA). Amplification of parasite DNA was done over 35 cycles in thermocycler PTC-100 (MJ-Research), using the following cycling conditions for PCR: 5min at 94 °C, followed by 35 cycles for 30 s at 94 °C, 30 s at 65 °C and 60 s at 72 °C. Cycle 35 was followed by a final extension of 7 min at 72 °C. Aliquots of each PCR were electrophoresed on 2% agarose gel. Tachyzoites of the NC-1 strain (10⁶/ml) were diluted in TE, and the DNA was extracted to be used as positive control. The negative control consisted of water samples without *N. caninum*. A positive and negative control was included in each test.

STATISTICAL ANALYSIS

Variables were analyzed by the Chi-square test (χ^2) corrected by Yates and Fisher Exact Test using the Epi 6 program (CDC. 6.04b version). The association among variables and occurrence of seropositives were estimated from values obtained by the odds ratio (OR) with a confidence interval of 95%. A *P*-value of ≤ 0.05 was considered as significant.

Results

The serologic and PCR results for *N. caninum* from cows and fetuses are shown in Table 5. From 42 dairy cows that aborted 22 (52.4%) were seropositive for *N. caninum*. Dams greater than thirty-six months had higher chance to be serum

positives [0,12;(0,01<OR<0,79); p=0.02] than younger animals (Table 4). All cows aborted with more than four months of gestation, and there were no statistical differences.

Dams serum positives had higher chance to have either serum (p=0.0003) or PCR [(16; (2.4<OR<130); p=0.0014) positive fetuses (Table 3). Thirty-five serum samples were obtained as paired sample. There were no serum conversion, and just in two samples the results changed from positive to negative (Table 5). Thirty-two serum samples from fetuses were obtained and eight (25.0%) were considered positive and six of those fetuses were positive by PCR (Table 5).

There were no blood samples from cows positive by PCR and 16 (44,4%) fetuses had their tissues or liquids positive in PCR (Table 5). The average of anti-*N. caninum* antibody titers was higher in the dams that had their fetuses positive in PCR (OD_{average}=1.68) when compared with cows that had not (OD_{average}=0.50). From 16 positive fetuses in PCR, 3 (18,7%) were aborted with 4-5 months of pregnancy, 8 (50%) and 5 (31,2%) with 6-7 months and 8-9 months of pregnancy, respectively (Table 6). The average (\pm SD) of gestational age from abortions was 6,75 (1,2 \pm) months. Three fetuses were mummified and it was not possible to evaluate either ELISA or PCR from them. Thus, considering the seropositive cows and the positive results of PCR or serology of the aborted fetuses, 37.8% (14/37) of the abortions had *N. caninum* as a possible abortifacient.

Discussion

The PCR is considered a valuable technique for the diagnosis of *N. caninum* (ORTEGA-MORA et al., 2006). According to the PCR results, we may assume that 44.4% (16/36) of the aborted fetus were positive. Medina et al. (2005), Yao et al. (2009) found by nested PCR the presence of *N. caninum* in 80% (35/44) and 57.7% (15/26) of aborted fetuses, respectively. However, other authors (SAGER et al., 2001; PEREIRA-BUENO et al., 2003; RAZMI et al., 2006; RAZMI et al., 2010) values that ranged from 11.9 to 33%. Thus, our work is in agreement with the diagnosis of *N. caninum*-associated abortions in dairy cattle from most parts of the world when indicate that 12 to 45% of aborted fetuses are infected with this protozoa (DUBEY, 2005).

From 42 dairy cows that aborted 52.4% were seropositive for *Neospora caninum*. Higher occurrence of antibodies were observed for Zhang et al. (2007), Kul et al. (2009), who found that 62.5% e 60% of cows that aborted or had reproductive disorder were seropositive for *N. caninum*, respectively. De Meerschman et al. (2002), Koiwai et al. (2005) and Yildiz et al. (2009) found lower value ranging from 6.3 to 28.6%. Dams greater than thirty-six months had higher chance to be serum positives, what is in accordance with Hornok et al. (2006) and Dubey et al. (2007), whose described that seropositivity may increase with age or number of gestation in beef and dairy cattle, suggesting that horizontal transmission is of particular importance in some herds.

From 31 sera of cows and their fetuses, 25.8% (8/31) were positives both, value higher than what was described by Santos et al. (2005), using indirect immunofluorescent antibody (IFI), they found 11.7% (4/34). All serum positive fetuses had theirs dams serum positives for *N. caninum* and the risk for this was more than 30 times when compared with negative cows. The absence of antibody for the parasite in the fetuses may not be conclusive of infection, because these fetuses might have been infected late in gestation, leaving insufficient time for antibody synthesis or develop a parasite-specific immune responses (DUBEY et al., 2007).

Dubey and Lindsay (1996) described that abortions by *N. caninum* may occur from 3 months of gestation to term. The average (\pm SD) of gestational age from abortions in the present work was 6.75 (\pm 1,2) months, ranging from 4 to 8 months, This is in agreement with De Meerschman et al. (2002) and Sager et al. (2001).

Three cows had their sera negative to *N. caninum*, however, their fetuses were positive when analyzed by PCR. Fluctuating of *N. caninum* antibody levels in natural infected cows were described previously (CONRAD et al., 1993; KYAW et al., 2005; DIJKSTRA et al., 2008; MARQUES et al., 2011; CARDOSO et al., 2012). The observation that some -infected dams can exhibit negative antibody values at any time during gestation, particularly *Neospora* at parturition or abortion was demonstrated by Nogareda et al. (2007). Paré et al. (1996) and Moré et al. (2008), in Argentina, reported that 8/170 (5%) and 1/33 (3%) of seronegative cows gave birth to seropositive calves, respectively. Conrad et al. (1993) described that caution must be taken in the interpretation of serologic results if they are to be used in strategies for the control of neosporosis in cattle.

In summary, the present study observed a high frequency of *N. caninum* in abortions from dairy cows from southern Brazil. Thus, our results are in agreement with others manuscripts that described *N. caninum* as an important agent of abortion in dairy cattle.

Table 3 – Results of ELISAs from dams compared with serology (ELISAs) and PCR from fetuses.

Variables	Positive (%)	Negative (%)	Total	P	OR	95% confidence limit
<i>Dams</i>		<i>Fetuses-Sera</i>				
<i>Positives</i>	8(57,2)	6	14(45,2)	0.0003 ¹		Not accurate
<i>Negatives</i>	0(0)	17	17(54,8)			
<i>Total</i>	8(25.8)	23(74.2)	31			
<i>Dams</i>		<i>Fetuses-PCR</i>				
<i>Positives</i>	12(75)	4(25)	16	0.0014 ²	16	2.4<OR<130
<i>Negatives</i>	3(15.8)	16(84,2)	19			
<i>Total</i>	15(42.8)	20(57,2)	35			

Font: author.

¹Fischer exact ²Chi-square by Yates corrected.

Table 4 – Demonstration of the association between the ages of cows, gestational period and the presence of antibodies for *Neospora caninum* from dairy cows that aborted.

Variables	Positive (%)	Negative (%)	Total	P	OR	95% confidence limit
<i>Age-cows (months)</i>						
24-36	01(9,1)	10(90,9)	11(26.2)	0.02	0.05	0.00<OR<0.46
>36	21(67,7)	10(32,3)	31(73.8)			
Total	22(52.4)	20(47.6)	42			
<i>Trimester of gestation</i>						
Second(4-6)	9(64.3)	5(35.7)	14(35)	1.26	2.70	0.58<OR<13.1
Third (>7)	10 (38.5)	15(61.5)	25(65)			
Total	19(47.5)	20(52.5)	39*			

Font: author.

¹Chi-square by Yates corrected. * Three cows did had their gestational age determined because fetuses were mummified.

Table 5 – The outcome of *Neospora caninum* infection in dairy cows (*Bos taurus*) and their aborted fetuses.

Cow N ^o	Breed	Age of cattle (months)	ELISA ¹		Age of fetus (months)	PCR		
			Cows	Aborted fetuses		Cows	Fetuses ²	
							Blood	Intrathoracic fluid
1	JER	> 48	2.23 / 1.53	ND	mum	-	ND	
2	HOL	> 48	0.4	ND	7	ND	ND	-
3	JER	36	0.27	ND	8	ND	ND	
4	HOL	33	0.12 / 0.09	ND	9	-	ND	-
5	HOL	> 48	2.52 / 2.01	ND	5	-	ND	+
6	JER	> 48	0.97 / 1.05	ND	6	ND	ND	-
7	HOL	24	0.0 / 0.07	0.01	8	ND	ND	+
8	HOL	25	0.13 / 0.23	0.01	8	ND	ND	+
9	JER	36	0.22 / 0.14	0.0	7	-	ND	-
10	HOL	> 48	2.07 / 0.18	ND	mum	-	ND	
11	JER	24	0.01	0.0	7	-	-	-
12	HOL	> 48	2.11 / 2.07	0.31	8	-	-	+
13	JER	> 48	1.9 / 2.15	3.11	7	-	ND	-
14	HOL	> 48	2.27 / 2.2	0.0	7	-	-	+
15	HOL	> 48	NR	0.0	7	ND	-	+
16	HOL	24	2.4 / 2.22	ND	mum	-	ND	
17	JER	> 48	2.3 / 1.96	1.91	7	-	ND	+
18	JER	> 48	2.05 / 1.09	0.0	6	-	ND	
19	JER	> 48	0.2 / 0.3	0.0	7	ND	-	-
20	HOL	24	0.1 / 0.12	0.0	7	-	ND	-
21	JER	> 48	2.01 / 1.95	3.02	7	-	ND	+
22	JER	> 48	0.29	0.0	8	-	-	-
23	JER	48	0.2 / 0.15	0.0	9	-	-	-
24	JER	>48	1.92	ND	4	-	ND	
25	JER	>48	0.36 / 0.19	0.0	6	-	-	+
26	JER	>48	1.98 / 1.73	ND	6	-	ND	-
27	HOL	>48	1.79 / 2.07	ND	4	-	ND	+
28	HOL	36	0.14 / 0.05	0.0	6	-	-	-
29	JER	>48	0.17 / 0.05	0.0	6	-	-	-
30	HOL	>48	2.6 / 2.33	0.04	6	-	-	+
31	HOL	>48	2.26 / 2	0.51	7	-	+	+
32	HOL	28	0.32 / 0.4	0.06	8	-	-	-
33	J/H	>48	0.11 / 0.21	0.06	5	-	-	-

34	HOL	>48	1.98 / 1.92	3.08	8	-	-	+
35	HOL	>48	0.21 / 0.16	0.0	7	-	-	-
36	NEL	>48	2.02	0.0	5	-	+	+
37	JER	>48	0.53 / 0.17	1.68	7	-	+	+
38	JER	>48	1.95	2.35	6	-		ND
39	JER	>48	2.3 / 2.13	0.03	7	-	-	-
40	JER	>48	0.16 / 0.18	0.0	6	-	-	-
41	HOL	>48	2.3 / 2.12	1.14	8	-	-	+
42	JER	>48	0.13 / 0.06	0.0	7	-	ND	-
43	JER	30	0.05 / 0.13	0.0	7	-	ND	-

Font: author.

¹Optical density from ELISA (Idexx) S/P \leq 0,50 (negative) and \geq 0,50 (positive). ² Mummified fetuses (mum) did not have their tissues and blood tested . ND = not done . - (negative). + (positive). JER (Jersey). HOL (Holstein). J/H (Jersey/Holstein). NEL (Nelore).

Table 6 – Association between the presence of antibodies for *Neospora caninum* in cows and fetuses, age of gestation, mean of OD, and PCR results.

Age of gestation (months)	Dams serum positive	Mean of OD Dam*	Fetuses serum positives	Mean of OD Fetuses	PCR positive
(4-5)	4/5 (80%)	1.67	0/2 (0%)	0	3/4 (75%)
(6-7)	12/24 (50%)	1.05	6/22 (27%)	2.09	8/23 (34%)
(8-9)	3/10 (30%)	0.77	2/8 (25%)	2.11	5/9(55%)
P value	0.18		0.4		0.3

Font: author.

*At age of abortion

References

Anderson ML, Andrianarivo AG, Conrad PA. Neosporosis in cattle. **Anim Reprod Sci.** 2000; 60-61: 417-431.

Cardoso JMS, Amaku M, Araújo AJUS, Gennari SM. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on three dairy farms in Brazil. **Vet Parasitol.** 2012; 187 (3-4): 553-557.

Conrad PA, Sverlow K, Andersom M, Rowe J, Bon Durant R, Tuter G, et al. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. **J Vet Diagn Invest.** 1993; 5: 572-578.

- Davison HC, Otter A, Trees AJ. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. **Int J Parasitol.** 1999; 29: 1683-1689.
- De Meerschman F, Speybroeck N, Berkvens D, Rettinger C, Focant C, Leclipteux T, et al. Fetal infection with *Neospora caninum* in dairy and beef cattle in Belgium. **Theriogenology.** 2002; 58: 933-945.
- Dijkstra T, Lam TJGM, Bartels CJM, Eysker M, Wouda W. Natural postnatal *Neospora caninum* infection in cattle can persist and lead to endogenous transplacental infection. **Vet Parasitol.** 2008; (152): 220-225.
- Dubey JP. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Korean J Parasitol.** 2003; 41(1): 1-16.
- Dubey JP. Neosporosis in Cattle. **Vet Clin Food Anim Pract.** 2005; 21: 473-483.
- Dubey JP, Lindsay DS. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Vet Parasitol.** 1996; 67: 1-59.
- Dubey JP, Schares, G. Neosporosis in animals – The last five years. **Vet Parasitol.** 2011; 180: 90-108.
- Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clin Microbiol Rev.** 2007; 20(2): 323-367.
- Dubey J. P.; Jenkins M.C.; Rajendram C.; Miska K.; Ferreira LR; Martins J; Kwok OCH; Choudhary, S. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *N. caninum*. **Veterinary Parasitology.** 2011; v. 181, p. 382-387.
- Gondim LFP, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Inter J Parasitol.** 2004; 34: 159-161.
- Haddad JPA, Dohoo IR, Vanleewen JA. A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle – a Canadian perspective. **Can Vet J.** 2005; 46: 230-243.
- Hall CA, Reichel MP, Ellis JT. Neospora abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. **Vet Parasitol.** 2005; 128: 231-241.
- Hornock S, Edelhofer R, Hajtós I. Seroprevalence of neosporosis in beef and dairy cattle breeds in northeast Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica.* **Vet Parasitol.** 2006; 54(4): 485-491.
- King JS, Slapeta J, Jenkins DJ, Al-Qassab SE, Ellis JT, Windsor PA. Australian dingoes are definitive host of *Neospora caninum*. **Inter J Parasitol.** 2010; 40: 945-950.
- Koiwai M, Hamaoka T, Haritani M, Shimizu S, Tsutsui T, Eto M., et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle with reproductive disorders in Japan. **Vet Parasitol.** 2005;130: 15-18.

Kyaw T, Suwimonteerabutr J, Virakul P, Lohachit C, Kalpravidh W. Seronegative conversion in four *Neospora caninum*-infected cows, with a low rate of transplacental transmission. **Vet Parasitol.** 2005; 131: 145-150.

Kul O, Kabakci, N, Yildiz K, Öcal N, Kalender H, İlkme N.A. *Neospora caninum* associated with epidemic abortions in dairy cattle: The first clinical neosporosis report in Turkey. **Vet Parasitol.** 2009; 159: 69-72.

Marques FAC, Headley AS, Figueredo-Pereira V, Taroda A, Barros LD, Cunha IAL, et al. *Neospora caninum*: evaluation of vertical transmission in slaughtered beef cows (*Bos indicus*). **Parasitol Res.** 2011; 108(4): 1015-1019.

McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM. **Inter J Parasitol.** 1998; 28: 1473-1478.

Medina L, Cruz-Vázquez C, Quezada T, Morales E, García-Vásquez Z. Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, Mexico. **Vet Parasitol.** 2005; 136: 187-191.

Moré G, Basso W, Bacigalupe D, Venturini MC, Venturini L. Diagnosis of *Sarcocystis cruzi*, *Neospora caninum*, and *Toxoplasma gondii* infections in cattle. **Parasitol Res.** 2008; 102: 671-675.

Müller N, Zimmermann V, Hentrich B, Gottstein B. Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* by PCR and DNA hybridization immunoassay. **J Clin Microbiol.** 1996; 34(11): 2850-2852.

Nogareda C, López-Gatius F, Santolaria P, García-Ispuerto I, Bech-Sàbat G, Pabón M, et al. Dinâmica de anticorpos anti- *Neospora caninum* durante a gestação em vacas leiteiras crónicamente infectadas. **Vet Parasitol.** 2007; 148: 193-199.

Ortega-Mora LM, Fernández-García A, Gómez-Bautista M. Diagnosis of bovine neosporosis: Recent advances and perspectives. **Acta Parasitol.** 2006; 51(1): 1-14.

Osoro K, Ortega-Mora LM, Martínez A, Serrano-Martínez E, Ferre I. Natural breeding with bulls experimentally infected with *Neospora caninum* failed to induce seroconversion in dams. **Theriogenology**, 2009; 71: 639-642.

Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. **Can J Vet Res.** 1996; 60: 133-139.

Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozalo A, Pérez-Pérez V, Espi-Felgueroso A, Álvarez-García G, Collantes-Fernández, et al. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. **Vet Parasitol**, 2003; 111: 143-152.

Razmi GR, Maleki M, Farzaneh N, Talebkhan GM, Fallah AH. First report of *Neospora caninum*-associated bovine abortion in Mashhad area, Iran. **Parasitol Res.** 2006; 100(4): 755-757.

- Razmi GR, Maleki M, Farzaneh N, Talebkhan GM, Fallah AH. A survey of *Neospora caninum*-associated bovine abortion in large dairy farms of Mashhad, Iran. **Parasitol Res.** 2010; 106(6): 1419-1423.
- Sager H, Fischer I, Furrer K, Strasser M, Waldvogel A, Boerlin P, et al. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. **Vet Parasitol.** 2001; 102: 1-15.
- Santos APE, Navarro IT, Freire RL, Vidotto O, Bracarense APFRL. *Neospora caninum* em vacas leiteiras no Estado do Paraná, Brasil: análise histológica e imunohistoquímica em fetos. **Semin: Ciênc Agrár.** 2005; 26(4): 559-562.
- Von Blumröder D, Schares G, Norton R, Williams DJL, Esteban-Redondo I, Wright S, et al. Comparison and standardization of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. **Vet Parasitol.** 2004; 120: 11-22.
- Wouda W, Moen AR, Schukken YH. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. **Theriogenology**, 1998; 49: 1311-1316.
- Yao L, Yang N, Liu Q, Wang M, Zhang W, Qian WF, et al. Detection of *Neospora caninum* in aborted bovine fetuses and dam blood samples by nested PCR and ELISA and seroprevalence in Beijing and Tianjin, China. **Parasitol.** 2009; 136(11): 1251–1256.
- Yildiz K, Kul O, Babur C, Kilic S, Gazyagci AN, Celebi B, et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle ranches with high abortion rate: Special emphasis to serologic co-existence with *Toxoplasma gondii*, *Brucella abortus* and *Listeria monocytogenes*. **Vet Parasitol.** 2009; 164: 306-309.
- Zhang W, Deng C, Lio J, Wang M, Tian KG, Yu XL, Hu DM. First identification of *Neospora caninum* infection in aborted bovine foetus in China. **Vet Parasitol.** 2007; 149(1-2): 72-76.

5 CONCLUSÕES

- Observou-se uma alta frequência de anticorpos contra *N. caninum* em vacas leiteiras no município de Presidente Getúlio, comprovando que este protozoário está amplamente disseminado em bovinos leiteiros na região estudada.

- A frequência de anticorpos em vacas que sofreram abortamento foi maior que a observada em animais destinados ao abate na mesma região.

- A transmissão vertical do parasita em vacas leiteiras foi relativamente baixa, porém a frequência de detecção do parasita em abortos, seja indireta ou diretamente foi alta.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Full Article

Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal, v. 22, n. 1, p. 1-5, jan.-mar. 2013
ISSN 0103-846X (impresso) / ISSN 1984-2961 (eletrônico)

Neospora caninum: evaluation of vertical transmission in slaughtered dairy cows (*Bos taurus*)

Neospora caninum: avaliação da transmissão vertical em vacas leiteiras (*Bos taurus*)

César Augusto Barbosa de Macedo¹; Madlaine Frigo Silveira Barbosa de Macedo¹; Sergio Tosi Cardim¹;
Milaine Cristiane Dantas Custódio Paiva²; Alessandra Taroda²; Luiz Daniel Barros²;
Ivo Alexandre Leme da Cunha²; Dauton Luiz Zulpo²; João Luis Garcia^{2*}

¹Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina, Presidente Getúlio, SC, Brasil

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, PR, Brasil

Received February 1, 2012

Accepted May 3, 2012

Abstract

Neospora caninum is a worldwide parasite recognized as one of the main parasites responsible for abortion in cattle. The objective of this study was to evaluate vertical transmission of *N. caninum* in dairy cows (*Bos taurus*) that were slaughtered at an abattoir in the state of Santa Catarina, southern Brazil. Blood samples (with and without EDTA) from 60 pregnant dairy cows and blood and tissue samples (brain, lung, heart and liver) from their fetuses were collected and used for PCR and serological evaluation. Blood samples from 60 non-pregnant cows were collected and used to detect antibodies. Anti-*N. caninum* Antibodies were detected by indirect ELISA. Antibodies against *N. caninum* were observed in 41.6% (25/60) of the pregnant cows and in 43.3% (26/60) of the non-pregnant cows. Antibodies against the parasite were detected in sera from three fetuses (5.5%). PCR analysis revealed that 3.3% (2/60) of the cows and 6.6% (4/60) of the fetuses evaluated were positive for specific *N. caninum* primers. These positive fetuses were between 4-6 months of age. Therefore, considering PCR and serological tests to be indicative of vertical transmission in fetuses, 11.6% (7/60) of the fetuses were infected by *N. caninum* during gestation.

Keywords: *Neospora caninum*, dairy cattle, vertical transmission, *Bos taurus*.

Resumo

Neospora caninum é um parasita de distribuição mundial reconhecido como um dentre os principais parasitas, responsável por abortamento em bovinos. O objetivo deste estudo foi avaliar a transmissão vertical de *N. caninum* em vacas leiteiras (*Bos taurus*) que foram submetidas ao abate em matadouro no Estado de Santa Catarina, sul do Brasil. Sangue (com e sem EDTA) de 60 vacas leiteiras prenhas e amostras de sangue e tecidos (cérebro, pulmão, coração e fígado) de seus fetos foram coletados e utilizados para PCR e avaliação sorológica. Amostras de sangue de 60 vacas não-gestantes foram obtidas e utilizadas para detecção de anticorpos. A detecção de anticorpos séricos anti-*N. caninum* foi avaliada pelo ELISA-teste indireto. Anticorpos anti-*N. caninum* foram observados em 41,6% (25/60) das vacas prenhas e em 43,3% (26/60) das vacas não-gestantes. Três fetos (5,5%) foram positivos para *N. caninum*. Análise pela PCR revelou que 3,3% (2/60) das vacas e 6,6% (4/60) dos fetos avaliados foram positivos para *N. caninum*. As idades dos fetos positivos eram de 4 a 6 meses. Portanto, considerando a PCR e a sorologia como indicativo de transmissão vertical em fetos, 11,6% (7/60) dos fetos foram infectados por *N. caninum* durante a gestação.

Palavras-chaves: *Neospora caninum*, vacas leiteiras, transmissão vertical, *Bos taurus*.

Introduction

Neospora caninum is a protozoan parasite that is distributed worldwide and is a major cause of abortion in cattle (DUBEY; SCHARES, 2006). Animals may be infected via three routes: ingestion of sporulated oocysts; transmission from dams to

fetuses (vertical); and through meat containing tissue cysts. Cattle, as herbivorous animals, are infected via the first and second routes. In dairy herds, transmission principally occurs vertically (SCHARES et al., 1998; BARTELS et al., 2007). Vertical transmission can occur throughout the gestation period; however, abortions are most prevalent at 3 to 6 months of pregnancy (DUBEY; SCHARES, 2006). However, female calves can be born infected without any sign of infection and can keep the parasite

*Corresponding author: João Luis Garcia
Universidade Estadual de Londrina – UEL, CP 6001, CEP 86050-970,
Londrina, PR, Brasil
e-mail: jlgarcia@uel.br

in their tissue while they are raised, such that when they become pregnant, they may transmit the parasite to their offspring. This type of transmission is known as endogenous transplacental infection (TREES; WILLIAMS, 2005).

Neosporosis has been described as an important cause of abortion in southern Brazil (CORBELLINI et al., 2001, 2002; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2001). Locatelli-Dittrich et al. (2001) reported that the abortion risk in *N. caninum*-seropositive dairy cows was four times higher than in seronegative dairy cows. Corbellini et al. (2002) used both histopathological and serum sample examination from bovine aborted fetuses, and described a high rate of occurrence of *N. caninum* as the cause of abortion throughout the state of Rio Grande do Sul.

Although several studies relating to neosporosis among dairy cattle have been conducted, the documentation of vertical transmission in Brazilian herds remains inadequate. Thus, the aim of the present study was to evaluate anti-*N. caninum* antibody occurrence in serum samples, and vertical transmission of *N. caninum* from dairy cows slaughtered at an abattoir located in the southern region of Brazil.

Materials and Methods

The 120 samples were obtained from pregnant and non-pregnant dairy cows (*Bos taurus*) and their respective fetuses at an abattoir located in the municipality of Presidente Getúlio, state of Santa Catarina, southern Brazil during 2010 year. The present study was approved by the Animal Ethics Committee of the State University of Londrina (N. 018/2009).

Antibodies against *N. caninum* were detected by means of the HerdCheck *Neospora caninum* Antibody Test Kit (Idexx Laboratories). Serum samples from the cows were diluted at the ratio of 1:100, and serum from fetuses at 1:25.

Blood samples with EDTA were collected individually in sterile tubes from the pregnant cows after they had been bled along the inspection line (during bleeding of the animals) and from their fetuses by means of cardiac puncture. The white blood cells were separated by centrifugation (550 g for 10 minutes), and were used for DNA extraction and subsequent PCR analyses. The uterus of the dams was obtained individually with the fetuses inside. Each uterine horn containing the fetuses was aseptically opened, the fetuses were taken out from the uterus, and organ material was collected on individual sterilized Petri plates. At the laboratory, approximately 10 g of tissue fragments (brain and myocardium) were collected from fetuses ≥ 3 months of age, while similar tissue fragments (10 g) for fetuses ≤ 2 months were pooled for DNA extraction. The tissue samples were homogenized with 10 mL of saline solution (0.14 M of NaCl), after which the homogenate was filtered, and 2 mL were used for DNA extraction.

The DNA extraction was performed using the DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN Sample & Assay Technologies, Brazil), following the manufacturer's recommendations. PCR analyses were performed as previously described (MARQUES et al., 2011). Amplification of *N. caninum* DNA was done by using the Np21 and Np6 primers (MULLER et al., 1996). The PCR cycle was performed on a mixture (final volume of 25 mL) containing 5 mL

of extracted DNA admixed with 20 mL of a solution containing 1.0 mM of each primer, 100 mM of dNTP (Invitrogen, Life Technologies, USA), 60 mM of Tris-HCl (pH 9.0), 15 mM of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.5 mM of MgCl_2 , and 0.5 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, USA). Amplification of parasitic genomic DNA was done over 35 cycles in a PTC-100 thermocycler (MJ-Research), using the following cycling conditions: 5 minutes at 94 °C, followed by 35 cycles of 30 seconds at 94 °C, 30 seconds at 65 °C and 60 seconds at 72 °C; the 35th cycle was followed by a final extension of 7 minutes at 72 °C. Aliquots from each PCR were viewed by means of electrophoresis on 2% agarose gel. For positive controls, DNA extracted from tachyzoites of the NC-1 strain ($10^6/\text{mL}$) of *N. caninum*, diluted in TE buffer, were used. The negative control consisted of commercially prepared water samples without *N. caninum*. One positive and one negative control was included in each assay.

All variables were analyzed by means of the chi-square test (χ^2), with Yates correction, using the Epi Info software (CDC, version 6.04b). *P*-values ≤ 0.05 were taken to be significant.

Results

The serological results for *N. caninum* are presented in Table 1. Out of a total of 120 cows, samples from 51 (42.5%) reacted positively to *N. caninum*. Positive seroreactivity to *N. caninum* occurred in samples from 41.6% (25/60) of the pregnant cows, while the positivity rate among non-pregnant animals was 43.3% (26/60); these values were not statistically different ($p = 1.0$). There was no statistical difference in relation to the breed of cattle (Table 1, $p = 1.0$). When the period of gestation was evaluated, there were no differences in the prevalence of *N. caninum* relative to the first (50%), second (35.7%) or third trimester (44.4%). Considering that almost all of the cows were more than four years old (116 animals), no comparisons regarding prevalence and proportionality with age were calculated.

The average optical density (OD) of the positive samples obtained from the pregnant animals was 1.64 ± 0.92 , compared with 1.82 ± 0.105 among their non-pregnant counterparts (Table 2). In relation to the period of gestation, the mean OD was 1.18 ± 0.89 for the first, 2.16 ± 0.90 for the second and 1.28 ± 0.83 for the

Table 1. Demonstration of the association between the variables studied and the presence of antibodies for *Neospora caninum* in slaughtered pregnant dairy cows (*Bos taurus*), in state of Santa Catarina, 2010.

Variables	Positive (%)	Negative (%)	Total (%)	<i>P</i>
<i>Neospora</i>				
Cows	25 (41.6)	35 (58.4)	60 (50)	1.0 ¹
Pregnant	26 (43.3)	34 (56.7)	60 (50)	
Non-pregnant	51 (42.5)	69 (57.5)	120 (100)	
Trimester of gestation				
First	7 (50.0)	7 (50.0)	14 (23.3)	
Second	10 (35.7)	18 (64.3)	28 (46.7)	0.87 ¹
Third	8 (44.4)	10 (55.6)	18 (30.0)	

¹Chi-square with Yates correction. % percentage.

Table 2. Outcomes regarding *Neospora caninum* infection in slaughtered pregnant dairy cows (*Bos taurus*) and their fetuses, in state of Santa Catarina, 2010.

Cow no.	ELISA ¹		Age of fetus (months)	PCR		
	Cow	Fetus		Cows Blood	Brain	Fetuses* Myocardium
2	2.18	N	4	-	-	-
13	1.83	NO	1	+	-	-
25	2.25	N	7	-	-	-
26	2.17	N	3	-	-	-
28	0.55	N	6	-	-	-
53	3.05	N	6	-	-	-
54	0.6	N	7	-	-	-
58	1.13	3.3	8	-	-	-
62	0.59	NO	1	-	-	-
64	2.48	N	5	-	-	-
74	N	N	6	-	-	+
78	2.7	N	5	-	-	-
79	2.48	N	3	-	-	-
85	2.7	N	5	-	-	-
87	N	N	7	-	+	-
91	0.73	N	8	-	-	-
92	2.54	N	4	-	-	-
95	N	NO	2	+	-	-
97	0.74	NO	2	-	-	-
105	2.02	N	7	-	-	-
111	N	N	3	-	+	-
113	0.62	N	7	-	-	-
116	N	3.12	5	-	-	-
119	N	N	8	-	-	-
121	0.574	N	3	-	-	-
124	0.50	N	4	-	-	-
125	2.7	3.3	7	-	-	-
126	2.16	N	6	-	-	-
130	2.7	N	5	-	-	-
131	0.55	N	7	-	-	+
133	0.55	N	3	-	-	-

¹Optical density from ELISA (I_{dexx}); N, negative; +, positive. *fetuses that were less than two months of age were macerated and evaluated using PCR. NO, not obtained.

third trimester ($p = 0.051$). Comparative analysis on the PCR and serological results revealed that one of the two cows that was PCR-positive was also serologically negative, while the other was seropositive (mean OD = 1.83). Only one (cow no. 131) out of the four cows that had positive fetuses in the PCR analysis was positive in the serological test (OD = 0.55). The serological test revealed three positive fetuses; however, one of the dams was negative in ELISA.

Sixty fetuses were collected for evaluation: 14 were in the first, 28 in the second and 18 in the third trimester of gestation. Additionally, six fetuses were less than two months of age, and serum samples were not obtained from these animals. Thus, 54 serum samples from the fetuses were evaluated, and three (5.5%) of these samples were serologically positive with high antibody titers (OD > 3.1).

During this study, vertical transmission was demonstrated in 11.6% (7/60) of the fetuses by means of PCR and serological tests.

Cerebral-derived DNA from the fetuses of cow no. 87 and cow N. 111 was positive in PCR analysis. Myocardial-derived DNA from the fetuses of cow no. 74 and cow no. 131 was positive in PCR reactions (Table 2). The DNA-derived blood samples from two cows (animal nos. 13 and 95) were PCR-positive, but only one animal (no. 26) had a corresponding serum titer (OD = 1.83). However, the fetuses of these animals were PCR-negative.

Discussion

In our study, we investigated vertical transmission of *N. caninum* in dairy cattle slaughtered in southern Brazil. The overall results demonstrated an *N. caninum* vertical transmission rate of 11.6% (7/60). Three fetuses (3/7) had antibodies that were detected by ELISA (high levels of antibodies) and were *N. caninum* DNA negative in their tissue samples. One dam was serologically negative, and two others had higher antibody titers. Conversely, the other

fetuses (4/7) were positive for the presence of *N. caninum* DNA in their tissues and were serologically negative, and their dams had low titers of antibodies (OD = 0.2 to 0.5). Fluctuations in the results similar to these have previously been described (McINNES et al., 2006; DIJKSTRA et al., 2008; MORÉ et al., 2009; YAO et al., 2009; MARQUES et al., 2011). McInnes et al. (2006) reported that there was no correlation between the serological tests on dams and the PCR on their fetuses, and a high percentage of infected fetuses had serologically negative dams. Moré et al. (2009) showed that transplacental infection in dairy cattle may occur when antibody titers are low in adult cows.

Cabral et al. (2009) used histology, immunohistochemistry and nested-PCR to evaluate 105 aborted fetuses that were sent to the Biological Institute of São Paulo, Brazil, and found a neosporosis rate of 24.8%. In addition, Corbellini et al. (2002) found that 23% of the aborted fetuses that they collected in Rio Grande do Sul, Brazil, were infected by *N. caninum*. The rate of vertical transmission of neosporosis may vary between cattle herds, and it can range from 4.0 to 100% (DUBEY; SCHARES, 2011).

Just three cows in the present study had positive blood samples in PCR, in spite of the relatively high prevalence of IgG anti-*N. caninum* in serum samples. Yao et al. (2009) reported that negative PCR results of blood samples did not exclude *N. caninum* infection, which corroborates the observation that few *N. caninum* are present in the blood of intermediate hosts. Additionally, Okeoma et al. (2005) observed greater variation in the concentration of *N. caninum* DNA in blood samples than in heifer brain samples, which indicated that this organ should be chosen for isolating DNA from the parasite.

Therefore, since seronegative dams generate congenitally infected fetuses, the presence or absence of antibodies for *N. caninum* possibly neither supports nor rules out vertical transmission. Yao et al. (2009) stated that seronegative abortion cases should be confirmed by means of PCR analysis on the fetus tissues. The mechanism for *Neospora* infection in seronegative dams might be explained in terms of: a) early-stage infection; b) the sensitivity of the serological assay (low antibody levels); or c) seronegative conversion in infected cows and immunotolerance of early in-utero infection (McINNES et al., 2006; WILLIAMS; TREES, 2006; YAO et al., 2009). Under natural conditions, most infections caused by *N. caninum* are "in utero", and parasite-induced reactions can be classified as self-infections (as are observed in some viral infections) without producing an immune response.

Previously, Marques et al. (2011) studied vertical transmission in zebu cattle in southern Brazil and found a rate of 4.8%, which is a lower rate than what was observed in the present study (11.6%). This phenomenon might represent the manifestation associated with each management system, i.e. the difference between having or not having access to infectious sources, nutritional differences and emphasis on production activity (such as milking or weaning), or the variability in the duration of time for which the animals are kept within breeding programs (MARQUES et al., 2011).

The prevalence of *N. caninum* among the cows in the present study was similar to what was described in some previous reports (RAGOZO et al., 2003; SARTOR et al., 2003; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2008; BENETTI et al., 2009), but was lower than in other studies (COSTA et al., 2001;

GUIMARÃES JUNIOR et al., 2004; MINERVINO et al., 2008; MUNHOZ et al., 2009; EIRAS et al., 2011). The prevalence of *N. caninum* in dairy cattle in Brazil was previously described as ranging from 15.1 to 91.2% (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2001; RAGOZO et al., 2003; GUIMARÃES JUNIOR et al., 2004; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2008). Therefore, caution is needed in evaluating the results from prevalence studies, since the differences in results might be directly related to the serological techniques used, the cutoff values, the sample size or the type (breed and/or species) of animal that is being investigated.

Locatelli-Dittrich et al. (2008) and Munhoz et al. (2009) in Brazil, Wang et al. (2010) and Xia et al. (2011) in China and Eiras et al. (2011) in Spain evaluated anti-*N. caninum* antibodies in dairy cattle by using ELISA (Idexx). These authors observed a seroprevalence range from 13.3 to 38.2%. Thus, the results obtained from these previous studies might be easier to compare with those from the present study.

In our study, it was difficult to precisely determine whether endogenous or exogenous transmission had higher or lower importance. We could speculate, considering that 5/6 of the *N. caninum*-positive fetuses had ≥ 5 months of gestation and were almost ready to be born, that endogenous transplacental infection could be considered to be a major infection source for fetuses, but further studies need to be performed to confirm this hypothesis. Bartels et al. (2007) described rates of 44.9% and 4.5%, respectively, for vertical and horizontal transmission in Dutch dairy herds.

We did not observe any statistical difference between seropositive pregnant (41.6%) and non-pregnant cows (43.3%) during this study. This finding could mean that natural immune suppression during the gestational period does not change the prevalence of antibodies against *N. caninum*. The events that occur during pregnancy and the influences of prenatal exposure to the parasite on the development of an immune response are critical issues (INNES et al., 2002) that have to be addressed if the associated mechanism is to be completely understood (WILLIAMS; TREES, 2006).

In conclusion, this study demonstrated a vertical transmission rate for *N. caninum* of 11.6% in naturally infected pregnant dairy cows in southern Brazil. Additionally, this study was the first description of the occurrence of anti-*N. caninum* antibodies in dairy cattle (42.5%) in the state of Santa Catarina.

Acknowledgements

J.L. Garcia is the recipient of a CNPq fellowship.

References

- Bartels CJM, Huinink I, Beiboer ML, Van Schaik G, Wouda W, Dijkstra T, et al. Quantification of vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* infection in Dutch dairy herds. *Vet Parasit* 2007; 148(2): 83-92. PMID:17640807. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.06.004>
- Benetti AH, Schein FB, Dos Santos TR, Toniollo GH, Da Costa AJ, Mineo JR, et al. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais da região Sudoeste do Estado de Mato

- Grosso. *Rev Bras Parasitol Vet* 2009; 18(S1): 29-33. PMID:20040187. <http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.018e1005>
- Cabral AD, Camargo CN, Galletti NTC, Okuda LH, Pituco EM, Fava CD. Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histology, immunohistochemistry, and nested-PCR. *Rev Bras Parasitol Vet* 2009; 18(4): 14-19. PMID:20040203. <http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01804003>
- Corbellini LG, Driemeier D, Mori AM, Traverso SD. Evaluation of *Neospora caninum*-associated abortion storm in a dairy herd in Santa Catarina, Brazil. *Rev Bras Reprod Animal* 2001; 25(2): 258-259.
- Corbellini LG, Driemeier D, Cruz CFE, Gondim LFP, Wald V. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Vet Parasitol* 2002; 103(3): 195-202. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00600-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00600-8)
- Costa GHN, Cabral DD, Varandas NP, Sobral EA, Borges FA, Castagnolli KC. Frequency of antibodies for *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle, São Paulo and Minas Gerais States. *Semina: Cienc Agrar* 2001; 22(1): 61-66.
- Dijkstra T, Lam TJGM, Bartels CJM, Eysker M, Wouda W. Natural postnatal *Neospora caninum* infection in cattle can persist and lead to endogenous transplacental infection. *Vet Parasitol* 2008; 152(3-4): 220-225. PMID:18280662. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.034>
- Dubey JP, Schares G. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet Parasitol* 2006; 140(1-2): 1-34. PMID:16730126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.035>
- Dubey JP, Schares G. Neosporosis in animals - The last five years. *Vet Parasitol* 2011; 180(1-2):90-108. PMID:21704458. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.031>
- Eiras C, Arnaiz I, Álvarez-García G, Ortega-Mora LM, Sanjuán ML, Yusc E, et al. *Neospora caninum* seroprevalence in dairy and beef cattle from the northwest region of Spain, Galicia. *Prev Vet Med* 2011; 98(2-3): 128-132. PMID:21145605. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.10.014>
- Guimarães Junior JS, Souza SLP, Bergamaschi DP, Gennari SM. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. *Vet Parasitol* 2004; 124(1-2): 1-8. PMID:15350656. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.002>
- Innes EA, Andrianarivo AG, Björkman C, Williams DJ, Conrad PA. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol* 2002; 18(11): 497-504. [http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02372-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02372-3)
- Locatelli-Dittrich R, Machado Junior PC, Fridlund-Plugge N, Richartz RRTB, Montiani-Ferreira F, Patrício LFL, et al. Determinação e correlação de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos e cães do Paraná, Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2008; 17(S1): 191-196. PMID:20059847.
- Locatelli-Dittrich R, Soccol VT, Richartz RRTB, Gasino-Joineau ME, Vinne R, Pinckney RD. Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in southern Brazil. *J Parasitol* 2001; 87(6): 1493-1494. PMID:11780849.
- Marques FAC, Headley SA, Figueredo-Pereira V, Taroda A, Barros LD, Cunha IAL, et al. *Neospora caninum*: evaluation of vertical transmission in slaughtered beef cows (*Bos indicus*). *Parasitol Res* 2011; 108(4): 1015-1019. PMID:21063729. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-2146-x>
- McInnes LM, Ryan UM, O'Handley R, Sager H, Forshaw D, Palmer DG. Diagnostic significance of *Neospora caninum* DNA detected by PCR in cattle serum. *Vet Parasitol* 2006; 142(3-4): 207-213. PMID:16934934. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.07.013>
- Minervino AHH, Ragozo AM, Monteiro RM, Ortolani EL, Gennari SM. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle from Santarém, Pará, Brazil. *Res Vet Sci* 2008; 84(2): 254-256. PMID:17619028. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.05.003>
- Moré G, Bacigalupe D, Basso W, Rambeaud M, Beltrame F, Ramirez B, et al. Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. *Vet Parasitol* 2009; 160(1-2): 51-54. PMID:19070964. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.081>
- Muller N, Zimmermann V, Hentrich B, Gottstein B. Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. *J Clin Microb* 1996; 34: 2850-2852.
- Munhoz AD, Pereira MJS, Flausino W, Lopes CWG. *Neospora caninum* seropositivity in cattle breeds in the South Fluminense Paraíba Valley, state of Rio de Janeiro. *Pesq Vet Bras* 2009; 29(1): 29-32. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2009000100004>
- Okeoma CM, Stowell KM, Williamson NB, Pomroy WE. *Neospora caninum*: Quantification of DNA in the blood of naturally infected aborted and pregnant cows using real-time PCR. *Exp Parasitol* 2005; 110(1):48-55. PMID:15804378. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2005.01.008>
- Ragozo AMA, Paula VSO, Souza SLP, Bergamaschi DP, Gennari SM. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis estados brasileiros. *Rev Bras Parasitol Vet* 2003; 12(1): 33-37.
- Sartor IF, Hasegawa MY, Canavessi AMO, Pinckney RD. Occurrence of *Neospora caninum* antibody in dairy cows assayed by ELISA and IFAT from Avaré county, SP. *Semina: Cienc Agrar* 2003; 24(1): 3-10.
- Schares G, Peters M, Wurm R, Bärwald A, Conraths FJ. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet Parasitol* 1998; 80(2): 87-98. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(98\)00195-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00195-2)
- Trees AJ, Williams DJL. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol* 2005; 21(12): 558-561. PMID:16223599. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2005.09.005>
- Xia HY, Zhou DH, Jia K, Zeng XB, Zhang DW, She LX, et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* Infection in Dairy Cattle of Southern China. *J Parasitol* 2011; 97(1): 172-173. PMID:21348632. <http://dx.doi.org/10.1645/GE-2643.1>
- Wang C, Wang Y, Zou X, Zhai Y, Gao J, Hou M, et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* Infection in Dairy Cattle in Northeastern China. *J Parasitol* 2010; 96(2): 451-452. PMID:19895158. <http://dx.doi.org/10.1645/GE-2310.1>
- Williams DJL, Trees AJ. Protecting babies: vaccine strategies to prevent foetopathy in *Neospora caninum*-infected cattle. *Parasite Immunol* 2006; 28(3): 61-67. PMID:16441503. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3024.2005.00809.x>
- Yao L, Yang N, Liu Q, Wang M, Zhang W, Qian WF, et al. Detection of *Neospora caninum* in aborted bovine fetuses and dam blood samples by nested PCR and ELISA and seroprevalence in Beijing and Tianjin, China. *Parasitology* 2009; 136(11): 1251-1256. PMID:19660160. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182009990813>

ANEXO

ANEXO A

Instruções aos Autores

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária
Brazilian Journal of Veterinary Parasitology

Apresentação

A Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária é um órgão oficial de divulgação do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária (CBPV). Tem como objetivo publicar temas relativos a Helmintos, Protozoários, Artrópodes e Rickettsias bem como assuntos correlatos. A revista tem periodicidade trimestral. São aceitas submissões de manuscritos, em inglês, de pesquisadores de qualquer país, associados ou não ao CBPV. Este periódico oferece a todos os pesquisadores acesso eletrônico livre para consulta de todos os trabalhos, desde seu primeiro volume publicado em 1992.

Política Editorial

Os artigos submetidos à Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária deverão caracterizar-se como científicos e originais, essencialmente sobre parasitas de animais em geral.

O(s) autor(res) deverá(ão) anexar uma carta, previamente assinada, responsabilizando-se pela originalidade do artigo, salvo resumo(s) apresentado(s) em eventos científicos, não submetidos à publicação em outros periódicos. Trabalhos com mais de uma autoria deverão seguir com uma declaração de concordância de todos os autores, referente à publicação. Trabalhos com número excessivo de autores deverão ser avaliados pelos editores científicos assistentes, em relação ao protocolo experimental. É necessária a colaboração substancial de todos os autores no planejamento do estudo, obtenção, análise e interpretação de resultados, confecção do artigo e aprovação da versão final submetida e aceita. Colaboradores que não tiveram participação ativa em todo o processo descrito acima poderão ser listados na seção de agradecimentos. Poderá haver agradecimento ao pesquisador que forneceu auxílio técnico, correção ou sugestão na escrita, ou ao chefe de departamento que proporcionou infraestrutura para elaboração do trabalho. O processo de avaliação do trabalho dependerá da observância das Normas Editoriais, dos Pareceres do Corpo Editorial e/ou do Relator *ad-hoc*. Nesse processo, o editor-chefe e os editores científicos assistentes poderão sugerir ou solicitar as modificações necessárias, apesar de ser de responsabilidade dos autores os conceitos emitidos. Os artigos submetidos serão avaliados por, no mínimo, 3 revisores anônimos, selecionados pelo editor-chefe e editores científicos assistentes. A Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária atribui a seus artigos as categorias de: Artigos Completos, Notas de Pesquisa e Artigos de Revisão, sendo este último escrito por especialistas e condicionado a solicitação por convite do editor-chefe. Revisões não solicitadas não serão aceitas, mas o tópico da revisão pode ser sugerido, previamente, ao editor-chefe ou editores científicos assistentes.

Taxa de tramitação:

Da submissão do artigo, será cobrada uma taxa de R\$ 40,00 (quarenta reais) referente ao processo de tramitação, paga através de depósito bancário: Banco do Brasil/ Agência: 0269-0/ Conta Corrente: 28.848-9 (RBPV).

Processo de avaliação pelos pares

O processo de avaliação do trabalho dependerá da observância das Normas Editoriais, dos Pareceres do Corpo Editorial e/ou do Relator *ad-hoc*. Os artigos submetidos serão avaliados por, no mínimo,

3 revisores anônimos, selecionados pelo editor-chefe e editores científicos assistentes.

O relator deverá preencher o formulário de avaliação da RBPV, disponível no sistema on-line de submissão (<http://submission.scielo.br/index.php/rbpv>). Tendo recebido a avaliação de pelo menos 2 dos revisores selecionados, o(s) autor(es) receberá os formulários de avaliação e possíveis correções feitas diretamente no texto. O avaliador poderá corrigir novamente o artigo, se necessário.

Com a aprovação dos relatores, o artigo passa por revisão do inglês, pelos revisores credenciados pela RBPV. Após diagramação e editoração, os editores científicos assistentes e a editora-chefe da revista, fazem as correções finais.

Transferência de direitos autorais:

Ao ser submetido, o artigo deve vir acompanhado de um ofício, assinado por todos os autores, concordando com a submissão e, caso aprovado, a publicação do artigo apenas na RBPV.

Ética

Experimentos que utilizam animais deverão ser conduzidos obedecendo às normas aprovadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (<http://www.cobea.org.br>), devendo os autores apresentarem o número de protocolo de submissão e aprovação dos trabalhos em Comissão de Ética e Bem-Estar Animal.

Apresentação dos Manuscritos

Na elaboração do texto serão observadas as seguintes normas:

Os trabalhos devem ser submetidos em inglês, de forma concisa, com linguagem impessoal e com os sinais de chamadas de rodapé em números arábicos, lançados ao pé da página em que estiver o respectivo número e em ordem crescente. Os trabalhos deverão ser apresentados em fonte "Times New Roman", tamanho 12, com margem superior e inferior de 2,5 cm, esquerda e direita com 3 cm e espaçamento entre linhas de 1,5 cm com as páginas numeradas. Para a categoria Artigo Completo, o trabalho não deverá exceder 15 páginas, quando da diagramação final. Para a categoria Notas de Pesquisa, o trabalho não deverá exceder 5 páginas, quando da diagramação final. As tabelas e ilustrações deverão ser apresentadas separadas do texto e anexadas ao final do trabalho, sem legendas. As respectivas legendas deverão vir no texto logo após as referências bibliográficas. Ao submeter o artigo, anexar o comprovante de depósito, via endereço eletrônico: <http://www.scielo.br/rbpv>. Os trabalhos aceitos deverão ser revisados por um dos revisores de língua inglesa credenciados pela RBPV, de escolha e sob responsabilidade dos autores. Os Artigos Completos devem ser organizados obedecendo à seguinte sequência: **Título Original, Título Traduzido, Autor(es), Filiação Institucional, Abstract (Keywords), Resumo (Palavras-chave), Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões** (ou combinação destes três últimos), **Agradecimentos** (facultativo) e **Referências Bibliográficas**. As Notas de Pesquisa obedecem à sequência acima sem a necessidade de se destacar os tópicos, sendo escritas em texto corrido. Para essa categoria, o artigo submetido deve possuir alto grau de ineditismo e originalidade, trazendo resultados novos de importância evidente.

Características dos elementos de um trabalho científico

Título Original

O título “cheio” e o subtítulo (se houver) não devem exceder 15 palavras. Não deverá aparecer nenhuma abreviatura, e os nomes de espécies ou palavras em latim deverão vir em itálico. Evitar (por exemplo) títulos que iniciem com: Estudos preliminares; Observações sobre. Não usar o nome do autor e data de citação em nomes científicos.

Autor(es)/Filiação

Na identificação, deve constar: nome completo e por extenso de todos os autores (sem abreviação). A Filiação Institucional deve informar os nomes próprios de todas as instituições e não suas traduções: Laboratório, Departamento, Faculdade ou Escola, Instituto, Universidade, Cidade, Estado e País, exatamente nessa ordem. No rodapé, deve constar as informações do autor para correspondência: Endereço completo, telefone e e-mail atualizado, nessa ordem.

Referências Bibliográficas

As referências bibliográficas só serão admitidas desde que sejam de fácil consulta aos leitores. Não serão aceitas referências de trabalhos publicados em anais de congressos e as teses devem estar disponíveis para consulta em sites oficiais, por exemplo, Banco de Teses da Capes: <http://www.capes.gov.br/servicos/banco-de-teses>. Todas as citações no texto devem ser cuidadosamente checadas em relação aos nomes dos autores e datas, exatamente como aparecem nas referências.

“Abstract” e Resumo

Devem conter no máximo 200 palavras, em um só parágrafo sem deslocamento. Não devem conter citações bibliográficas. Siglas e abreviações de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso, por exemplo, Indirect Fluorescence Assay (IFA). Devem ser informativos, apresentando o objetivo do trabalho, metodologia sucinta, os resultados mais relevantes e a conclusão. O abstract redigido em língua inglesa e o resumo em língua portuguesa, ambos seguidos por keywords e palavras-chave, respectivamente.

Keywords e Palavras-chave

As palavras-chave devem expressar com precisão o conteúdo do trabalho. São limitadas em no máximo 6 (seis).

Introdução

Explicação clara e objetiva do estudo, da qual devem constar a relevância e objetivos do trabalho, restringindo as citações ao necessário.

Material e Métodos

Descrição concisa, sem omitir o essencial para a compreensão e reprodução do trabalho. Métodos e técnicas já estabelecidos devem ser apenas citados e referenciados. Métodos estatísticos devem ser explicados ao final dessa seção.

Resultados

O conteúdo deve ser informativo e não interpretativo: sempre que necessário devem ser acompanhados de tabelas, figuras ou outras ilustrações autoexplicativas.

Discussão

Deve ser limitada aos resultados obtidos no trabalho e o conteúdo deve ser interpretativo. Poderá ser apresentada como um elemento do

texto ou juntamente aos resultados e conclusão. Enfatizar a importância de novos achados e novas hipóteses identificadas claramente com os resultados.

Tabelas

Elaboradas apenas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e no final; e devem ser enviadas em formato editável (desejável excel). A legenda (título) é precedida da palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismos arábicos, devendo ser descritivas, concisas e inseridas acima das mesmas. As tabelas devem estar limitadas a um número mínimo necessário. Devem ser digitadas em espaço duplo em arquivos separados.

Figuras

As figuras, tais como: desenho, fotografia, prancha, gráfico, fluxograma e esquema, devem ser enviadas em formato .tif, .gif ou .jpg, com no mínimo de 300 dpi de resolução e numeradas consecutivamente. As legendas devem ser precedidas da palavra Figura, seguida da numeração em algarismo arábico e inseridas abaixo das mesmas. Listar as legendas numeradas com os respectivos símbolos e convenções, em folha separada em espaço duplo. O número de ilustrações deve ser restrito ao mínimo necessário. Fotografias digitais deverão ser enviadas em arquivos separados, como foram obtidas. Se a escala for dada às figuras, utilizar a escala BAR em todas as ilustrações ao invés de numérica, que pode ser alterada com a redução das figuras.

Conclusões

As conclusões podem estar inseridas na discussão ou em resultados e discussão, conforme a escolha dos autores. Nesse caso, esse item não será necessário.

Agradecimentos

Quando necessário, limitados ao indispensável.

Referências Bibliográficas

A lista de referências deverá ser apresentada em ordem alfabética e, posteriormente, ordenadas em ordem cronológica, se necessário. Mais de uma referência do(s) mesmo(s) autor(es) no mesmo ano deve ser identificada pelas letras “a”, “b”, “c”, etc, inseridas após o ano de publicação. Títulos de periódicos devem ser abreviados conforme Index Medicus - <http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng>.

Livros

Levine JD. *Veterinary protozoology*. Ames: ISU Press; 1985.

Capítulo de livro

Menzies PI. Abortion in sheep: diagnosis and control. In: Youngquist RS, Threlfall WR. *Current therapy in large animal theriogenology*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 2007. p. 667-680.

Artigo de periódico

Paim F, Souza AP, Bellato V, Sartor AA. Selective control of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* in fipronil-treated cattle raised on natural pastures in Lages, State of Santa Catarina, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20(1): 13-16.

Tese e Dissertação

Araujo MM. *Aspectos ecológicos dos helmintos gastrintestinais de caprinos do município de patos, Paraíba - Brasil* [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2002.

Documento eletrônico

Centers for Disease Control and Prevention. *Epi Info* [online]. 2002 [cited 2003 Jan 10]. Available from: <http://www.cdc.gov/epiinfo/ei2002.htm>.

Obs. Nas referências, apresentar os nomes dos seis primeiros autores; para referências com mais de seis autores, apresentar os seis primeiros nomes seguidos da expressão et al.

Citações

As citações devem seguir o sistema autor-data:

Um autor: nome do autor e ano de publicação

Levine (1985) ou (LEVINE, 1985)

Dois autores: os nomes dos autores e ano da publicação

Paim e Souza (2011) ou (PAIM; SOUZA, 2011)

Três ou mais autores: nome do primeiro autor seguido de “et al.” e o ano de publicação

Araújo et al. (2002) ou (ARAÚJO et al., 2002)

Prova Gráfica

O trabalho diagramado em formato pdf., será enviado por e-mail ao autor correspondente. Alterações no artigo, quando aceitas para publicação, devem ser realizadas nesse estágio, com permissão do editor-chefe. Portanto, o trabalho deve ser cuidadosamente corrigido antes de responder ao editor, pois inclusões de correções subsequentes (indicação de novo autor, mudança de parágrafos inteiros ou tabelas) não podem ser garantidas.