



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

EUDES ESTEVES DO NASCIMENTO

**OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS,  
AVALIAÇÃO DA TAXA DE TRANSMISSÃO VERTICAL E  
PARASITEMIA do *Neospora caninum* EM FÊMEAS DA RAÇA  
NELORE (*Bos indicus*)**

**EUDES ESTEVES DO NASCIMENTO**

**OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS,  
AVALIAÇÃO DA TAXA DE TRANSMISSÃO VERTICAL E  
PARASITEMIA do *Neospora caninum* EM FÊMEAS DA RAÇA  
NELORE (*Bos indicus*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal da Universidade Estadual de  
Londrina como requisito parcial para a obtenção do  
título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia.

Londrina  
2015

**Catlogação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

N244o Nascimento, Eudes Esteves do.  
Ocorrência de anticorpos, avaliação da taxa de transmissão vertical e parasitemia do *Neospora caninum* em fêmeas da raça Nelore (*Bos indicus*) / Eudes Esteves do Nascimento. – Londrina, 2015.  
40 f.

Orientador: João Luis Garcia.  
Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2015.  
Inclui bibliografia.

1. Bovino de corte – Doenças – Teses. 2. Neosporose bovina – Teses. 3. Bovino – Gestação – Teses. 4. Nelore (Zebu) – Teses. 5. 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

EUDES ESTEVES DO NASCIMENTO

**OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS,  
AVALIAÇÃO DA TAXA DE TRANSMISSÃO VERTICAL E  
PARASITEMIA do *Neospora caninum* EM FÊMEAS DA RAÇA  
NELORE (*Bos indicus*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal da Universidade Estadual de  
Londrina como requisito parcial para a obtenção do  
título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Ademir Benedito da Luz Pereira  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Wilmar Sachetim Marçal  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Odilon Vidotto  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Alexey Leon Gomel Bogado  
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Londrina, 30 de Março de 2015.

DEDICO, COM AMOR

A minha esposa Maria da Penha,  
aos meus filhos Janaína, Thiago, Matheus e Jeovana.

Aos meus pais, Joaquim (in memoriam) e Alice.

Ao meus irmãos, Eny, Hélio e Edson.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, nosso Pai criador, que me proporcionou muita saúde, disposição, determinação e uma grande paixão pela profissão de Médico Veterinário.

A minha esposa Maria da Penha, aos meus filhos, Janaína, Thiago, Matheus e Jeovana, pelo amor, carinho, paciência, compreensão e a presença em todos os momentos e, maior parte do tempo pelo meu silêncio e a minha ausência, no dia a dia, durante a confecção desta dissertação.

Ao professor Dr. João Luis, em especial, meu orientador, amigo, colega, que me acolheu, pelos seus ensinamentos, com carinho, paciência, sugestões, respeito e consideração.

Aos colegas de pós-graduação, Beatriz em especial e também Alessandra, Sérgio, Mércia, Daniel, Ivo, Dauton, Elizabete, funcionários, Helenice, estagiários, demais colegas que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho, pela amizade e agradável convivência durante este período da minha vida.

Aos professores, Doutores Odilon, José Guimarães, Ademir, Amauri e, todos os demais, que me apoiaram e acreditaram em mim e neste projeto.

Aos proprietários da Fazenda Das Minas Dr. Antonio José Francovig e Júnior, funcionários Wladimir e Alexandre pela colaboração, habilidade e colheita do material.

A Universidade Estadual de Londrina e o Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, por ter-me proporcionado realizar esta tese.

Muito Obrigado a todos!

NASCIMENTO, Eudes Esteves do. **Ocorrência de anticorpos, avaliação da taxa de transmissão vertical e parasitemia do *Neospora caninum* em fêmeas da Raça Nelore (*Bos indicus*)**. 46 páginas. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015..

## RESUMO

O *Neospora caninum* é considerado um protozoário, que atua como agente primário na ocorrência de abortamentos em bovinos, sendo considerado o principal agente desta patologia, principalmente em fêmeas de corte, em todo o mundo. O presente estudo teve como objetivo determinar a prevalência de anticorpos, transmissão vertical, bem como a parasitemia do *N. caninum* em fêmeas de corte da raça Nelore (*Bos indicus*) em diferentes fases da gestação infectadas naturalmente, na região norte do Estado do Paraná, Brasil. Setenta e seis fêmeas gestantes de quatro propriedades (A=22, B=15, C=22, D=17) foram acompanhadas durante a gestação. Amostras de sangue com e sem EDTA foram colhidas, no primeiro trimestre, segundo, e terceiro trimestre de gestação, e as amostras de sangue de 31 recém-natos foram colhidas antes da ingestão do colostro. Do total de 76 fêmeas, 23 (30,3%) foram detectadas anticorpos contra *N. caninum*, amostras analisadas pela técnica indireta ELISA (Idexx), e 53 (69,7%) animais negativos. Treze vacas iniciaram o experimento negativas para *N. caninum* e 11 se tornaram positivas no segundo e terceiro trimestre de gestação, desta forma, a incidência da infecção foi de 17,2% (11/64). OD de ELISA, foi alto (OD=2,08) no segundo terço quando comparado com o primeiro (OD=1,81), entretanto, não houve diferença estatística (P=0,45). A transmissão vertical foi calculada como sendo de 29,0% (9/31), e o risco da transmissão vertical do *N. caninum* em fêmeas com DO>1,0 foi 12,5 vezes mais elevada do que nas fêmeas com títulos mais baixos (OR = 12,5; 1,34 < OR < 150,77, P=0,012). Em conclusão, no presente estudo, a taxa de transmissão vertical do *N. caninum* em vacas de corte zebuínas foi de 29%, e o risco foi 26,25 maior em vacas com altos títulos de anticorpos. Com o objetivo de avaliar a parasitemia do *N. caninum*, 55 vacas nelores foram acompanhadas durante a gestação e amostras de sangue com e sem EDTA foram obtidas para a realização da PCR e da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), respectivamente, durante o primeiro, segundo e terceiro trimestres de gestação. Animais com títulos  $\geq 100$  foram considerados positivos. Amostras de sangue e soro dos 55 bezerros provenientes das vacas foram colhidas antes da mamada do colostro para a realização da RIFI e PCR. A Prevalência total das vacas foi de 34,5% (19/55) e para os bezerros foi de 7,3% (4/55). A PCR revelou três vacas positivas (5,4%) todas no primeiro trimestre de gestação, e soropositivas na RIFI. Três bezerros positivos (5,4%) na PCR que apresentaram sorologia negativa, foram oriundos de vacas também soronegativas. O presente estudo mostrou uma parasitemia mais prevalente no primeiro trimestre de gestação em vacas nelore. No entanto, os resultados da PCR nos bezerros podem estar evidenciando tanto uma infecção precoce antes dos três meses de gestação (animais permanentemente infectados, PI) ou uma infecção tardia de gestação sem tempo dos bezerros montarem uma resposta imune humoral. Outros estudos devem ser realizados para um melhor entendimento da epidemiologia da neosporose durante a gestação em vacas de corte;

Palavra-chave: *N. caninum*; Bovinos de corte; Prevalência; Transmissão vertical.

NASCIMENTO, Eudes Esteves do. **Serum Occurrence of *Neospora caninum* and Vertical Transmission in zebu beef cattle (*Bos indicus*)**. 2014. 47 pages. Thesis (Doctor's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

## ABSTRACT

*Neospora caninum* is considered a first agent protozoan of abortions in bovines, it's considered the main agent of this pathology, especially in beef cows, worldwide. This study aimed to determine the prevalence of antibodies, the vertical transmission, in zebu Nelore beef cows (*Bos indicus*), naturally infected, in different stages of gestation, in the Northern of Paraná State, Brazil. Seventy six pregnant cows from four farms (A=22, B=15, C=22, D=17) were accomplished during gestation. Blood with and without EDTA were collected from cows at first, second, and third trimester of gestation, and a blood sample was collected from 31 calves before colostrum milking. From 76 cows 32 (42.1%) had anti-*N. caninum* antibodies detected by indirect ELISA (Idexx), and 44 (57.9%) did not. Thirty cows begun the experiment negative to *N. caninum* and become positive either second or third trimester of gestation, this mean an infection incidence of 17.1% (13/76). OD from ELISA was higher (OD=2.23) in second when compared with first (OD=1.67) and third (OD=1.97) trimester of pregnancy. The vertical transmission was calculated to be 29.0% (9/31), and the risk of vertical transmission of *N. caninum* in dams with OD > 1.0 was 12.5 times higher than lower titers (OR=12.5, 1.34<OR<150.77, P=0.012). In conclusion, in the present study the rate of vertical transmission of *N. caninum* in zebu beef pregnant cows was 29%, and this risk was higher in dams with high titers of antibodies. In the second experiment, the initial total prevalence of the farm was 23.2% (23) positive and 76.7% (76) negative, from a total of 99 samples (100%). The samples were analysed for detection of antibodies through their direct fluorescent antibody test for *N. caninum*, and there was obtained the following results 23 (23.2%) animals were positive and 76 (76.7%) were negative. At , a total of 55 animals were evaluated and divided into two groups, group 1 (27) and group 2 (28), during the three-thirds of gestation and the Day of delivery. From the 27 (27/55) animals of group 1, 21 (77.8%) showed to be negative in the first trimester of gestation, in these second trimester, third trimester and the day of delivery 3.7% (1/27) positive, respectively. In group 2, 16 (57%) showed negative result; in these second trimester 10.7% (3/28), in the third trimester 3.6% (1/28) and the Day of delivery 3.6% (1/28). The calves of group 1 scored 11.1% (3/21) and the calves of group 2, 3.6% (1/16).

**Keywords:** *N. caninum*; beef cattle; prevalence; vertical transmission.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>10</b>
2.1 ESTRUTURA E CICLO DE VIDA .....	11
2.2 PREVALÊNCIA EM BOVINOS .....	13
2.3 TRANSMISSÃO VERTICAL .....	14
2.4 TRANSMISSÃO HORIZONTAL .....	15
2.5 ABORTAMENTO E ASPECTOS REPRODUTIVOS .....	15
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>17</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>4 ARTIGO 1 - PUBLICADO</b> .....	<b>21</b>
Serum occurrence and vertical transmission rate of <i>Neospora caninum</i> in zebu beef pregnant cows ( <i>Bos indicus</i> )	
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>21</b>
<b>1 INTRODUCTION</b> .....	<b>22</b>
<b>2 MATERIAL AND METHODS</b> .....	<b>23</b>
2.1 STUDY AND SAMPLING .....	23
2.2 ANTI-NEOSPORA CANINUM AND BODY .....	23
2.3 STATISTICAL ANALYSIS .....	23
<b>3 RESULTS</b> .....	<b>23</b>
3.1 SEROPREVALENCE OF N. CANINUM .....	24
<b>4 DISCUSSION</b> .....	<b>25</b>
<b>ACKNOWLEDGEMENT</b> .....	<b>27</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>28</b>

<b>5 ARTIGO 2 – PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	21
Ocorrência de Anticorpos de <i>Neospora caninum</i> e avaliação da taxa de transmissão vertical em fêmeas bovinas da Raça Nelore ( <i>Bos indicus</i> )	
RESUMO .....	32
ABSTRACT .....	32
1 INTRODUÇÃO.....	33
2 JUSTIFICATIVA .....	36
3 OBJETIVOS .....	36
3.1 OBJETIVO GERAL .....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	37
4.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS E TRATAMENTOS.....	37
4.2 COLHEITA DE MATERIAL .....	38
4.3 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA - RIFI .....	38
4.4 NESTED PCR PARA DETECÇÃO DE <i>NEOSPORA CANINUM</i> .....	40
4.5 qPCR PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE IFN- $\gamma$ E INTERLEUCINA 10 (IL-10).....	40
5 RESULTADOS.....	41
PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>NEOSPORA CANINUM</i> .....	41
AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS DE ACORDO COM O PERÍODO DE GESTAÇÃO E APÓS O NASCIMENTO DO BEZERRO .....	41
6 CONCLUSÃO .....	42
REFERÊNCIAS.....	43
 <b>6 CONCLUSÃO GERAL</b> .....	 46

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo, suplantado apenas pela Índia (SILVA, 2013). A partir de 2004, passou a ocupar a posição de maior exportador de carne bovina no ranking mundial. Nos últimos 20 anos a produção brasileira de carne bovina cresceu 64,75% (USDA), com um rebanho de 211,279 milhões de cabeças de bovinos (IBGE, 2012) e produzindo cerca de 10 milhões de toneladas de carne/ano.

Esse aumento na produtividade brasileira está diretamente relacionado aos avanços tecnológicos nas áreas de manejo nutricional, sanitário, reprodutivo, bem-estar animal e no melhoramento genético, buscando os melhores resultados na eficiência reprodutiva e produtiva dos rebanhos bovinos de corte. No Brasil, cerca de 80% do rebanho é composto de animais de raças zebuínas, rústicos e de fácil adaptação ao ambiente de clima tropical. Entre essas raças, podemos destacar a Raça Nelore, que compõe 90%.

O Brasil se manteve na liderança do mercado de carne bovina mundial, ao bater novo recorde de exportações para o primeiro semestre de 2013, atingindo um faturamento de US\$3,404 bilhões e volume negociado de 762 mil toneladas, sendo o maior faturamento da história já registrado em um primeiro semestre. Os números são 13,3% (faturamento) e 12,7% (volume) superiores aos registrados no mesmo período do ano passado. (ABIEC, 2014).

Desta forma, doenças de ordem reprodutiva, como é o caso da *neosporose*, uma das principais etiologias de abortamentos em bovinos no mundo, preocupa devido as perdas econômicas causadas nesse rebanho. Embora não existam dados econômicos dessas perdas no Brasil, em outros países essas perdas foram descritas na ordem de 25 a 85 milhões de dólares/ano (DUBBEY, 1999; HERNANDEZ et al., 2001).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

*Neospora caninum* é considerado um protozoário apicomplexa intracelular obrigatório, causador da neosporose, e foi descrito pela primeira vez em filhotes caninos que apresentavam um quadro clínico compatível com distúrbios neurológicos (BJERKAS et al., 1984), sendo responsável também por quadros de encefalomielite e miosite em cães jovens, na metade de 1980 (BJERKAS, et al. ; 1984), sendo inicialmente descrita como *Toxoplasma gondi-like* foi, posteriormente, caracterizado e denominado *Neospora caninum* (DUBBEY et al., 1988).

A neosporose é uma doença emergente e considerada a principal causa de abortamentos em bovinos, em diversos países (DUBBEY et al., 2007). Apesar de relatos apontarem maior ocorrência em canídeos e bovinos, outros animais silvestres e domésticos podem estar expostos ao *N. caninum* (DUBEY e SCHARES, 2011) Cavalos, cabras, búfalos, ovelhas, camelos e cervos são classificados como hospedeiros intermediários (DUBEY et al.,;DUBEY e LINDSAY, 1996).

Anticorpos contra este parasita também foram detectados em outros animais, como: búfalos, raposas, camelos, pássaros (pardal) por GONDIN et al., 2010., galinhas (*Gallus domesticus*) por COSTA et al., 2008 e MARTINS et al., 2011)., a capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), animal de hábitos roedores, pesquisado no 2009., Áustria e República tcheca, por BÁRTOVÁ et al., 2010b, coelho (Brasil, por TRUPPEL et al., 2010., lebre (*Lepus europaeus*), no Egito, por IBRAHIM et al.,*Oryctolagus cuniculus*), na Ucrânia, por HUGLES et al.,2008. Dois outros canídeos, o coiote (*Canis latrans*) e o dingo australiano (*Canis lupus dingo*), foram identificados, experimentalmente, como hospedeiros definitivos (GONDIN et al., 2004<sup>a</sup>; KING et al., 2010). Estes autores isolaram nas fezes do lobo cinza (*Canis lupus*), infectados naturalmente, oocistos de *N. caninum*, confirmando aqui, mais um hospedeiro definitivo.

A neosporose bovina está amplamente distribuída em vários países do mundo, sendo relatada na Europa, Escandinávia, África, Austrália, Nova Zelândia e Américas (DUBEY, 1999). No Brasil, a primeira descrição de *N. caninum* em feto bovino abortado foi realizada por Gondin et. al., 1999, 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.

A maioria dos relatos sobre neosporoses, em especial a transmissão vertical, foi registrado em bovinos de leite e nos últimos catorze anos as pesquisas voltadas ao rebanho bovino de corte, vem despertando um interesse maior, em virtude de um comprometimento de grande risco potencial para esse tipo de exploração.

## 2.1 MORFOLOGIA E CICLO DE VIDA

*N. caninum* é um parasita coccídeo com um grande número de hospedeiros e o seu ciclo de vida está dividido em três estágios: taquizoítos, cistos teciduais e oocistos. (DUBEY et al., 1996). Os taquizoítos apresentam forma oval, lunar ou globular, medem 3-7 x 1-5  $\mu\text{m}$  e se dividem por endodiogénia. 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 nas células por invasão ativa e se localizam no citoplasma das mesmas formando um vacúolo parasitóforo (DUBEY E 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  $\mu\text{m}$  e um comprimento de até 107  $\mu\text{m}$ . No interior destes cistos encontramos os bradizoítos, que são estruturas alongadas e que medem 8 x 2  $\mu\text{m}$  (DUBEY E LINDSAY, 1996; DUBEY et al., 2002; DUBEY et al., 2007).

Já os oocistos são estruturas resistentes ao meio ambiente, medem aproximadamente 11,7 x 11,3  $\mu\text{m}$  e são eliminados não esporulados pelas fezes dos hospedeiros definitivos. No seu interior encontramos dois esporocistos (8,4 x 6,1  $\mu\text{m}$ ), os quais contêm quatro esporozoítos que são alongados, medindo 6,5 x 2,0  $\mu\text{m}$  (DUBEY et al., 2002).

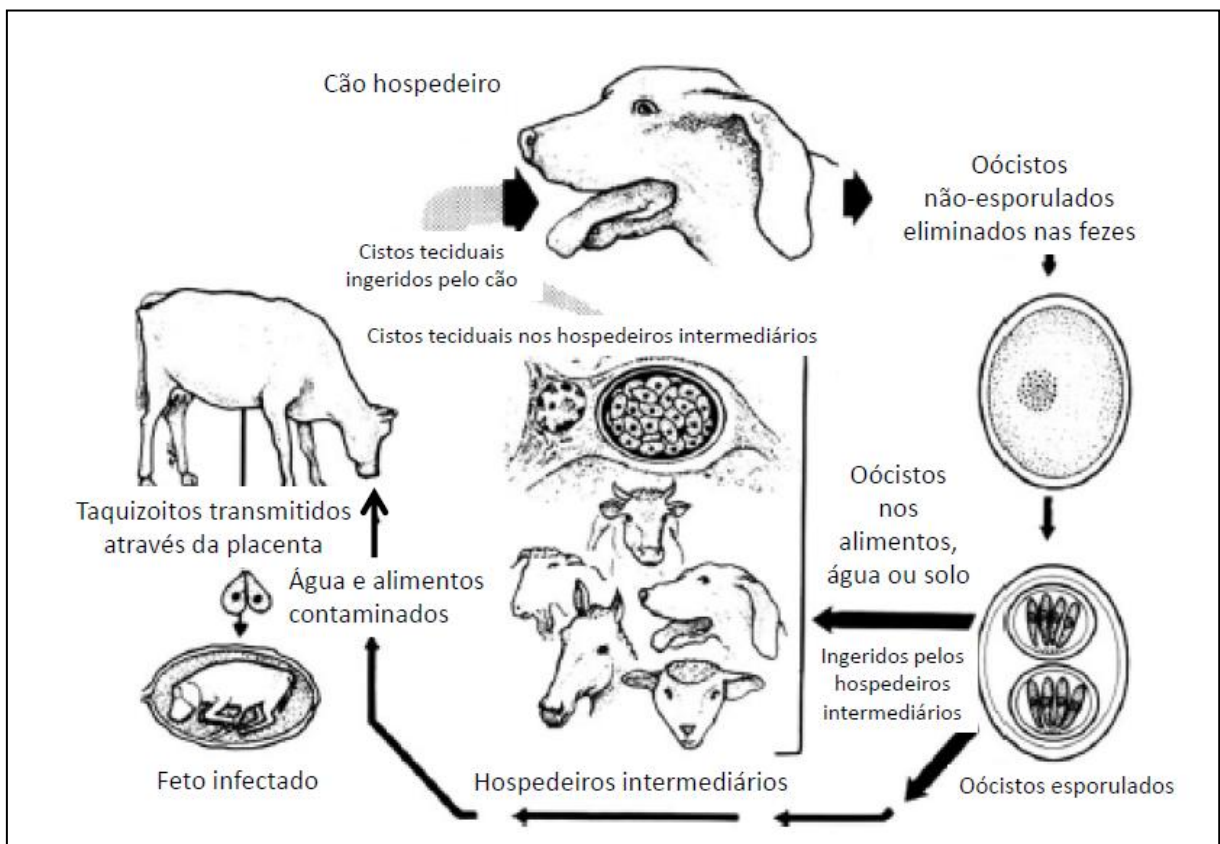
Estes oocistos vão esporular após 24,0 horas, a sua eliminação, entretanto, não se tem conhecimento da sobrevivência destes oocistos no meio ambiente (DUBEY E LINDSAY, 1996; DUBEY et al., 2002; DUBEY et al., 2007).

Em 1998, o cão (*Canis familiaris*) foi classificado como o hospedeiro definitivo do parasita (MCALLISTER et al., 1998), outros canídeos como o coiote, lobo cinzento e dingo australiano foram caracterizados como hospedeiros definitivos.

(DUBEY et al., 2011; GONDIM et al., 2004; KING et al., 2010; McALLISTER et al., 1998).

Os bovinos, búfalos, ovinos, caprinos, equinos, 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 no trabalho de Dubey e Schares, (2011).

**Figura 1.**Ciclo de vida do *Neospora caninum* (DUBEY, 2005)



Fonte: DUBEY, 2005

## 2.2 PREVALÊNCIA EM BOVINOS

A infecção por *Neospora caninum* em bovinos de corte tem sido reportada em várias partes do mundo, o que pode ser verificada em detalhes na revisão de Dubey et al., (2006). No Brasil o primeiro estudo de soroprevalência de *N. caninum* pesquisado em bovinos foi realizado por Gondin et al., (1999), onde os anticorpos foram detectados em 63 (14,09%) dos 447 soros testados de bovinos da raça holandesa e mestiços. Sartoret al., (2005) detectaram 101 (20,0%) de 505

cabeças de gado de corte, Ragozo et al., 26,7%, 2003. Em várias regiões brasileiras, a neosporose vem sendo amplamente difundida (tabela 1).

O *N.caninum* pode ser transmitido após o nascimento (transmissão horizontal) pela ingestão de tecidos contaminados com taquizoítos ou cistos deciduais, pela ingestão de alimentos ou água contaminada pelos oocistos esporulados. Outra forma de infecção é a via transplacentária (transmissão vertical), que ocorre quando os taquizoítos são transmitidos da fêmea para seu feto, durante a gestação (DUBEY et al., 2007).

Quadro 1- Prevalência de anticorpos contra *Neospora caninum* em bovinos de corte no Brasil, 2014.

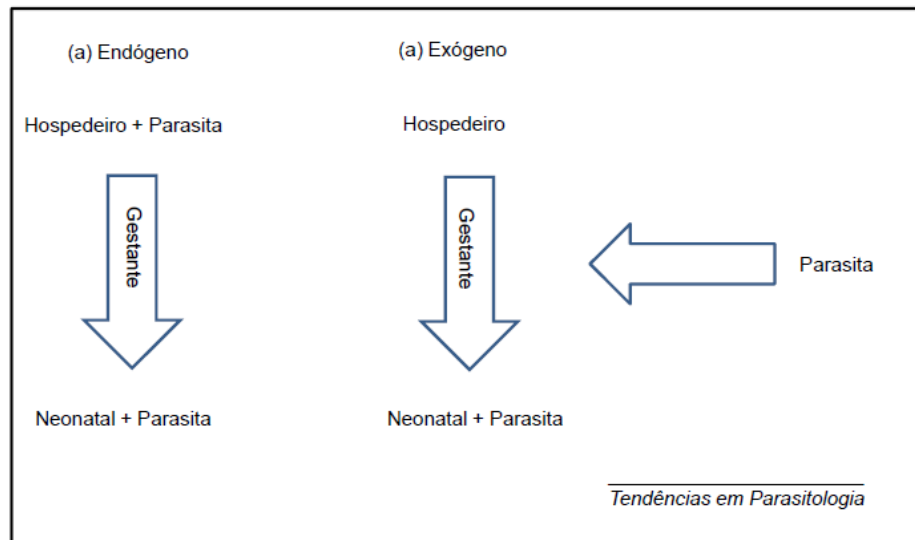
	Estado	Bovino de Corte	Teste/Ponto de corte	Referência
Região Sul	PR	26,7%	IFAT/1:25	Ragozo et al., 2003
	PR	26,7 %	RIFI/1:25	Ragozo et al., 2003
	PR	4,8 %	RIFI/1:100	Marques et al., 2009
	RS	21,4 %	RIFI /1:25	Ragozo et al., 2003
Sudoeste	MG	11,1 %	RIFI /1:25	Ragozo et al., 2003
	SP	20,0 %	ELISA /1:100	Sartoret al., 2005
	SP	19,88 %	ELISA /1:100	Vianna et al., 2008
	SP	15,57 %	RIFI /1:200	Hasegawa et al., 2004
	RJ	6,7 %	RIFI /1:25	Ragozo et al., 2003
Centro Oeste	MS	29,9 %	RIFI /1:25	Ragozo et al., 2003
	MS	30,0 %	IFAT /1:100	Andreotti et al., 2004
	MS	22,13 %	IFAT /1:50	Andreotti et al., 2010
	GO	29,6%	IFAT /1:250	Melo et al., 2006
	GO	47,76 %	RIFI/1:200	Bombonate et al., 2011
Norte	RO	9,5 %	IFAT /1:25	Aguiar et al., 2006
Nordeste	BA	20,0%	IFAT /1:200	Santos et al., 2010

### 2.3 TRANSMISSÃO VERTICAL

*Neospora caninum* é o protozoário eficiente a ser transmitido pela via transplacentária em bovinos, podendo ocorrer por sucessivas gestações, proporcionando um meio eficaz de manter o agente dentro do rebanho (BJORKMANN et al., 1996; SCHARES et al., 1998; INNES et al., 2002; DUBEY et al., 2007; SCHARES, 2011). Para um melhor entendimento sobre a origem da

infecção transplacentária, recentemente, passou-se a denominar os seguintes termos: transmissão transplacentária endógena e exógena (TREES; WILLIANS, 2005).

**Figura 2.** Relação hospedeiro-parasita e gestação. Diferença entre endógena (a) e exógena (b)



Fonte: TREES, WILLIANS, 2005

A transmissão transplacentária exógena ocorre quando há a ingestão de oocistos esporulados pela fêmea gestante, todavia, quando ocorre a recrudescência ou reativação da infecção nas fêmeas persistentemente infectadas, denominamos de transmissão transplacentária endógena (DUBEY et al., 2007; TREES; DIAN; WILLIANS; 2005; DUBEY; SCHARES, 2011).

## 2.4 TRANSMISSÃO HORIZONTAL

A ingestão de esporocistos ou oocistos excretados pelas fezes de cães e outros canídeos (BASSO et al., 2001) do meio ambiente é o principal meio de transmissão em bovinos após o nascimento e denominado transmissão horizontal (TREES et al., 2002; GONDIM et al., 2002; GONDIM et al., 2004; MORÉ et al., 2009).

Não há nenhuma evidência que *Neospora caninum* está presente em excreções e secreções de animais adultos assintomáticos, sendo assim, a

transmissão entre bovinos mortos não tem sido observada (DUBEY; BUXTON. WOU DA, 2006; DUBEY et al., 2007).

A transmissão venérea é improvável de acontecer, embora demonstrada por Serrano et al., (2006). Resultados semelhantes foram encontrados por Serrano; Martinez et al., 2007, onde observaram a parasitemia, soroconversão, e níveis de IFN- $\gamma$  em novilhas inseminadas com sêmen contaminado com taquizoítos nas concentrações de  $10^2$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^5$ , respectivamente. Neste mesmo experimento, avaliando fêmeas múltiparas, os autores não observaram a parasitemia e apenas um animal apresentou soroconversão, demonstrando que animais adultos possam apresentar maior resistência a infecção. Entretanto, 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.

## 2.5 ABORTAMENTO E ASPECTOS REPRODUTIVOS

Corbellini et al., 2000, em achados histopatológicos dos casos de abortamento em bovinos, no período do 5<sup>o</sup> ao 7,5 mês de gestação, encontraram nos fetos lesões no cérebro, coração, pulmão, fígado e rins, compatíveis com infecção por *Neospora caninum*. O primeiro caso de abortamento ocorrido em bovinos, causado por *N. caninum*, no Brasil, foi registrado por Gondim et al., 1999. Corbellini et al., 2002; Santos et al., 2005, onde oito fetos bovinos (23,5%), de três a oito meses de idade, foram positivos para *N. caninum*, detectados pela análise histológica e técnica imuno-histoquímica, no Estado do Paraná, Brasil.

A exploração econômica da pecuária de corte está ligada, diretamente, aos índices produtivos e reprodutivos do rebanho, chamando a atenção dos profissionais Médicos Veterinários do novo milênio e pesquisadores da área, que estejam empenhados, na busca de novas soluções, diagnóstico, a estruturação de um sistema de investigação e o acompanhamento epidemiológico, através do parasita (THOMPSON, 1999).

Além de outras doenças de grande importância reprodutiva, mas controladas através de produtos biológicos vacinais, destaca-se a neosporose, doença reconhecida mundialmente e, considerada a maior causa de abortamentos em bovinos (DUBEY LINDSAY, 1996; ANDERSON et al., 2000).

Além do abortamento em animal com neosporose, pode apresentar fetos mumificados, natimortos, nascimento de bezerros com problemas neurológicos, aumento de intervalo de partos, diminuição da produção de carne, reposição de animais, custos com medicamentos e diagnóstico da doença (DUBEY et al., 2007).

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, D.M., CAVALCANTE, G.T., RODRIGUES, A.R., LABRUNA, M.B., CAMARGO, L.M.A., CAMARGO, E.P., GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*Neospora caninum* in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. *Veterinary Parasitology*, v.142, p.71-77, 2006.

ANDREOTTI, R., PINCKNEY, R.D., PIRES, P.P., SILVA, E.A.E. Evidence of *Neospora caninum* in beef cattle and dogs in the State of Mato Grosso do Sul, Center-Western Region, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 13, 3, 129-131, 2004.

ANDREOTTI, R; BARROS, J.C; PEREIRA, A.R; OSHIRO, L.M; CUNHA, R.C; FIGUEIREDO NETO, L.F. Association between seropositivity for *Neospora caninum* and reproductive performance of beef heifers in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 19, 119-23, 2010.

D'ANGELO, M; A.G. GALUPPO, N.M.C. ZERIO, G.M. MELO, E.M. PITUCO, L.H. OKUDA. Estudo morfológico de embriões bovinos fertilizados in vitro expostos experimentalmente à *Neospora caninum*. *Arq.Inst. Biol.*, São Paulo, v.73, n.2, p.211-214, abr./jun., 2006.

D'ANGELO, M.; ZERIO, N.; GOES, A.C.; PAVÃO, D.L.; PICCOLOMINI, M.M.; CATROXO, M. Avaliação da interação do *Neospora caninum* com oócitos bovinos durante o período de maturação in vitro por microscopia eletrônica de transmissão e imunofluorescência direta. *Ata Scientiae Veterinariae* 36 (Supl. 2): 2008.

DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, v. 67, p.1-54, 1996.

DUBEY, J.P., BARR, B.C., BARTAA, J.R., BJERKAS, I., BJORKMAN, C., BLAGBURN, B.L., BOWMAN, D.D., BUXTON, D., ELLIS, J.T., GOTTSTEIN, B., HEMPHILL, A., HILL, D.E., HOWE, D.K., JENKINS, M.C., KOBAYASHI, Y., KOUDELA, B., MARSH, A.E., MATTSSON, J.G., MCALLISTER, M.M. MODRY, D., OMATA, Y., SIBLEY, L.D., SPEER, C.A., TREES, A.J., UGGLA, A., UPTONS, S.J., WILLIAMS, D.J.L., LINDSAY, D.S. Redescription of its differentiation from related coccidian. *International Journal Parasitology*. 32, n.8, p.929-946, 2002.

DUBEY, J.P., M.C. JENKINS., C.RAJENDRAN., K. MISKA., L.R. FERREIRA., J. MARTINS., O.C.H. KWOK, S. CHOUDHARY., Gray Wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*. 181, 382-387, 2011.

DUBEY, J.P., G. Schares. Neosporosis in animals – The last five years. *Veterinary Parasitology*, v. 180, p. 90-108, 2011.

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

GUIMARÃES, J.R,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*.124, 1-8, 2004.

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

I. BJERKAS, S.F. MOHN, and J. PRESTHUS. Identified cyst-forming Sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Parasitenkd*, 70, pag.271-274, 1984.

MARQUES, F.A., HEADLEY, A.S., FIGUEIREDO-PEREIRA, V., TARODA.A., BARROS, L.C., CUNHA, I.A., MUNHOZ, K., BUGNI, F.M., ZULPO, D.L., IGARASHI, M., VIDOTTO, O., GUIMARÃES, J.S., GARCIA, J.L. *Neospora caninum*: evolution of vertical transmission in slaughtered beef cows (*Bos indicus*). *Parasitol. Res.* V.108, p.1015,2009.

MELO, D.P., DA SILVA, A.C; ORTEGA-MORA, L.M; BASTOS,S.M; BOAVENTURA, C.M. Prevalence of antibodies anti-*Neospora caninum* in bovines from Anápolis and Goiânia microregions, Góias, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 15, 105-9, 2006.

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 soroconversion in dams. *Theriogenology*, v.71, p.639-642, 2009.

RAGOZO, A.M.A.R., PAULA, V.S.O., SOUZA, S.L.P., BERGSMASCHI, D.P., GENNARI, S.M. Occurrence of antibodies anti-*Neospora caninum* in bovine sera from six Brazilian states. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.12, n.1, p.33-37, 2003.

SANTOS, A.P.M.E., NAVARRO, I.T., FREIRE, R.L., VIDOTTO, O., BRACARENSE, A.P.F.R. *Neospora caninum* in dairy cattle in Paraná State, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias -Londrina*, v.26, n.4.p.559-562, 2005.

SANTOS, S.L., COSTA, K.S., GONDIM, L.Q., SILVA, M.S.A., UZÊDA, R.S., SANDES, K.A., GONDIM, L.F.P. Investigation of *Neospora caninum*, *Hammondia* sp., and *Toxoplasma gondii* in tissues from slaughtered beef cattle in Bahia, Brazil. *Parasitol. Res.*, v.106, p.457-461, 2010.

SARTOR, I.F., GARCIA, A.F., VIANNA, L.C., PITUCO, E.M., DAL PAI, V., SARTOR,R. Ocorrência de Anticorpos Anti-*Neospora caninum* em bovinos de leite e corte da região de Presidente Prudente, SP. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.72, n.4, p.413-418, 2005.

SERRANO, E; FERRE, I; OSORO, K; ADURIZ, G; MATEOS-SANZ, A; MARTINEZ, A; ATXAERANDIO, R; HIDALGO, C.O; ORTEGA-MORA,L.M. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers, *Veterinary Parasitology*, 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 sêmen with diferente numbers of tachyzoïtes. *Theriogenology*, v.67, p.729-737, 2007.

SILVA, J.F. Anual Livestock 2013 – Global Agricultural Information Network, Brazil, Gain report number: BR 0914, 2013,

VIANNA, L.C., SARTOR, I.F., PITUCO, M.E., OKUDA, L.H., CAMARGO, C.N., KRONKA, S.N. Incidência e transmissão transplacentária de *Neospora caninum* em fêmeas primíparas da raça *Bos indicus* abatidas em Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v.29, n.2, p.387-392, 2008.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a transmissão do *Neospora caninum* em fêmeas da Raça Nelore (*Bos indicus*) infectadas naturalmente, em diferentes fases da gestação, na região norte do Estado do Paraná, Brasil.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

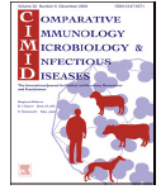
- Determinar a presença de anticorpos contra *Neospora caninum* em fêmeas
- da Raça Nelore (*Bos indicus*) infectadas naturalmente, em diferentes fases da gestação.
- Determinar a taxa de transmissão transplacentária do *N. caninum* em vacas zebuínas da raça nelore
- Avaliar as variáveis associadas ao risco de infecção por *N. caninum*.
- Determinar o Perfil de citocinas (IL-10 e IFN- $\gamma$ ) envolvidos na gestação frente a infecção por *N. caninum*

## ARTIGO 1 - PUBLICADO

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 37 (2014) 267–270



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Immunology, Microbiology  
and Infectious Diseasesjournal homepage: [www.elsevier.com/locate/cimid](http://www.elsevier.com/locate/cimid)

## Anti-*Neospora caninum* antibody detection and vertical transmission rate in pregnant zebu beef cows (*Bos indicus*): *Neospora caninum* in pregnant beef cows (*Bos indicus*)



Eudes Esteves do Nascimento, Ana Sue Sammi, Joeleni Rosa Dos Santos, Beatriz de Souza Lima Nino, Alexey Leon Gomel Bogado, Alessandra Taroda, Odilon Vidotto, João Luis Garcia\*

Protozoology Laboratory, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade de Londrina–UEL, Postal Box 6001, 86050-970 Londrina, PR, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 17 June 2014

Received in revised form 11 August 2014

Accepted 15 August 2014

## Keywords:

Herd cattle  
Neosporosis  
Pregnancy  
Calves

## ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate anti-*Neospora caninum* antibodies and the vertical transmission rate in naturally infected pregnant zebu beef cows (*Bos indicus*) reared on pasture. The present study began with 200 cows from four farms (50 cows from each farm), and these animals were submitted to timed artificial insemination (TAI). After ultrasonography, 76 pregnant cows were selected, 22, 15, 22, and 17, respectively, from farms 1, 2, 3, and 4. Blood samples were taken from cows thrice during the first, second, and third trimester of gestation, and a blood sample was collected from 31 calves before colostrum milking. From 76 cows 23 (30.3%) had anti-*N. caninum* antibodies detected by indirect ELISA (Idexx), and 53 (69.7%) did not. Sixty-four cows that initiated the experiment were negative to *N. caninum* and 11 became positive either during the second or third trimester of gestation, this mean an infection incidence of 17.2% (11/64). OD for ELISA was higher (OD=2.08) during the second and third (OD=2.10) trimesters of pregnancy when compared with the first (OD=1.81), however, there were no statistical differences ( $P=0.45$ ). The vertical transmission was calculated to be 29.0% (9/31), and the risk of vertical transmission of *N. caninum* in seropositive dams was 26.25 times higher than seronegative animals (OR=26.25,  $2.38 < OR < 289$ ,  $P=0.007$ ). In conclusion, the rate of vertical transmission of *N. caninum* in pregnant zebu beef cows was 29%, and the risk was 26.25 higher in seropositive dams relative to than seronegative animals.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Neospora caninum* is a protozoan parasite with a worldwide distribution. Its life cycle was determined in 1998 [1], dogs (*Canis lupus familiaris*), coyotes (*Canis latrans*), dingoes

(*Canis lupus dingo*), and gray wolves (*C. lupus*) are presently described as its definitive hosts [1–4]. However, under natural conditions, oocysts have only been observed in the feces of dogs and gray wolves [4,5].

Cattle can contract neosporosis by vertical or horizontal transmission [6,7]. Vertical (transplacental) infections can be exogenous (infections by oocyst ingestion) or endogenous (reactivation of infection in a chronically infected cow) in origin. Vertical transmission is described as the main route, and abortions due to

\* Corresponding author. Tel.: +55 43 33714485; fax: +55 43 33714485.  
E-mail addresses: [jlgarcia@uel.br](mailto:jlgarcia@uel.br), [joaoluiscarcia10@gmail.com](mailto:joaoluiscarcia10@gmail.com) (J.L. Garcia).

neosporosis are most prevalent at 3 to 6 months of pregnancy [8].

Brazil has approximately 205.3 million bovines [9], which constitute the largest commercial herd in the world [10]. Approximately 80% of Brazilian cattle are zebu animals (*Bos indicus*, Nellore and crossbreeding), and the great majority of the beef herd is raised at pasture with an annual production of approximately 9.3 million tons of meat [10].

Although the rates of vertical transmission of neosporosis have been estimated in dairy herds [7,11,12], little is known about neosporosis transmission in beef herds. Marques et al. [13] reported that 4.8% of fetuses from Brazilian zebu beef cows slaughtered in an abattoir were serologically positive for *N. caninum*. Additionally, the vertical transmission rate was reported as 24% in crossbreeding cattle (zebu/Holstein) based on the seroconversion of calves before ingestion of colostrum [14].

The aim of the present study was to evaluate the detection of anti-*Neospora caninum* antibodies and the vertical transmission (from mothers to precolostrum calves) in naturally infected zebu (Nellore breed) beef cows from Paraná state, Brazil.

## 2. Material and methods

### 2.1. Study area and sampling

This study was conducted at four farms located in the northern region of the state of Paraná in Southern Brazil. The selected farms utilized a herd vaccine program that included inoculations against abortion agents, such as leptospirosis, bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV), however, where *N. caninum* vaccine were not used. The cows were kept in pastures with ad libitum access to water and mineral supplements. Two hundred zebu beef cows (Nellore breed, *Bos indicus*) were subjected to timed artificial insemination (TAI; 50 cows from each farm). The pregnant animals were selected after insemination, and gestation was diagnosed by ultrasonography. Seventy-six pregnant cows were detected (farm A,  $n=22$ ; farm B,  $n=15$ , farm C,  $n=22$ , and farm D,  $n=17$ ), and their blood was drawn during the first, second, and third trimesters of gestation. After delivery, blood samples from 31 calves were collected by puncture of the jugular vein immediately after calving and before they ingested colostrum. The sera were stored in 1.5 ml plastic tubes and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis. This study was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee (CEEA, protocol number 54/12) of Universidade Estadual de Londrina.

### 2.2. Anti-*Neospora caninum* antibody detection

Antibodies against *N. caninum* were detected by HerdCheck *Neospora caninum* Antibody Test Kit (Idexx laboratories) following manufacture instructions. Sera from cows were diluted 1:100 (following manufacture suggestions) and calves 1:25 [15]. A cow was considered to be seropositive if two or more of the test results were positive ( $\text{OD} \geq 0.5$ ). Results obtained during first, second, and third trimesters of gestation such as: +, –, – or –, +, – were

considered false positives. A calf was considered seropositive when  $\text{OD} \geq 0.5$ .

### 2.3. Statistical analysis

The experimental variables were analyzed by the chi-square test ( $\chi^2$ ) with the Yates correction and the Fisher exact test ( $F$ ) using the Epi Info program (CDC, 6.04b version). The associations among the variables and the occurrence of seropositive animals were estimated from values obtained by the odds ratio (OR) with a confidence interval of 95%. ANOVA was performed to calculate differences between serum ODs. A  $P$ -value of  $\leq 0.05$  was considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Seroprevalence of *N. caninum*

The serologic results for *N. caninum* are summarized in Tables 1 and 2. Of 76 pregnant cows, 23 (30.3%) were positive for *N. caninum*, and 53 (69.7%) tested negative. The prevalence of *N. caninum* in pregnant cows was statistically different between the farms ( $\chi^2=9.03$ ,  $p=0.02$ ), showing a prevalence of 9.1% (2/22), 26.7% (4/15), 50.0% (11/22), and 35.3% (6/17) at farms A, B, C, and D, respectively. Sixty four cows began the experiment negative for *N. caninum* and 11 become positive in the second or third trimester of gestation, which

**Table 1**  
Outcome of anti-*Neospora caninum* antibody responses in sera from cows monitored during pregnancy.

	Trimester of gestation			Total (%)
	First	Second	Third	
Serologic dam condition	–	–	–	53 (69.7)
	–	–	+	3 (3.9)
	–	+	+	8 (10.5)
	+	+	+	7 (9.2)
	+	+	–	2 (2.6)
	+	–	+	3 (3.9)
Total ELISA <sup>1</sup>	1.81 <sup>a</sup>	2.08 <sup>a</sup>	2.10 <sup>a</sup>	76 (100)
Prevalence				30.3% (23/76)
Incidence				17.2% (11/64)

<sup>1</sup>OD average from commercial ELISA (Idexx) –, negative +, positive.

<sup>a</sup>  $P=0.45$ .

**Table 2**  
Relationship between cow and calf sera against *Neospora caninum* antibody.

Dams <sup>1</sup>	Calves <sup>2</sup>		Total (%)
	+(%)	–(%)	
+	5 (16.1)	2 (3.2)	6 (19.3)
–	4 (12.9)	20 (67.8)	25 (80.7)
Total	9 (29.0)	22 (71.0)	31 (100)
$P=0.007^3$ (OR=26.25, 2.38 < OR < 289)			

<sup>1</sup>A cow was considered to be seropositive if two or more of the test results were positive ( $\text{OD} \geq 0.5$ ). Results such as: +, –, – or –, +, – were considered false positives.

<sup>2</sup>A calf was considered seropositive when  $\text{OD} \geq 0.5$ .

<sup>3</sup>Fisher Exact.

corresponds to an incidence of infection of 17.2% (11/64). Antibodies to *N. caninum* were found 15.8% (12/76), 22.4% (17/76), and 27.6% (21/76) of the cows in the first, second, and third trimesters of pregnancy, respectively ( $\chi^2 = 3.13$ ,  $p = 0.11$ ). Additionally, the OD values of the ELISA (Fig. 1) were higher in the second (ODmean =  $2.08 \pm 0.827$ ) and third (ODmean =  $2.10 \pm 0.517$ ) trimester than in the first (ODmean =  $1.81 \pm 0.646$ ), however, there were no statistical differences ( $F = 0.82$ ,  $p = 0.45$ ). The rate of vertical transmission (Table 2) was calculated to be 29.0% (9/31), and the risk of vertical transmission in *N. caninum* positive dams was 26.25 times higher than for negative dams (OR = 26.25,  $2.38 < OR < 289$ ,  $P = 0.007$ ). Precolostral serum samples from calves were obtained from three farms (A, B, and D), and positive animals were found in 16.6% of the samples from farm A (3/18, ODmean = 2.65), 30.0% (3/10, ODmean = 1.48) from farm B, and 100% (3/3, ODmean = 1.40) from farm D. Abortions were observed in only two dams, both from farm B. One of these dams aborted during the 4th month of pregnancy, and serum samples from this animal had high OD values throughout the study period (OD = 2.93, 2.77, and 2.37 in the first, second, and third trimesters of gestation, respectively). The other abortion occurred in a dam that seroconverted during the third trimester of gestation (OD = 1.54); however, we were not able to detect exactly in which month that abortion occurred.

#### 4. Discussion

Vertical transmission has been described as the major factor responsible for the maintenance of *N. caninum* within a cattle herd [16–18]. Herein, we report a vertical transmission rate of 29% in Nellore cattle and a seroprevalence of 30.2% in pregnant cows. Although the majority of Brazilian cattle are in beef herds, few cross-sectional epidemiologic studies regarding neosporosis have been conducted. The few studies that have been performed report a prevalence ranging from 9.5 to 29.6% [19–21]. The sensitivity and specificity of ELISA idexx [22], used here, was previously evaluated by several authors [23–27] and described as being higher than 90%, what is useful for epidemiological studies.

We observed in the present study, seven (77.8%) out of nine calves detected as positive in ELISA had their dams seropositive since the first serial sampling, this could indicate that endogenous vertical transmission was the main source of transmission in those animals. To date, the frequency of exogenous and endogenous vertical transmission for *N. caninum* is unknown.

Vianna et al. [28] studied 518 pregnant Nellore heifers culled in an abattoir, and they found 36.8% of fetuses positive by ELISA for *N. caninum*, all of which were more than four months of gestation. In a field study, the Nellore heifers positive for neosporosis were shown to have a higher risk of abortion than seronegative heifers [29]. The vertical transmission rate was calculated to be 24% in crossbreeding cattle (zebu/Holstein) by recording the seroconversion of calves before the ingestion of colostrum [14], this result was very similar to the results from the present study. Marques et al. [13] detected antibodies against *N. caninum* in

4.8% of the fetuses obtained from slaughtered zebu cows, and Macedo et al. [30] showed 11.6% of positive fetuses from slaughtered dairy cows.

In the present study, we observed that the risk of a calf being born infected with *N. caninum* was 26.25 times higher for *N. caninum* seropositive dams than for seronegative dams. A survey using 5594 dairy and beef cows in Argentina [31] showed that seropositive animals were 85% more likely to abort than seronegative. It was recently demonstrated that the vast majority of cows that undergo *N. caninum*-induced abortion has higher antibody levels when compared to their non-aborting counterparts [8]. Overall, the probability of a calf being seropositive was 3.5 times higher when the dam was also seropositive than when the dam was seronegative [32].

The 17.2% (11/64) of incidence of antibodies against *N. caninum* observed here could be due to horizontal transmission because those animals began the study seronegative and became positive during the experiment. However, fluctuating *N. caninum* antibody levels in naturally infected cows have been described previously [12,13,16,33,34]. Conrad et al. [33] urged caution when interpreting the serologic results if they are to be used in strategies for the control of neosporosis in cattle. In the USA Paré et al. [33], and in Argentina Moré et al. [35] reported that 8/170 (5%) and 1/33 (3%) of seronegative cows gave birth to seropositive calves, respectively.

In summary, the present work demonstrated a vertical transmission rate of 29% in naturally infected Nellore pregnant cows, based on precolostrum serum samples from their offspring, additionally; the risk of vertical transmission was 26.25 times higher in seropositive dams than negative ones.

#### Acknowledgements

J.L. Garcia and O. Vidotto are recipients of CNPq fellowships. The authors thanks Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, AUXPE-PARASITOLOGIA-1345/2011, and post doctor scholarship No. 10259/12-0).

#### References

- [1] McAllister MM, et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 1998;28(9):1473–8.
- [2] Gondim LF, et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 2004;34(2):159–61.
- [3] King JS, et al. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 2010;40(8):945–50.
- [4] Dubey JP, et al. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 2011;181(2–4):382–7.
- [5] Dubey JP, Schares G. Neosporosis in animals—the last five years. *Vet Parasitol* 2011;180(1–2):90–108.
- [6] Schares G, et al. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet Parasitol* 1998;80(2):87–98.
- [7] Bartels CJ, et al. Quantification of vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* infection in Dutch dairy herds. *Vet Parasitol* 2007;148(2):83–92.
- [8] Dubey JP, Schares G. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet Parasitol* 2006;140(1–2):1–34.
- [9] IBGE. Estatística da Produção Pecuária. Brasília: IBGE; 2012.
- [10] ANUALPEC. Anuário da Pecuária Brasileira. São Paulo: ANUALPEC; 2011. p. p360.

- [11] Dijkstra T, et al. Natural postnatal *Neospora caninum* infection in cattle can persist and lead to endogenous transplacental infection. *Vet Parasitol* 2008;152(3–4):220–5.
- [12] More G, et al. Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. *Vet Parasitol* 2009;160(1–2):51–4.
- [13] Marques FA, et al. *Neospora caninum*: evaluation of vertical transmission in slaughtered beef cows (*Bos indicus*). *Parasitol Res* 2011;108(4):1015–9.
- [14] de Oliveira VS, et al. Abortions in bovines and *Neospora caninum* transmission in an embryo transfer center. *Vet Parasitol* 2010;173(3–4):206–10.
- [15] Wouda W, Dubey JP, Jenkins MC. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. *J Parasitol* 1997;83(3):545–7.
- [16] Pare J, Thurmond MC, Hietala SK. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhoo mortality. *Can J Vet Res* 1996;60(2):133–9.
- [17] 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(10):1683–9.
- [18] Innes EA, et al. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol* 2002;18(11):497–504.
- [19] Melo DP, et al. Prevalence of antibodies anti-*Neospora caninum* in bovines from Anapolis and Goiania microregions, Goias Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2006;15(3):105–9.
- [20] Aguiar DM, et al. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon Brazil, in association with some possible risk factors. *Vet Parasitol* 2006;142(1–2):71–7.
- [21] Minervino AH, et al. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle from Santarem, Para, Brazil. *Res Vet Sci* 2008;84(2):254–6.
- [22] Pare J, Hietala SK, Thurmond MC. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *J Vet Diagn Invest* 1995;7(3):352–9.
- [23] Schares G, Conraths FJ, Reichel MP. Bovine neosporosis: comparison of serological methods using outbreak sera from a dairy herd in New Zealand. *Int J Parasitol* 1999;29(10):1659–67.
- [24] Reichel MP, Pfeiffer DU. An analysis of the performance characteristics of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. *Vet Parasitol* 2002;107(3):197–207.
- [25] von Blumroder D, et al. Comparison and standardisation of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. *Vet Parasitol* 2004;120(1–2):11–22.
- [26] Hall CA, Reichel MP, Ellis JT. Performance characteristics and optimisation of cut-off values of two enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to *Neospora caninum* in the serum of cattle. *Vet Parasitol* 2006;140(1–2):61–8.
- [27] Wapenaar W, et al. Comparison of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. *Vet Parasitol* 2007;143(2):166–73.
- [28] Vianna LC, et al. Incidence and transplacental transmission of *Neospora caninum* in primiparous females from *Bos indicus* slaughtered in Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. *Semina Ciênc Agrar* 2008;29:387–92.
- [29] Andreotti R, et al. Association between seropositivity for *Neospora caninum* and reproductive performance of beef heifers in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2010;19(2):119–23.
- [30] Macedo CA, et al. *Neospora caninum*: evaluation of vertical transmission in slaughtered dairy cows (*Bos taurus*). *Rev Bras Parasitol Vet* 2013;22(1):13–7.
- [31] Moore DP, et al. Risk factors associated with *Neospora caninum* infections in cattle in Argentina. *Vet Parasitol* 2009;161(1–2):122–5.
- [32] Landmann JK, et al. Epidemiology and impact of *Neospora caninum* infection in three Queensland tropical dairy herds. *Reprod Domest Anim* 2011;46(4):734–7.
- [33] Conrad PA, et al. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *J Vet Diagn Invest* 1993;5(4):572–8.
- [34] Stenlund S, et al. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 1999;85(4):227–34.
- [35] 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(4):671–5.

## ARTIGO 2 - PARA PUBLICAÇÃO

### **Avaliação da Parasitemia de *Neospora caninum* em fêmeas bovinas da Raça Nelore (*Bos indicus*) durante a gestação.**

#### Resumo

A *Neospora caninum* é a principal causa de abortamentos em bovinos no mundo todo. Embora bastante estudada, pouco se sabe sobre o gatilho imunológico ou biológico em bovinos que leva a parasitemia do protozoário, culminando com a transmissão vertical do *N. caninum*. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a parasitemia e a soropositividade de anticorpos contra *N. caninum* em fêmeas da Raça Nelore (*Bos indicus*), infectadas naturalmente, em diferentes fases da gestação. Cinquenta e cinco vacas nelore foram acompanhadas durante a gestação e amostras de sangue com e sem EDTA foram obtidas para a realização da PCR e da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), respectivamente, durante o primeiro, segundo e terceiro trimestre de gestação. Animais com títulos  $\geq 100$  foram considerados positivos. Amostras de sangue e soro dos 55 bezerros provenientes das vacas foram colhidas antes da mamada do colostro para a realização da RIFI e PCR. A prevalência total das vacas foi de 34,5% (19/55) e para os bezerros foi de 7,3% (4/55) todas no primeiro trimestre de gestação e soropositivas, e três bezerros positivos (5,4%) na PCR que apresentaram sorologia negativa e oriundos de vacas também soronegativas. O presente estudo mostrou uma parasitemia mais prevalente no primeiro trimestre de gestação em vacas nelore. No entanto, os resultados da PCR nos bezerros podem estar evidenciando tanto uma infecção precoce antes dos três meses de gestação (animais permanentemente infectados, PI) ou uma infecção tardia na estação sem tempo dos bezerros montarem uma resposta imune humoral. Outros estudos devem ser realizados para um melhor entendimento da epidemiologia da neosporose, durante a gestação em vacas de corte.

Palavras-chave: *N. caninum*; fêmeas bovinas de corte; transmissão vertical, RIFI.

## **Evaluation of Parasitemia of *Neospora caninum* in zebu beef cows (*Bos indicus*) during pregnancy**

### Abstract

*Neospora caninum* is the major cause of abortions in cattle worldwide. Even though it is well studied, a few is known about imunologic or biologic trigger in cattle that causes the protozoan parasitemia, which culminates with the vertical transmission fo *N. caninum*. Therefore, the goal of this study was to evaluate the parasitemia and serum occurrence of antibodies against *N. caninum* in Nelore beef cows (*Bos indicus*), naturally infected in different stages of gestation. Fifty five beef cows were kept up with during pregnancy and blood samples were collected in tubes with and without EDTA for PCR and Immunofluorescence Assay Test (IFAT), respectively, during the first, second and third trimester of gestation. Animals that presented titers  $\geq 100$  were considered positive. Blood and sera samples of 55 new born calves were collected before colostrum milking, also for both PCR and IFAT. The total prevalence in cows were 34.5% (19/55) e and in calves were 7.3% (4/55), all animals in the first trimester of gestation and seropositives, and three posive calves (5.4%) in PCR, that were negative in serology, were born from seronegative dams This study presented a parasitemia that was most prevalent at the first third of gestation in Nelore beef cows. However, the PCR results in calves showed a premature infection before this three months of gestation (permanently infected animals, PI) or a late infection during the season, which gave no time for calves to have humoral immune responses. More studies have to be conducted for a better knowledge in neosporosis epidemiology, during the pregnancy of beef cows.

Keywords: *N. caninum*, beef cattle, vertical transmission, IFAT

## 1. INTRODUÇÃO

Durante a última década, a infecção por *Neospora caninum* tem sido apontado como um importante agente de doença reprodutiva em bovinos no Brasil e, em várias partes do mundo, sendo diagnosticado como uma das principais causas de abortamentos em bovinos de corte e leite (D'ANGELO,2008).

Ao contrário de *Toxoplasma gondii*, *N. caninum* pode ser transmitido verticalmente por gestações consecutivas (BJORKMAN et al., 1996; INNES et al., 2002). Levantamentos sobre abortamentos em bovinos de corte e leite, em vários países dos seis continentes, têm identificado *N. caninum* como uma das maiores causas, ocorrendo nas formas endêmica e epidêmica (SANDERSON; GAY; BASZLER, 2000).

O primeiro caso de abortamento ocorrido em bovinos, causado por *N. caninum* no Brasil, foi registrado por Gondim et al., 1999; Corbellini et al., 2002; Santos et al., 2005, de 8 fetos bovinos (23,5%), de três a oito meses de idade, foram positivos para *Neospora caninum*, detectados pela análise histológica e técnica imuno-histoquímica, no Estado do Paraná, Brasil.

Entretanto, maioria das pesquisas sobre neosporose em bovinos, transmissão vertical, foram direcionadas para rebanhos leiteiros (BARTELS et al., 2007; DIJKA STRA et al., 2008; MORE et al., 2009) e, numa proporção menor em rebanhos bovinos de corte. Marques et al., 2011, relataram uma taxa de transmissão de 4,8% em bovinos de corte (*Bos indicus*), abatidos em matadouros da região norte do Estado do Paraná, Brasil.

Cardoso et al., 2009, observaram em 12 vacas de leite soropositivas para *N. caninum*, de quatro fazendas, naturalmente infectadas, altos títulos de anticorpos, no segundo e terceiro trimestre de gestação e aumento após o quinto mês de gestação, sem associação de abortamentos, no Brasil.

Por outro lado, Oliveira et al., 2010, relataram a infecção por transmissão vertical, resultando uma taxa de 24% por soroconversão em bovinos de cruzamento (zebu/holandês) antes da ingestão do colostro.

O impacto econômico sobre a bovinocultura de corte, ainda não foi determinado (DUBEY; LINDSAY, 1993), entretanto, na Califórnia, a neosporose tem gerado prejuízos em função de abortamentos e custos indiretos, estimados em 35 milhões de dólares por ano. Estes valores se elevam para aproximadamente 85

milhões em relação à indústria leiteira e 25 milhões para a produção de carne, por ano (ELLIS, 1997 apud DUBEY, 1999). As perdas não se limitam apenas aos abortamentos. O descarte prematuro de matrizes e a diminuição da produção de leite também devem ser incluídos no cálculo do custo da doença. As vacas soropositivas produzem menos leite e têm vida reprodutiva diminuída, quando comparadas com as soronegativas, devido a disfunção dos órgãos como coração, cérebro, fígado, rins e glândula adrenal provocada pelo *N. caninum* (THURMOND; HIETALA, 1996).

Barros et al.,2010 relataram que, um programa com 1.000 novilhas de corte, em escala de reprodução, em Campo Grande-MS., entre as perdas econômicas relacionadas à neosporose, estão o aborto e a baixa taxa de desfrute, comprometendo com uma taxa de 27,3% da receita total do potencial, no momento da venda de bezerros, deixando de registrar uma rentabilidade de R\$66.372,39 para um sistema produtivo.de anticorpos contra *N. caninum* em fêmeas da Raça Nelore (*Bos indicus*) infectadas naturalmente, em diferentes fases da gestação da Raça Nelore (*Bos indicus*) infectadas naturalmente, em diferentes fases da gestação.

### 3.MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 – Seleção dos animais e tratamentos:

O experimento foi realizado no período de Novembro\2012 a Dezembro\2013 em uma propriedade pecuária, na região Norte do Estado do Paraná. No experimento foram utilizados 55 fêmeas da Raça Nelore prenhes, com idades variando 2,5 a 6,0 anos de idade, primíparas e multíparas, e seus respectivos bezerros. O sistema de criação era extensivo, com pastagem e suplementação mineral de boa qualidade, imunizados contra IBR\BVD\LEPTOSPIROSE, com reforço após 21 dias e, anualmente, apresentando exame de brucelose negativo, escore de condição corporal (ECC) próximo de três.

Os animais foram submetidos a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) segundo BARUSELLI et al (2004), e o diagnóstico de gestação foi realizado através de ultrassom (Aloka SSD 500, 5MHz) aos 30 dias de após a

inseminação. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Bioética Animal da UEL (CEUA, 54\12).

### 3.2 – Colheita de material;

Amostras de sangue, com anticoagulante EDTA e sem anticoagulante, foram colhidas através da punção da veia coccígea média, no início do experimento, antes da inseminação, e posteriormente nos animais positivos no primeiro, segundo e terceiro trimestre de gestação. O sangue sem anticoagulante foi centrifugado a 3000 rpm e o soro foi congelado a  $-20^{\circ}$ , para posterior análise.

No momento do parto os recém-nascidos foram submetidos à colheita de sangue pela via jugular, antes da primeira mamada do colostro. Todas as amostras de sangue colhidas foram processadas seguindo os mesmos procedimentos praticados, anteriormente.

### 3.3 Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI

A RIFI utilizada para detectar anticorpos de *N. caninum* foi realizado de acordo com Conrad et al (1993). O antígeno de *N. caninum* foi produzido a partir de cultura derivada de taquizoítas NC – 1. Foi feita a diluição do soro da vaca e do feto em 1:25, os quais foram incubados em lâminas com antígeno por 30 minutos em temperatura de  $37^{\circ}$  C e depois lavados com PBS (pH 9,0). Anticorpos de IgG foram detectados com isoticianato de fluorescência anti-bovino IgG. Os soros foram considerados positivos quando toda a superfície de taquizoítas foi fluorescente (PARÉ et al., 1995), e os títulos de anticorpos  $\geq 100$  para as vacas e  $\geq 25$  para os bezerros.

### 3.4 Extração de DNA e Nested PCR

A extração de DNA foi realizada utilizando o kit de extração de DNA PureLink Genomic DNA Mini Kit (Life Technologies) seguindo a metodologia proposta pelo fabricante. Após a extração do DNA, as amostras foram submetidas ao Nested PCR, baseada na região ITS-1 para detecção de amostras positivas para

*Neospora caninum*, segundo protocolo descrito anteriormente por Buxton et al (1999). Os primers utilizados foram externos: NN1 – TCAACCTTTGAATCCCAA, NN2 – CGAGCCAAGACATCCATT, e internos NEO1 – TACTACTCCCTGTGAGTTG; NEO2 - TCTCTTCCCTCAAACGCT.

Alíquotas de cada PCR foram submetidas a eletroforese em gel agarose a 2%. Taquizoítas da estirpe NC-1 (106\ml) foram diluídos em TE, e o DNA foi extraído para ser usado como controle positivo. O controle negativo constou de amostras de água sem *N. caninum*. Um controle positivo e negativo foi incluído em cada teste.

#### 4 RESULTADOS

As vacas mostraram resultado de 34,5% (19\55) de ocorrência de anticorpos par\ *N. caninum* e os bezerros 7,2% (4\55) (Tabela 1). Apenas uma va PCRca apresentou-se soropositiva em todas as fases da gestação. Dos quatro bezerros posiivos na PCR apenas um tinha a sua mãe soropositiva.

A PCR revelou três vacas positivas (5,4%) todas no primeiro trimestre de gestação e soropositivas, e três bezerros positivos (5,4%) na PCR que apresentaram sorologia negativa e oriundos de vacas também soronegativas (Tabela 2).

#### 5 DISCUSSÃO

Poucas pesquisas foram realizadas sobre a transmissão vertical e avaliação da parasitemia do *N. caninum* em *Bos indicus*. No presente estudo, foi detectado três vacas (5,4%) e três beaerros (5,4%) positivos na PCR para *N. caninum*, porém nenhum bezerro tinha suas mães positivas tanto na sorologia como na PCR. No presente estudo, a presença de anticorpos contra *N. caninum* não teve relação com o resultado da PCR nos bezerros. Mc Innes et al. (2006) não encontraram correlação entre DNA de *N. caninum* e anticorpos nas mães, fetos, ou aborto devido ao *N. caninum*. Esses autores sugeriram que a presença ou ausência de anticorpos de *N. caninum* ou DNA não dão suporte nem excluem este parasita

como a causa de aborto. De acordo com este trabalho, nosso estudo sugere critérios adicionais para excluir ou não um diagnóstico de *N. caninum*. Moore et al. (2002) não apresentaram anticorpos pela RIFI em seis fetos abortados em vacas soropositivas, os autores sugeriram uma resposta inadequada pelo sistema humoral dos fetos. Como a maioria das infecções em bovinos infectados naturalmente ocorre “in útero” e o sistema imunológico do feto ainda está em desenvolvimento, este parasita pode ser reconhecido como parte dele mesmo (como é observado em algumas infecções virais) sem ser criada uma resposta imune contra ele.

Anticorpos contra *N. caninum* foram observados em apenas quatro fetos e o parasita não foi detectado no sangue pela PCR. Fetos congenitamente infectados podem desenvolver anticorpos sem apresentar dano e nascer clinicamente normais (DUBEY, 1999). Moore et al. (2002) observaram 11 fetos abortados sem lesão histopatológica, mesmo sendo positivos para neosporose pela RIFI em diluição de 1:25.

A transmissão vertical tem sido descrita como a maior responsável pela manutenção do parasita no rebanho bovino (PARÉ et al., 1996; DAVISON et al., 1999; INNES et al., 2002). Uma vaca prenha depois de infectada pode abortar, parir um bezerro fraco ou parir um bezerro clinicamente saudável, mas persistentemente infectado.

Além disso, novilhas congenitamente infectadas podem transmitir o parasita a sua descendência (INNES et al., 2002). Outra consideração importante é o fato que diferentes populações de animais (por exemplo): *Bos taurus* x *Bos indicus*) podem também diferir nas suas suscetibilidades à infecção (INNES et al., 2002). Aguiar et al. (2006) demonstraram uma alta soroprevalência em fazendas de gado de corte comparadas com as de leite ou fazendas de criação mista e, neste mesmo estudo, a ocorrência de *N. caninum* foi estatisticamente associada com o alto número de vacas nas fazendas, mas não foi associada estatisticamente com a presença de cães nas fazendas.

A prevalência observada no rebanho de gado de corte no presente estudo está em acordo com alguns estudos (OSAWA et al., 2002), entretanto esta é mais alta que as descritas previamente para rebanho de corte (MOORE et al., 2002; BAÑALES et al., 2006; AGUIAR et al., 2006) Comparações entre estudos de prevalência necessitam ter cautela quando técnicas sorológicas, valores do ponto de corte, tamanho da amostra e tipo de população animal.

Ambas as respostas, celular e imuno humoral, são responsáveis para o controle de *N. caninum*. A primeira, como o parasita é um protozoário intracelular, é a principal resposta imune. No entanto, os anticorpos podem diminuir a propagação de taquizoítas extracelulares pela neutralização da célula infectada. Durante a gestação, há mudanças na resposta imune da mãe, e isto pode influenciar na patogênese da doença. Na gestação em curso, há uma proliferação de linfócitos e baixa na produção de IFN- $\gamma$  (INNES et al., 2001). Entretanto é desconhecida se durante a gestação ocorre uma baixa regularização na resposta imune humoral da mãe.

O presente estudo mostrou uma parasitemia de *N. caninum* mais prevalente no primeiro trimestre de gestação em vaca nelore. No entanto, os resultados da PCR nos bezerros podem estar evidenciando tanto uma infecção precoce, antes dos três meses de gestação (animais permanentemente infectados, PI), ou uma infecção tardia na gestação sem tempo dos bezerros montarem uma resposta imune humoral. Outros estudos devem ser realizados para um melhor entendimento da epidemiologia da neosporose durante a gestação em vacas de corte.

## 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-Neospora caninum antibodies in cattle and dogs from Western, Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. *Veterinary Parasitology*, v, 142, p. 71-77, 2006.

ANDERSON, M. L.; ANDRIANA RIVO, A. G.; CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, p. 417-431, 2000.

BAÑALES.P; et al.A nationwide survey on seroprevalence of *Neospora caninum* infection in beef cattle in Uruguay.*Veterinary Parasitology*, Montevideo, Uruguay, n.139, p.15-20, 2006.

BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; MARQUES, M.O.; RODRIGUERS, C.A.; NASSER, L.F.; SILVA, R.C.P.; SÁ FILHO, M.F. Efeito do tratamento com eCG na taxa de concepção de vacas Nelore com diferentes escores de condição corporal inseminadas em tempo fixo (Análise Restropectiva). *Actas Scientiae Veterinariae* 32 (suplemento), p. 228, 2004.

BARROS, J.C., NETO, L.F.F. Diagnóstico da perda econômica causada pela *neosporose* na reprodução de novilhas de corte. *Anais. In.480. Sociedade Brasileira de Economia Administração e Sociologia Rural, Campo Grande, 2010.*

BARTELS, C.J.M.; ARNAIZ-SECO, J.I.; RUIZ-SANTA-QUITERA, A.; BJORKMAN, C.; FROSSLING, J.; BLUMRODER, D.V.; CONTRATHS, F.J.; SCHARES, G.; MAANEM, C.V.; WOUUDA, W.; ORTEGA-MORA, L.M. Supranation comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. *Veterinary Parasitology, Amsterdam*, v. 137, n. 1\2, p. 17-27, Apr. 2007.

BARTLEY, P.M., E.Kirvar, S.Wright, C. Swales, I. Esteban-Redondo, D. Buxton, S. W. Maley, A.Schock, A. G. Rae, C.Hamilton and E.A. Innes. Maternal and Fetal Immune Responses of Cattle Inoculated with *Neospora caninum* at Mid.Gestacion. *J.Comp. Path.* 2004, Vol. 130, 81-91.

BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M.C. et al. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef cattle farms, dairy farms, and from urban áreas of Argentina. *Journal of Parasitology*, v. 87, p. 906-907, 2001.LUND

BJORKMAN, C.; JOHANSSON, O.; STENLIND, S.; HOLMDAHL, O.J.; UGGLA, A. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 208, p. 1441-1444, 1996.

BOMBONATE, L.T., GUIMARÃES, M.S., COSTA, R.C. de B., MELO, D.P.G., CAETANO DA SILVA, A. Avaliação da transmissão vertical de *Neospora caninum* em bovinos das Raças Curraleiro e Pantaneiro. *Anais/Resumo da 63ª Reunião Annual da SBPC – ISS N2176 – 1221, 13Julho/2011.*

CARDOSO, J.M.S., FUNADA, M.R., SOARES, R.M., GENNARI, S.M. Serological profile or colostral antibodies to *Neospora caninum* in infection free calves. Braz. J. vet. Res. Anim. Sci., v.45,n.5,p.379-384, 2008.

CARDOSO, J.M.S., NISHI, S.M., FUNADA, M.R., AMAKU, M., GUIMARÃES JUNIOR, J.S., GENNARI, S.M. Antibody dynamics during gestation in cows naturally infected with *Neospora caninum* from four dairy herds in Brazil. Braz. J. vet. Res. Anim. Sci., v.46, n.5, p.395-399, 2009.

CORBELLINI, L.G. Bovine *neosporosis*; risk factor associated with *Neospora caninum* seroprevalence in 60 dairy farms in southern Brazil and diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection. Acta , 33 2; 231-232,2005.

DAVISON, H.C.; OTTER, A.; TREES, A.J. Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle. International Journal of Parasitology, v. 29, n. 1, p. 1189-1194, 1999.

D'ANGELO, M; GALUPPO, A.G.; ZERIO, N.M.C; MELO, G.M.; PITUCO, E.M.; OKUDA, L.H.Avaliação da interação do *Neospora caninum* com oócitos bovinos durante o período de maturação in vitro por microscopia eletrônica de transmissão e imunofluorescência direta. Acta Scientiae Veterinariae, São Paulo, n.36 (supl.2): 2008.

DEVENS, B.A. Utilização de taquizóitos do *Neospora caninum* na produção de lâminas para imunoflorescência. PUBVET, Londrina, V., N.10, 2008.

DUBEY, J.P. Neosporosis – the first decade of research. International Journal of Parasitology, v. 29, p. 1485-1488, 1999.

DUBEY, J.P., G. SCHARES. Diagnosis of bovine *neosporosis*. Elsevier B. V., Bltsville. Veterinary Parasitology 140, p.1-34, 2006.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G., and ORTEGA-MORA, L.M. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*, 20 (2): 323-367, 2007.

DUBEY, J.P.. SCHARES, G. *Neosporosis* in animals – The last five years. *Veterinary Parasitology*, v.180, n.1-2, p.90-108, 2011.

GONDIM, L.F.P.; SARTORI, I.F.; MONTEIRO, L.A.; HARITANI, M. *Neospora caninum* infection in an aborted fetus in Brazil. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 47, n. 1, p.35, 1999.

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*, 124, 1-8, 2004.

INNES, E.A.; S. WRIGHT, S.; MALEY, A.; ERA, A.; SCHOCK, E.; KIRVAR, P. BARTLEY, C.; HAMILTON, I.M.; CAREY, AND D. BUXTON. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology*, v. 31, p. 1523-1534, 2001.

INNES, E.A.; ANDRIANAVARIVO, A.G.; BJORKMAN, C.; WILLIAMS, D.J.L.; CONRAD, P.A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects of vaccination. *Trends in Parasitology*, v. 18, n. 11, p. 497-504, 2002.

MARQUES, F.A.; HEADLEY, A.S.; FIGUEREDO-PEREIRA, V.; TARODA, A.; BARROS, L.D.; CUNHA, I.A.; MUNHOZ, K.; BUGNI, F.M.; ZULPO, D.L.; IGARASHI, M.; VIDOTTO, O.; GUIMARÃES, J.S.; GARCIA, J.L. *Neospora caninum*: evolution of vertical transmission in slaughtered beef cows (*Bos indicus*). *Parasitology Research*, 108, 1015-9, 2011.

MORÉ, G.; BACIGALUPE, D.; BASSO, W.; RAMBEAUD, M.; BELTRAME, F.; RAMIREZ, B.; VENTURINI, M.C.; VENTURINI, L. Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and in dairy cattle. *Veterinary Parasitology*, 160, 51-4, 2009.

MELO, D.P.G.; eta al. Prevalência de Anticorpos *Anti-Neospora caninum* em Bovinos das microrregiões de Goiânia e Anápolis. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*,v.15, n.3, p. 105-109, 2006.

MOORE., D. P. *Neosporosis* in South America,. *Veterinary Parasitology*, Chile, n.127, p.87-97, 2005.

MOORE, D.P.; CAMPERO, C.M.; ODEON, A.C.; POSSO, M.A.; CANO, D.; LEUNDA, M.R.; BASSO, W.; VENTURINI, M.C.; SPATH, E. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. *Veterinary Parasitology*, v. 107, n.4, p. 303-316, 2002.,

MOORE, G.; BACIGALUPE, D.; BASSO, W.; RAMBEAUD, M.; BELTRAME, F.; RAMIREZ, B.; VENTURINI, M.C.; VENTURINI, L. Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and in dairy cattle. *Veterinary Parasitology*, 160, 51-4, 2009.

OSAWA, T; WASTLING, J.; ACOSTA, L.; ORTELLADO, C.; IBARRA, J.; INNES, E.A. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Paraguay. *Veterinary Parasitology*, v.110, n. 1\2, p. 17-23, Dec. 2002.

PARÉ, J.; HIETALA, S.K.; THURMOND, M.C. Interpretation of an indirecfluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. Infection in cattle.*Journal Veterinary Diagnosis Investigation*, v. 7, p. 273-375, 1995.

PARÉ, J.; THURMOND, M.; HIETALA, S. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calf wood mortality.*Canadian Journal Veterinary research*.Otawa, v. 60, p. 133-139, 1996.

RAGOZO, A.M.A.R., PAULA, V.S.O., SOUZA, S.L.P., BERGSMASCHI, D.P., GENNARI, S.M. Occurrence of antibodies anti-*Neospora caninum* in bovine sera from six Brazilian states. Ver. Brás. Parasitol. Vet., v.12, n.1, p.33-37, 2003.

ROJAS, J.A.B; et al. Eficácia de uma vacina contra *Neospora caninum* em condições de campo no México. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Autônoma Nacional do México. 04510 Cidade do México. Intervet México, Laboratórios. Pasaje Interlomas N° 16 - 4° Piso Huixquilucan Edo do México.

SANTOS, A.P.M.; E., NAVARRO, I.T., FREIRE, R.L.; VIDOTTO, O.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. *Neospora caninum* in dairy cattle in Paraná State, Brazil: histological and immune histochemical analyses in fetuses. Semina: Ciências Agrárias, 26, 559-562, 2005.

SANDERSON, M.W.; GAY, J.M.; BASZLER, T.V. *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the North western United States. Veterinary Parasitology, v.90, n. 1-2, p.15-24, 2000.

VIANNA, L. C., et al. Incidência e transmissão transplacentária de *Neosporacanium* em fêmeas primíparas da raça Bosindicus abatidos em Presidente Prudente. Semina; Ciências Agrárias, Londrina, v.29, n.2, p.387-392, 2008.

VOGEL, F.S.F; ARENHART, S; BAUERMAN, F.V. Anticorpos anti-*Neosporacanium* em bovinos, ovinos e bubalinos no Estado do Rio Grande do Sul, Ciência Rural, v.36, n.6,

**Tabela 1.** Resultados da soropositividade de anticorpos para *Neosporacanium* segundo o terço de gestação em vacas nelore.

Primeiro Terço	Segundo Terço	Terceiro Terço	Dia do Parto	Bezerro		
<b>Grupo 1</b>						
-	-	-	-	-	20	74.0%
+	+	+	+	-	1	3.7%
+	+	-	-	-	1	3.7%
+	-	-	-	-	1	3.7%
-	+	-	-	-	1	3.7%
-	-	-	-	+	3	11.1%
				<b>total</b>	27	100%
<b>Grupo 2</b>						
-	-	NR	-	-	16	57%
+	+	NR	-	-	3	10.7%
-	+	NR	-	-	1	3.6%
-	+	NR	-	+	1	3.6%
+	-	NR	-	-	7	25%
				<b>total</b>	28	100%
				<b>TOTAL</b>	55	

Tabela 2- Resultado da Nested PCR para detectar a parasitemia de *Neospora caninum* segundo o terço de gestação em vacas nelore.

Primeiro Terço	Segundo Terço	Terceiro Terço	Dia do Parto	Bezerro		
<b>Grupo 1</b>						
+	-	-	-	-	1	3.7%
-	-	-	-	+	2	7.4%
-	-	-	-	-	24	88.9%
				<b>Total</b>	27	100%
<b>Grupo 2</b>						
-	-	NR	-	+	1	3.57%
+	-	NR	-	-	2	7.14%
-	-	-	-	-	25	89,2%
				<b>Total</b>	28	100%
				<b>TOTAL</b>	55	

## CONCLUSÃO FINAL

O presente estudo não demonstrou grandes variações nos títulos de anticorpos contra *N. caninum* em vacas nelore prenhes infectadas naturalmente.

Observou-se uma alta taxa de transmissão vertical e horizontal do *N. caninum* em vacas nelore perenhas com um risco maior de transmissão vertical em animais soropositivos

O presente estudo mostrou *N. caninum* mais prevalente no primeiro trimestre de gestação. Os resultados da PCR nos bezerros podem estar evidenciando tanto uma infecção precoce antes dos três meses de gestação (animais permanentemente infectados, PI) ou uma infecção tardia durante a gestação sem tempo dos bezerros montarem uma resposta imune humoral.