



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

JULIANA CORREA BERNARDES

***Neospora caninum*: PREVALÊNCIA E CINÉTICA DE  
ANTICORPOS IgG em BOVINOS DE LEITE**

JULIANA CORREA BERNARDES

***Neospora Caninum*: PREVALÊNCIA E CINÉTICA DE  
ANTICORPOS IgG em BOVINOS DE LEITE**

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 - PR  
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Bernardes, Juliana Correa.

Neospora caninum: PREVALÊNCIA E CINÉTICA DE ANTICORPOS IgG em BOVINOS DE LEITE / Juliana Correa Bernardes. - Londrina, 2022.  
75 f. : il.

Orientador: João Luis Garcia.

Coorientador: Luiz Daniel de Barros .

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Neosporose. - Tese. 2. Aborto. - Tese. 3. Bovinos de leite. - Tese. 4. Acompanhamento cronológico. - Tese. I. Garcia, João Luis. II. de Barros , Luiz Daniel . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

CDU 619

JULIANA CORREA BERNARDES

***Neospora Caninum*: PREVALÊNCIA E CINÉTICA DE  
ANTICORPOS IgG em BOVINOS DE LEITE**

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**

---

Prof. Dr. João Luis Garcia  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr. Luís Fernando Pita Gondim  
Universidade Federal da Bahia - UFBA

---

Prof. Dr. Fernando de Souza Rodrigues  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Regina Mitsuka Breganó  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Eloíza Teles Caldart  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 22 de março de 2022.

Ao meu pai, Dirson (*in memoriam*) cujo amor e ensinamentos vivem intensamente no meu coração. A minha mãe, Dalva por todo amor, por acreditar também. E a todos aqueles que continuam lutando pela ciência mesmo em tempos tão difíceis.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Dirson, por me ensinar sobre honra, ética, alteridade e se fazer presente no coração.

À minha mãe, Dalva, pelo incentivo e amor de toda uma vida.

À Luísa e Davi pelo mais puro e intenso afeto, e por me permitirem ser tia.

À tia Fátima e tio Laércio que torcem pelos objetivos desejados e ainda mais pelos nem sonhados.

Ao meu orientador, João Luis, pelas considerações, por expandir os meus limites, por confiar e ser amigo durante a caminhada.

Aos professores Luiz Daniel e Fernando pela ajuda, sugestões e potencializações.

Ao professor Alexandre Wolf por me orientar os primeiros passos científicos.

À professora Cristiane Hengler pela eterna orientação, por ser torcida e ser presente.

Às amigas, Fernanda, Eloiza, Aline, Profa. Regina e Winni pelo aprendizado, pelos sorrisos, lágrimas, por serem luz e família do lado de cá.

À irmã acadêmica, Thais Agostinho, por ter me recebido com carinho e pela generosidade diária.

Ao estagiário Cauan Saito e veterinária Isabela Vieira pela ajuda a campo, pela amizade e por serem bençãos nesta trajetória.

Aos amigos Allan Pacagnan e Thaisa Bazzo por serem os melhores.

Às amigadas de toda uma vida e as que tive a sorte de construir aqui.

À minha terapeuta, Luana, por ampliar meus horizontes e ser bússola no autoconhecimento.

A todos os amigos do grupo Minutos da Vida pelo intercâmbio de afetos, experiências e pensamentos.

Aos queridos colaboradores do DMVP e Hospital Veterinário pela parceria e apoio.

A Capes; UEL; INCT Leite, Laboratório Emerge, e principalmente, os produtores rurais por viabilizarem o desenvolvimento desta pesquisa.

Que a minha vida ajude a salvar outras vidas.

1 BERNARDES, Juliana Correa. **Neospora caninum: Estudo da Prevalência e**  
2 **Cinética de Anticorpos IgG em Bovinos de leite.** 2022. 76f. Tese (Doutorado em  
3 Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

## 6 RESUMO

9 Doenças que causam abortamento em vacas leiteiras refletem em grandes perdas  
10 reprodutivas e econômicas. No caso da neosporose, causada pelo protozoário *N.*  
11 *caninum*, os índices produtivos são preocupantes por se tratar: de uma infecção  
12 negligenciada por grande parte dos técnicos e produtores; não existe vacina; há  
13 muitas lacunas a respeito da patogenia e suas interações imunológicas. O presente  
14 trabalho, dividido em duas fases (artigo A e B), teve como objetivos determinar a  
15 prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* e avaliar a ocorrência de fatores associados  
16 ao risco de soropositividade em propriedades rurais situadas na região Oeste-  
17 noroeste do estado de São Paulo; acompanhar a cinética de IgG anti-*N. caninum* em  
18 matrizes e suas progênes; calcular a taxa de transmissão transplacentária de *N.*  
19 *caninum* durante três gerações; analisar fatores de risco para soropositividade para  
20 *N. caninum*. No experimento 1 foram coletadas amostras de sangue de todos os  
21 bovinos leiteiros de 10 propriedades rurais totalizando em 653 animais. As coletas  
22 foram realizadas entre março de 2019 a dezembro de 2021. Inicialmente, foi utilizado  
23 a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para a pesquisa de anticorpos IgG  
24 contra os parasitas *N. caninum* e *Toxoplasma gondii*. A soroprevalência de *N. caninum*  
25 e *T. gondii* nos animais testados foi de 41,7% (272/653) e 11,5% (75/653),  
26 respectivamente. Os resultados da sorologia foram associados aos dados  
27 epidemiológicos das propriedades por meio de regressão logística baseada nos  
28 valores medianos dos títulos de anticorpos. Observou-se associação significativa  
29 entre a ocorrência sérica de IgG anti-*N. caninum* com raça, suplementação de  
30 bezerros, introdução de animais com problemas reprodutivos no rebanho e período  
31 de gestação. Já a baixa soroprevalência para *T. gondii* no rebanho pode ser explicada  
32 pela resistência da espécie bovina ao parasita. No experimento 2 dos 653 animais  
33 coletados na primeira fase do experimento, 152 eram vacas prenhas e seguiram no  
34 acompanhamento 37 matrizes (primeira geração) que pariram progênes fêmeas  
35 (segunda geração – P1), cujo a primeira coleta de sangue ocorreu desde o  
36 nascimento, antes da ingestão do colostro até o último terço gestacional e por fim,  
37 suas progênes (terceira geração – P2). A partir da RIFI anti-*N. caninum*, notou-se que  
38 48,6% (18/37) das matrizes das bezerras eram sororreagentes para *N. caninum*. Foi  
39 observado um risco adicional de 88,9% de ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum*  
40 em progênie 1 (P1) que nasceram de matrizes sororreagentes ( $p < 0,001$ ), sendo que  
41 das transmissões oriundas de infecção pré-natal, 100,0% (3/3) das progênes 2 (P2)  
42 permaneceram reagentes antes da ingestão do colostro. Já em relação ao grupo de  
43 bezerras não reagentes, foi observado a partir do acompanhamento de coorte a  
44 inversão de sorológica, nas quais, 26,3% (5/19) positivaram para *N. caninum* aos três  
45 meses; e 60,0% (6/10) aos seis meses da segunda geração (P1). Em relação a  
46 comparação dos títulos de anticorpos IgG nos indivíduos da P1, observou-se que as  
47 bezerras nascidas de matrizes sororreagentes apresentaram maiores títulos nas fases  
48 antes do colostro ( $p = 0,0002$ ) e aos 90 dias de vida ( $p = 0,0474$ ). A *N. caninum* está  
49 amplamente disseminada na região estudada. Ao considerar que matrizes  
50 soropositivas no terço final de gestação apresentam uma maior possibilidade de gerar

1 progênies positivas, as demonstrações entre transmissão vertical e horizontal do  
2 presente estudo indicam a necessidade de mais estudos epidemiológicos sobre *N.*  
3 *caninum* nos rebanhos leiteiros.

4

5 **Palavras-chave:** Neoporose. Aborto. Bovinos de leite. Acompanhamento cronológico.  
6 São Paulo.

1 BERNARDES, Juliana Correa. ***Neospora caninum*: Study of the Prevalence and**  
2 **Kinetics of IgG Antibodies in dairy**. 2022. 76p. Thesis (Doctor's Degree in Animal  
3 Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.  
4  
5

## 6 ABSTRACT 7 8

9 Abortions in dairy cows result in large reproductive and economic losses. In the case  
10 of neosporosis, caused by the protozoan *N. caninum*, the rates are even more alarming  
11 by the fact it is a pathology neglected by most technicians and farmers; there is no  
12 vaccine; there are many gaps regarding the pathogenesis and its immunological  
13 interactions. The present study, divided into two phases (A and B), aimed at 1)  
14 determining the prevalence of anti-*N. caninum* antibodies and evaluating the  
15 occurrence of factors associated with the risk of seropositivity in rural properties  
16 located in the west-northwestern region of the state of São Paulo; 2) following the  
17 kinetics of IgG anti-*N. caninum* in dams and their progeny; 3) to calculate the rate of  
18 transplacental transmission of *N. caninum* during three generations; 4) to analyze risk  
19 factors for seropositivity for *N. caninum* in a cohort. Article A: blood samples were  
20 collected from all dairy cattle of 10 rural properties totalizing 653 animals. The  
21 collections were performed from March 2019 to December 2021. Initially, indirect  
22 immunofluorescence reaction (IFR) was used for serodiagnosis of antibodies against  
23 *N. caninum* and *Toxoplasma gondii* parasites. The seroprevalence of *N. caninum* and  
24 *Toxoplasma gondii* in the tested animals was 41.7% (272/653) and 11.5% (75/653),  
25 respectively. In this phase, epidemiological data of the properties were associated with  
26 the serological results utilizing logistic regression based on the median values of the  
27 antibody titers. A significant association was observed between the serum occurrence  
28 of *N. caninum* with race, supplementation, the introduction of animals with reproductive  
29 problems and gestation period. The low seroprevalence of *T. gondii* in the herd may  
30 be explained by the resistance of the bovine species to the parasite. Article B: it was  
31 collected 653 samples from each animal in the first phase of the experiment, 152 were  
32 pregnant cows and followed in the follow-up 37 dams (first generation) that gave birth  
33 to female progeny (second generation - P1), whose first blood collection occurred from  
34 birth, before the ingestion of colostrum until the last gestational third and finally, their  
35 progeny (third-generation - P2). From the RIFI anti-*N. caninum*, it was noted that 48.6%  
36 (18/37) of the dams of the calves were seroreagent for *N. caninum* and 51.4% (19/37)  
37 negative. An additional risk of 88.9% of the occurrence of anti-*N. caninum* antibodies  
38 were observed in P1 that was born from seroreagent dams ( $p < 0.001$ ), and of the  
39 transplacental transmissions originating from pre-and postnatal infection, 100.0% (3/3)  
40 of the progeny (P2) remained reagent before the ingestion of colostrum. Concerning  
41 the group of non-reactive calves, it was observed that the frequency between  
42 generations in horizontal transmission was 26.3% (5/19) at three months and 60%  
43 (6/10) at six months in the second generation (P1). Regarding the comparison of IgG  
44 antibody titers in P1 individuals, it was observed that born from seroreagent dams  
45 showed higher titers in the phases before colostrum ( $p = 0.0002$ ) and at 90 days of life  
46 ( $p = 0.0474$ ) than those born from seronegative dams. *N. caninum* is widely spread in  
47 the studied region. When considering that seropositive matrices in the final third of  
48 pregnancy are more likely to generate positive progenies, the demonstrations between  
49 vertical and horizontal transmission in the present study indicate the need for further  
50 epidemiological studies on *N. caninum* in dairy herds.

1  
2  
3

**Key words:** Neoporosis. Abortion. Dairy cattle. Chronological monitoring. Sao Paulo.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> –Formas infecciosas de <i>Neospora Caninum</i> : (A) ultraestrutura de taquizoítos; (B) bradizoítos; (C) cisto; (D) oocisto não-esporulado; (E) oocistos esporulados com dois esporocistos (seta) e dois esporozoítos (ponta da seta) de <i>N. caninum</i> .....	15
<b>Figura 2</b> - Ciclo de vida de <i>Neospora Caninum</i> .....	17
<b>Artigo A</b> - Seroprevalence and risk factors for <i>Neospora caninum</i> and <i>Toxoplasma gondii</i> in dairy cattle of Sao Paulo State	
<b>Figura 1</b> – Frequency of anti- <i>Neospora caninum</i> (IFAT) antibodies in bovine milk breeding cities in the northwest region of Sao Paulo State, Brazil - 2019.....	45
<b>Artigo B</b> - <i>Neospora caninum</i> : acompanhamento da cinética de IgG em bezerras, novilhas e vacas leiteiras naturalmente infectadas em São Paulo, Brasil	
<b>Figura 1</b> - Delineamento epidemiológico longitudinal prospectivo e de corte em progênes bovinas.....	58
<b>Figura 2</b> - Ocorrência de anticorpos G anti- <i>N. caninum</i> em bezerras, novilhas e vacas leiteiras naturalmente infectadas.....	58

## LISTA DE TABELAS

**Artigo A** -- Seroprevalence and risk factors for *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle of Sao Paulo State

**Tabela 1** - Number of samples collected from cattle of west-northwest and west regions of São Paulo State, Brazil, by their age – 2019.....43

**Tabela 2** – Frequency of anti-*Neospora caninum* and anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle from Sao Paulo State, Brazil – 2019.....44

**Tabela 3** – Variables statistically associated with the prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in bovine milk breeding properties of the -northwest region of Sao Paulo State, Brazil - 2019.....44

## LISTA DE GRÁFICOS

**Artigo B - *Neospora caninum*:** acompanhamento da cinética de IgG em bezerras, novilhas e vacas leiteiras naturalmente infectadas em São Paulo, Brasil.

**Gráfico 1** – Dinâmica cinética de anticorpos anti-*Neospora caninum* (RIFI) em progêneses sororreagentes desde o nascimento até doze meses de vida.....59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IgG - Imunoglobulina G

Th - T helper

IFN- $\gamma$  - Interferon gama

TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral Alfa

IL- Interleucina

NO - Óxido nítrico

T CD4 - Linfócito CD4

PG2 - Prostaglandina 2

Kg - quilograma

ROS - Reativos de oxigênio

TBARS - Tiobarbitúrico

GST - S-transferase

ADA - Adenosina desaminase

Bche – Butirilcolinesterase

IFAT- Indirect Fluorescent Antibody Test

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

OR – Odds-ratio

NC-1 – Cepa de *Neospora caninum* 1

RH – Cepa isolada de Retina Humana para *Toxoplasma gondii*

TPI – Infecção Transplacentária Persistente

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	14
2.1 Histórico .....	14
2.1.2 Agente Etiológico .....	14
2.1.2 Hospedeiros .....	15
2.1.3 Ciclo Biológico e Vias de Transmissão .....	15
2.3 Etiopatogenia do abortamento .....	17
2.4 Prejuízos Econômicos na Bovinocultura de Leite .....	18
2.5 Epidemiologia .....	19
2.6 Resposta Imune Contra <i>Neospora caninum</i> .....	20
REFERÊNCIAS .....	22
3 OBJETIVOS .....	27
3.1 Objetivo Geral .....	27
3.2 Objetivos Específicos .....	27
4 ARTIGO A - SEROPREVALENCE AND RISK FACTORS FOR <i>NEOSPORA CANINUM</i> AND <i>TOXOPLASMA GONDII</i> IN DAIRY CATTLE OF SAO PAULO STATE .....	28
5 ARTIGO B <i>NEOSPORA CANINUM</i> : CINÉTICA DE IGG BOVINOS LEITEIROS NATURALMENTE INFECTADAS EM SÃO PAULO, BRASIL .....	44
CONCLUSÃO .....	58
ANEXOS .....	59

## 1 INTRODUÇÃO

A produção pecuária leiteira é uma atividade realizada em todo território nacional. Em 2021 o estado de São Paulo produziu 1.567.625 mil litros de leite, sendo Araras, SP a maior região produtora (IBGE, 2021). Os impactos na cadeia produtiva do leite procedentes do ambiente organizacional, institucional, socioeconômico e sobretudo, sanitário, podem influenciar diretamente na reorganização ou exclusão da atividade (MAGALHÃES, 2007).

*Neospora caninum* é considerado um dos principais causadores de abortamento em bovinos de leite (DUBEY, et al., 1999; REICHEL, et al., 2013; DUBEY, et al. 2017). A infecção transplacentária pelo protozoário pode ocorrer por via endógena e exógena. Na via endógena, matrizes cronicamente infectadas podem transmitir a doença aos seus descendentes por via transplacentária após a reativação da infecção; na exógena, a transmissão ocorre após a infecção da fêmea gestante soronegativa através da ingestão de oocistos esporulados no ambiente. O hospedeiro intermediário, como o cão doméstico, se infecta pela ingestão de placentas, com a presença de taquizoítos, ou mesmo restos fetais, com cistos teciduais (DUBEY, 2003).

Quando vacas infectadas transmitem o parasita ao feto trata-se de uma importante forma de manutenção do agente no rebanho, uma vez que estas apresentam sete vezes mais chances de apresentar repetição de cio e abortamentos que fêmeas não infectadas. A ocorrência de natimortos, mortalidade neonatal, morte fetal, aumento no intervalo entre partos, descarte precoce de animais e queda na produção de leite é associada à presença de vacas com neosporose no rebanho. Desse modo, a persistência da doença no rebanho pode gerar grandes prejuízos econômicos a perdas produtivas (DUBEY, et al., 1988; BARTLES, et al. 1999; ANDERSON, et al. 2000, INNES, et al. 2007).

Para a detecção da infecção em hospedeiros intermediários, os imunodiagnósticos que detectam anticorpos em indivíduos que tiveram contato com o agente são eleitos como excelentes ferramentas para pesquisa e acompanhamento. A ocorrência de absorção fetal e abortamento, consequentes da infecção e recrudescência de *N. caninum* são mais severas no início da gestação, e de maior risco de transmissão, a partir do segundo terço gestacional. Ressalta-se que a maioria dos abortos não ocorrem no início da gestação. Conhecer a prevalência e incidência de neosporose nos rebanhos é extremamente necessário para a escolha do melhor

1 manejo preventivo e conseqüentemente, eficiência econômica para o produtor  
2 (MACALDOWIE et al., 2004; DUBEY, et al., 2017).

3 Sabe-se que a neosporose vem sendo estudada em rebanhos  
4 leiteiros em todo o mundo, pesquisas demonstram consideráveis avanços frente à  
5 compreensão da biologia do parasita, no entanto, pouco se sabe sobre a clínica e  
6 patogenia da doença. No Brasil, em uma revisão feita por Cerqueira-Cézar, et al.  
7 (2017), analisou-se a presença do parasita em 16 estados do país, entretanto, a  
8 ausência de dados sobre a ocorrência de *N. caninum* nos demais estados está  
9 relacionada à falta de estudos nessas localidades.

10 Avaliar a cinética de anticorpos em três gerações de fêmeas  
11 naturalmente infectadas por meio de um estudo longitudinal permite compreender  
12 como ocorre essa flutuação na natureza, colaborando, dessa forma com a diminuição  
13 de prejuízos econômicos e sanitários da bovinocultura leiteira.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico

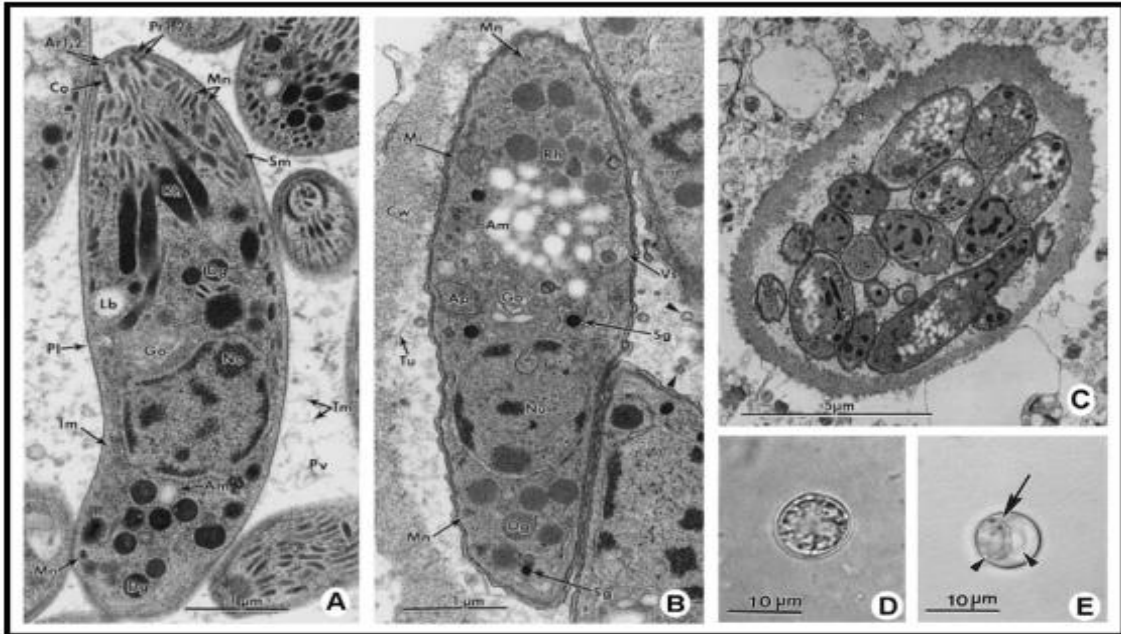
O primeiro relato, realizado por Bjerkas et al. em 1984 na Noruega, descreveu a ocorrência de cães com distúrbios neurológicos, paralisia dos membros posteriores, soronegativos para *Toxoplasma gondii* e com cistos teciduais encontrados no sistema nervoso central morfologicamente diferentes dos cistos de *T. gondii* (GOODSWEN et al., 2013).

Ancestral e morfologicamente relacionado ao *T. gondii*, o *N. caninum* é o agente causador de uma doença há poucas décadas conhecida. No ano de 1988, esse parasita foi cultivado e aplicado para o aprofundamento de pesquisas e descobertas. Em 1990 uma das principais causas de abortamentos ocorridos em bovinos em todo o mundo teve como causa *N. caninum*. No Brasil, o primeiro relato descrito de neosporose ocorreu no estado de São Paulo em um rebanho leiteiro através da imunofluorescência indireta (IFI) em vacas com histórico de abortamento (Gondim et al., 1999).

#### 2.1.2 Agente Etiológico

*N. caninum* é um protozoário pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidiorida, Subordem Eimeriorina, Família Sarcocystidae, causador da neosporose com distribuição mundial. O parasito possui três formas biológicas distintas com multiplicação no interior das células: taquizoítos com formato ovalado, lunar ou globular, grânulos densos, roptrias, micronemas cujo tamanho varia entre 3-7 x 1-5  $\mu\text{m}$ , com até 16 roptrias de conteúdo eletrodensos e são identificados em vacúolos parasitóforos no citoplasma da célula hospedeira. Bradizoítos são a forma de multiplicação lenta do parasita, essa forma apresenta núcleo subterminal, formato alongado, grânulos densos, roptrias, micronemas e medem em torno de 8 x 2  $\mu\text{m}$ . Sua conformação em cistos teciduais ocorre por meio de componentes proteicos que podem ser encontrados em tecidos neurais e músculos. Os oocistos possuem dois esporocistos com quatro esporozoítas cada (DUBEY, BARR & BARTA et al., 2002). (Figura 1).

1  
2 **Figura 1** - Formas infecciosas de *Neospora caninum*: (A) ultraestrutura de taquizoítos;  
3 (B) bradizoítos; (C) cisto; (D) oocisto não-esporulado; (E) oocistos esporulados com  
4 dois esporocistos (seta) e dois esporozoítos (ponta da seta)



5  
6 Fonte: Goodswen, 2013.

### 7 8 **2.1.2 Hospedeiros**

9  
10 O parasita acomete diversas espécies animais, causando doença  
11 clínica importante em bovinos e cães. Os cães (*Canis lupus familiaris*), os lobos cinzas  
12 (*Canis lupus*) e dingos australianos (*Canis lupus dingo*) são reconhecidos como  
13 hospedeiros definitivos do agente (GONDIM, et al., 2004). A infecção por *N. caninum*  
14 foi demonstrada em várias espécies de hospedeiros intermediários, incluindo: gatos,  
15 carneiros, porcos, bovinos, búfalos, cavalos, coiotes, lobos, raposas, alpacas,  
16 camelos, veados e psitacídeos O gênero *Neospora* possui duas espécies, *N. caninum*  
17 que acomete as espécies já mencionadas e *N. hughesi* encontrada apenas em  
18 equinos (DONAHOE et al., 2015; CERQUEIRA-CEZAR et. al., 2017).

### 19 20 **2.1.3 Ciclo Biológico e Vias de Transmissão**

21  
22 Como protozoário de ciclo biológico heteróxico facultativo, *N.*  
23 *caninum* pode infectar o gado bovino por meio da ingestão de oocistos, conhecida  
24 como transmissão horizontal ou exógena, e por meio da transmissão transplacentária,  
25 da mãe para o feto (transmissão vertical ou endógena). Observa-se que cada um dos  
26 mecanismos de transmissão apresenta distinção quanto às características

1 patogênicas, imunológicas e epidemiológicas (REDIGOR-CERRILLO et. al., 2014;  
2 DUBEY et. al. 2017).

3 Os hospedeiros definitivos eliminam em suas fezes oocistos não-  
4 esporulados no ambiente que, dependendo das condições de oxigenação,  
5 temperatura e umidade, tornam-se esporulados entre 24 a 72h pelo processo de  
6 esporogonia, tornando-se infectantes. Estes favorecem a contaminação parasitária de  
7 pastagem e na água consumida pelos hospedeiros intermediários propagando a  
8 disseminação da infecção pelo rebanho. Ao serem ingeridos, esporozoítos são  
9 liberados no sistema digestivo e invadem as células do epitélio intestinal, fibroblastos  
10 e leucócitos, reproduzindo-se como taquizoítos e disseminando-se por todo o  
11 organismo (GOODSWEN et al., 2013; DUBEY et. al., 2017).

12 Os taquizoítos alojam-se em vacúolos intracelulares e replicam-se por  
13 endogonia, no qual possibilita a invasão de células do hospedeiro (células neurais,  
14 fibroblastos, endotélio vascular, macrófagos, células musculares e hepatócitos). Após  
15 a infecção, os taquizoítos provocam resposta inflamatória levando a manifestação dos  
16 sinais clínicos da patogenia (fase aguda). Influenciado pela pressão da resposta  
17 protetora do hospedeiro, os taquizoítos transformam-se em bradizoítos formando a  
18 segunda fase do desenvolvimento assexuado (GOODWEN, et. al, 2013; MONNEY e  
19 HEMPHILL, 2014). Os bradizoítos permanecem em estado de latência, se multiplicam  
20 também por endogonia e formam cistos teciduais, preferencialmente em células  
21 neurais e esqueléticas, podendo manter-se por toda a vida do hospedeiro, sem que  
22 este apresente sinais clínicos significativos (fase crônica), no entanto, é também  
23 possível que ocorra uma baixa taxa de reativação espontânea (MONNEY &  
24 HEMPHILL, 2014; McALLISTER, 2016; DUBEY et. al., 2017).

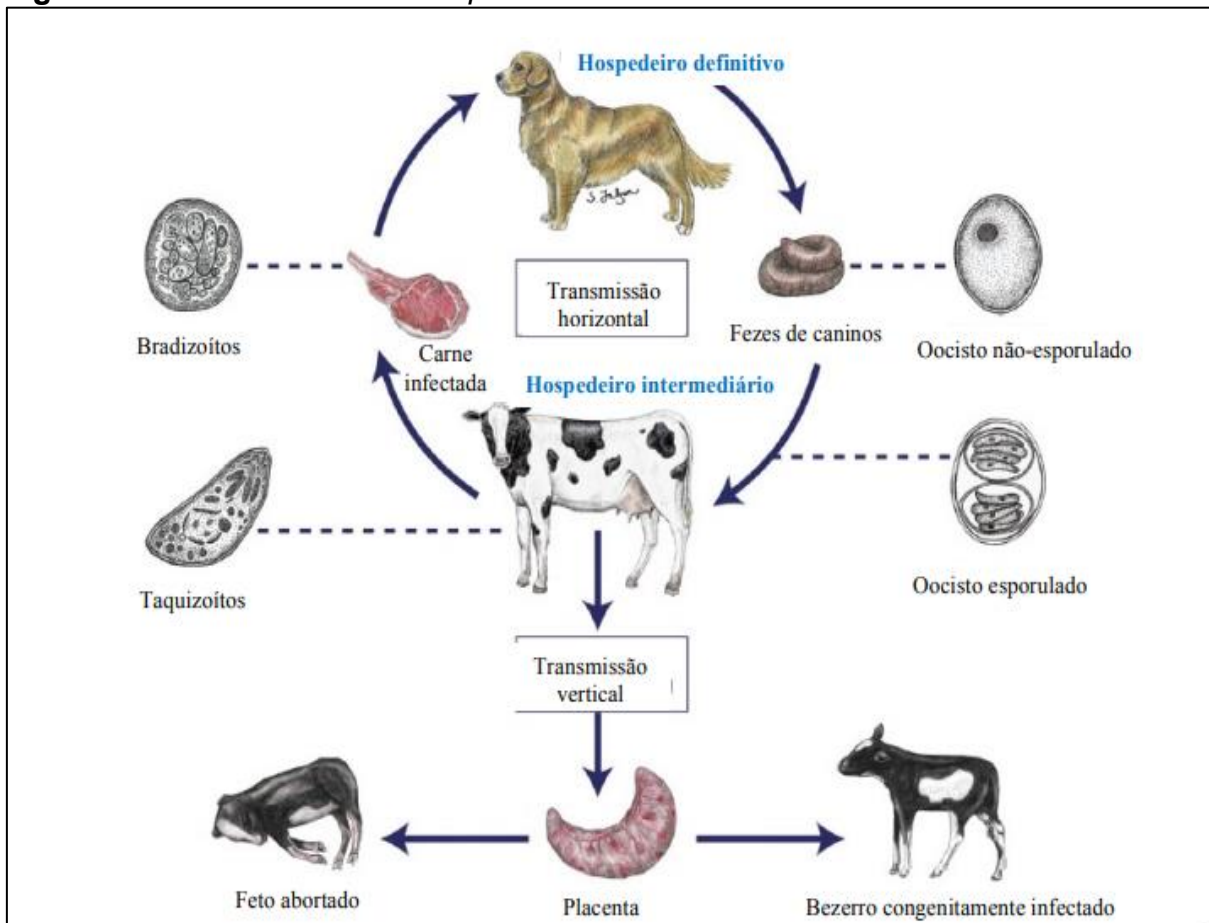
25 O ciclo de vida termina quando os cistos presentes nos tecidos  
26 infectados são ingeridos por hospedeiros definitivos (figura 2), desse modo, os  
27 bradizoítos liberados no intestino delgado invadem células epiteliais, iniciam a fase  
28 sexuada (formação de esquizontes) e a gamogonia produzindo oocistos não  
29 esporulados que serão eliminados nas fezes (GOODSWEN, et al. 2013; MONNEY e  
30 HEMPHILL, 2014).

31

32

33

34

1 **Figura 2 - Ciclo de vida de *Neospora caninum***

2  
3 Fonte: Adaptado de Goodswen, 2013.

4  
5 **2.3 Etiopatogenia do abortamento**

6  
7 De acordo com Dubey et. al. (2017), a transmissão transplacentária é  
8 uma das principais vias de propagação de *N. caninum* em bovinos. A patologia  
9 placentária imunomediada tem sido relatada como a responsável por inviabilizar a  
10 gestação devido aos efeitos antagônicos da resposta tipo Th1 aumentada na interface  
11 materno-fetal. Após infecções experimentais em bovinos, sabe-se que diversas  
12 manifestações clínicas ocorrem nos diferentes estágios gestacionais, sendo que a  
13 morte fetal foi o achado mais comum em vacas infectadas no primeiro terço  
14 gestacional e o nascimento de bezerros congênitamente infectados em vacas  
15 infectadas no terço final da gestação (CANTÓN et. al., 2014).

16 A transmissão transplacentária ocorre devido a reativação e  
17 reconversão (recrudescimento) de bradizoítos em taquizoítos durante a gestação e  
18 em seguida infecção fetal (MONNEY e HEMPHILL, 2014). Sabe-se, ainda, que a  
19 proliferação de parasitas na placenta causa restrições de oxigênio e nutrição, os quais  
20 compromete a viabilidade fetal e induz desequilíbrio imunológico na placenta.

1 Chryssafidis et. al. (2016) complementam por meio de achados histológico, a detecção  
2 de infiltração de linfócitos nos diferentes tecidos analisados (placenta, cérebro fetal,  
3 coração, pulmão, rim e fígado); quanto maior a infiltração mais comum a presença de  
4 macrófagos e plasmócitos nos achados. Em placentas com elevada carga parasitária,  
5 notou-se também necrose tecidual.

6 O abortamento é o sinal clínico mais observado na infecção por *N.*  
7 *caninum* em bovinos, no entanto, a morte, reabsorção e mumificação do feto, assim  
8 como natimortos, neonatos fracos ou com neuropatia e recém-nascidos sem sinais  
9 clínicos, mas portadores, também são importantes. Ressalta-se que a ocorrência do  
10 abortamento no rebanho pode ser esporádica, endêmica ou epidêmica e a  
11 manifestação subclínica ocorre com maior frequência nas infecções por *N. caninum*  
12 (DONAHE, et. al.; 2015; DUBEY, 2017; McALLISTER, 2016). Bruhn et. al. (2013)  
13 complementam ainda que anormalidades reprodutivas como estro e abortos  
14 repetidos, assim como, anestro temporário foram associadas a soropositividade por  
15 *N. caninum* sendo, portanto, caracterizados como sinais clínicos.

16  
17

#### 2.4 Prejuízos Econômicos na Bovinocultura de Leite

18  
19

20 Os prejuízos causados por *N. caninum* somaram em torno de 1 bilhão  
21 de dólares e possivelmente alcançará um cenário de perdas entre 2 e 4 bilhões de  
22 dólares/ano entre 10 e 20 países (representantes das maiores agroindústrias bovinas  
23 no mundo), estimando dois terços de danos financeiros para o leite e um terço para  
24 carne (REICHEL et al., 2013). Nos Estados Unidos estimam-se prejuízos de 546  
25 milhões de dólares/ano para laticínios e 111 milhões de dólares/ano para a indústria  
26 de carne (McALLISTER, 2016). Já no Brasil, os danos são previstos em torno de 51,3  
27 milhões de dólares/ano de prejuízos para o leite e 101,0 milhões de dólares/ano para  
28 carne (REICHEL et al., 2013).

28

29 *N. caninum* é reconhecido como uma das principais causas de perdas  
30 reprodutivas em todo o mundo. Com patogênese não completamente compreendida,  
31 passa a ser considerada como uma doença importante (CANTÓN et. al., 2014).  
32 Quatro problemas críticos e de impacto econômico são gerados pela doença:  
33 abortamento, parto prematuro, retenção de placenta e metrite (FÁVERO et al. 2017).

33

34 A importância do impacto econômico causado por *N. caninum* sugere  
que a vacina seria a melhor alternativa custo-efetiva para controlar a infecção sem

1 deixar resíduos no leite ou na carne, porém, ainda não existe vacina comercial  
2 disponível para a prevenção de neosporose (GOODSWEN et al., 2015).

### 3 4 2.5 Epidemiologia

5  
6 No Brasil a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* varia de acordo  
7 com país, região, e entre bovinos de leite e de corte (DUBEY et al., 2017). Tais  
8 diferenças podem estar predominantemente relacionadas aos números de gestações,  
9 presença e número de cães na fazenda, idade dos animais, forma de infecção e  
10 exposição ao parasita, assim como o tipo de teste sorológico utilizado para determinar  
11 infecção (GOODSWEN et al., 2013). A idade dos bovinos e a presença de cães na  
12 fazenda foram significativamente associadas com maiores chances de distúrbios  
13 reprodutivos. Llano et al. (2018) verificaram maior prevalência de soropositivos em  
14 animais com mais de três anos de idade. Vacas positivas para *N. caninum* têm  
15 probabilidade 25% maior de terem problemas como abortamento, parto prematuro,  
16 retenção de placenta e metrite (FÁVERO et al. 2017).

17 Na região ocidental da Colômbia, um rebanho de 1.038 animais  
18 apresentou soropositividade de 28.0%. Foi possível detectar associação significativa  
19 entre animais soropositivos e histórico de abortamento nos últimos 2 anos, sendo a  
20 prevalência nestes animais de 68,0%. Com relação à repetição de cio, foi observada  
21 uma associação significativa, com uma maior porcentagem (30.0%) em animais  
22 soropositivos (LIANO et al., (2018). De forma semelhante, Pessoa et al., (2015)  
23 identificaram uma incidência 15 vezes maior de distúrbios reprodutivos em vacas  
24 soropositivas (PESSOA et al., 2015). Em suma, os autores confirmam a associação  
25 de perdas reprodutivas com a ocorrência de *N. caninum* no rebanho.

26 Em estudo realizado por Klauck et al., (2016), analisou os fatores de  
27 risco para *N. caninum* correlacionados com a idade da vaca, a quantidade de tempo  
28 que a propriedade desenvolve atividade leiteira, número de animais na propriedade,  
29 e o número de gestação. Notou-se que as fazendas com menos de dez anos de  
30 atividade leiteira foram três vezes mais suscetíveis à neosporose quando comparadas  
31 com as fazendas com mais de dez anos.

32 *N. caninum* em hospedeiros intermediários pode provocar sinais  
33 clínicos ou não. Diante desse cenário, a identificação de estresse oxidativo e aumento  
34 de marcadores de inflamação são essenciais para indicar dano tecidual e aprofundar

1 a investigação da prevalência no rebanho. Marcadores de estresse oxidativo –  
2 espécies reativas de oxigênio (ROS), níveis de substâncias reativas ao tiobarbitúrico  
3 (TBARS), atividade de S-transferase (GST), adenosina desaminase (ADA) e  
4 butirilcolinesterase (BChE) – foram analisados em vacas leiteiras soropositivas para  
5 *N. caninum* (assintomáticas ou sintomáticas) associando a influência das alterações  
6 nesses marcadores com perdas produtivas. Os níveis de ROS, ADA, GST e BChE  
7 apresentam diferentes variações entre os grupos estudados, todavia, o grupo de  
8 animais soropositivos sintomáticos demonstrou dano tecidual associado com estresse  
9 oxidativo e inflamação de modo exacerbado, o que reforça a importância da  
10 investigação clínica de todo o rebanho, uma vez que animais sem manifestações  
11 clínicas podem ter um desempenho inferior. Nesse caso, entende-se que a falta de  
12 inspeção clínica é um efeito de perda por *N. caninum* (GLOMBOWSKY et. al., 2017).

## 13 14 2.6 Resposta Imune Contra *Neospora caninum*

15 A resposta protetora frente a *N. caninum* tem sido relatada como  
16 responsável por comprometer a gestação em vacas. A infecção pelo parasito  
17 desencadeia estímulos decorrentes do sistema imunológico e as respostas pró-  
18 inflamatórias são mediadas por meio de ações do interferon gama (IFN- $\gamma$ ) na ativação  
19 e migração celular (CANTÓN et. al., 2014).

20 Estudos in vivo demonstraram que camundongos com deficiência  
21 para IL-12 (interleucina 12) e IFN- $\gamma$  são incapazes de resistir a *N. caninum*. Nesse  
22 caso, ressalta-se que a imunidade protetora do hospedeiro induzida por *N. caninum* é  
23 tipicamente mediada por Th1 envolvendo a produção da IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF (fator de  
24 necrose tumoral) junto com a produção de NO (óxido nítrico) e consequentemente  
25 alteração de subclasse para IgG2 (DONAHOE et al., 2015; HECKER et al., 2015).

26 No decorrer da fase aguda da infecção, macrófagos e células  
27 dendríticas produzem e secretam altos níveis de IL-12 e TNF- $\alpha$  (fator de necrose  
28 tumoral alfa) em repostas a taquizoítos, por sua vez, a IL-12 estimula células natural  
29 *killer* a produzirem e secretarem altos níveis de IFN- $\gamma$ , assim como, induzirem a  
30 diferenciação celular de T CD4+ na subpopulação Th1 (protetora de IL-12 e IFN- $\gamma$ ),  
31 tais eventos são nocivos para o hospedeiro (DONAHOE et al., 2015; HECKER et al.,  
32 2015). A resposta pró-inflamatória é essencial para paralisar a replicação do parasito  
33 podendo afetar a integridade fisiológica da placenta que consequentemente poderá  
34

1 induzir a má-formação fetal ou o abortamento (MONNEY e HEMPHILL, 2014;  
2 HECKER et al., 2015).

3 Durante a gestação, a imunomodulação do hospedeiro favorece o  
4 perfil de resposta mediada por Th2 associadas a mudança para a subclasse IgG1 e  
5 células T regulatórias que auxiliam na manutenção da gestação, no entanto,  
6 inviabilizam o controle da infecção por *N. caninum*. A sincronia entre a gestação com  
7 altos níveis de citocinas IL-4 e IL-10, associada a infecção por *N. caninum* leva uma  
8 replicação descontrolada do parasito que conseqüentemente prejudica o feto; tais  
9 eventos tornam a gestação frente a infecção por *N. caninum* um grande desafio  
10 (KLEIN et al., 2013; MONNEY & HEMPHILL, 2014; DONAHOE et al., 2015; HECKER  
11 et al., 2015; AGUADO-MARTÍNEZ et al., 2016).

12 Respostas imunes humorais não são protetoras contra *N. caninum*,  
13 porém, a soropositividade e o nível de anticorpos mostram-se como bons marcadores  
14 para o diagnóstico de neosporose bovina e o risco de abortamento associado.  
15 Todavia, foram observadas diferenças entre os mecanismos humorais contra *N.*  
16 *caninum* e o abortamento em vacas puras e cruzadas. Além disso, concentrações de  
17 PG-2 (prostaglandina 2) também podem ser usadas para prever abortamentos  
18 (ALMÈRIA, et. al., 2017).

19 Sabe-se que anticorpos contra *N. caninum* em fetos podem  
20 determinar a presença da infecção pelo protozoário, entretanto, a resposta  
21 imunológica depende do estágio fetal, do nível e do tempo de exposição entre a  
22 infecção e a coleta de sangue. A presença de anticorpos fetais anti-*N. caninum*  
23 assegura a ocorrência de infecção transplacentária deste agente sem interferência da  
24 imunidade passiva. Em bovinos naturalmente infectados foi possível observar um  
25 aumento significativo nos níveis de IgG especificamente na segunda e terceira fase  
26 gestacional. Sabe-se que o título de anticorpos pode ser um indicador indireto da  
27 exposição antigênica para o sistema imunológico, sendo os bovinos soropositivos  
28 para *N. caninum* mais propensos ao abortamento (DUBEY, 2003).

29

## REFERÊNCIAS

Aguado-Martínez A, Basto AP, Müller, J, Balmer V, Manser V, Leitão A, Hemphill A N-terminal fusion of a toll-like receptor 2- ligand to a *Neospora caninum* chimeric antigen efficiently modifies the properties of the specific immune response. *Parasitol*, 2016. 143: 606-16. Doi: 10.1017/S0031182016000056.

Anderson ML, Andrianarivo AG, Conrad PA. Neosporosis in cattle. *Anim Reprod. Scienc.*, 2000, 60-61:417-431. DOI: 10.1016/s0378-4320(00)00117-2.

Almeria S, Serrano-Pérez B, López-Gatius F. Immune response in bovine neosporosis: protection or contribution to the pathogenesis of abortion. *Microb Patho*, 2017. 1:109-77. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.05.042.

Bartels CJ, Wouda W, Schukken YH. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenol.*, 1999.52(2):247-57. DOI: 10.1016/S0093-691X (99)00126-0.

Bjerkas I, Mohn SF, Presthus J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Zeitschrift Parasitenk.*, 1984.70:271-4.

Cantón GJ, Katzer F, Maley SW, Bartley PM, Benavidessilván J, Palarea-Aalbaladejo J, Pang Y, Smith SH, Rocchi MS, Buxton D, Innes E, Chianini F. Inflammatory infiltration into placentas of *Neospora caninum* challenged cattle correlates with clinical outcome of pregnancy. *Vet. res.* 2014. 45(11). DOI: 10.1186/1297-9716-45-11.

Cerqueira-Cezar CK, Calero-Bernal R, Dubey JP, Gennari SM. All about neosporosis in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 2017. 26(3): 253-279. DOI: 10.1590/S1984-29612017045.

Corbellini LG, Driemeier D, Cruz CFE, Gondin LPF, Wald, V. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Vet. Parasitol.*, 2002. 103: 195-202. DOI:10.1016/s0304-4017(01)00600-8.

- 1 Chryssafidis AL, Cantón G, Chianini F, Innes EA, Madureira EH, Genari SN.  
2 Pathogenicity of Nc-Bahia and Nc-1 strains of *Neospora Caninum* in experimentally  
3 infected Cow. *Parasitol. Res.*, 2014. 113(4):1521-1528. DOI: 10.1007/s00436-014-  
4 3796-x.
- 5
- 6 Donahoe SL, Lindsay SA, Krochenberger M, Phalen D, Šlapeta J. A review of  
7 neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. *Intern.*  
8 *J. for parasitol.*, 2015. 4:216-238. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2015.04.002.
- 9
- 10 Dubey JP, Hattel LA, Lindsay DS, Topper MJ. Neonatal *Neospora caninum* infection  
11 in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Amer. Vet.*  
12 *Med. Assoc.*, 1988. 193(10):1259-1263. DOI: 10.1259-63.
- 13
- 14 Dubey JP. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet. Parasitol.*, 1999. 84:  
15 349 -367. DOI: 10.1016/S0304-4017(99)00044-8.
- 16
- 17 Dubey JP, Barr B, Barta JR, Bjerkås I, Björkman C, Blagburn B, Dwight BD & Lindsay  
18 DS. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia.  
19 *Intern. J. for parasitol*, 2002. 32:929-46. DOI: 10.1016/S0020-7519(02)00094-2.
- 20
- 21 Dubey JP. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean J.*  
22 *of Parasitol.*, 2003.41(1):1-16. DOI:10.3347/kjp.2003.41.1.1.
- 23
- 24 Dubey JP, Hemphill A, Calero-Bernal R, Schares G Neosporosis in animals. Boca  
25 Raton: *CRC Press*; 2017.
- 26
- 27 Fávaro JF, Da Silva AS, Campigotto G, Machado G, De Barros LD; Garcia JL.& Stefani  
28 LM. Risk factors for *Neospora caninum* infection in dairy cattle and their possible  
29 cause-effect relation for disease. *Microbial. Pathogen.*, 2017. 110:202-207. DOI:  
30 10.1016/j.micpath.2017.06.042.
- 31
- 32 Glombowsky P, Bottari NB, Klauck V, Favero JF, Sold'a NM, Baldissera MD, Perin G,  
33 Morsch VM, Schetinger MRC, Stefani LM, Da Silva AS. Oxidative stress in dairy cows

- 1 seropositives for *Neospora caninum* Comparative. *Immunol., Microbiol. and Infect.*  
2 *Diseas.*, 2017. 07:007. DOI: 10.1016/j.cimid.2017.07.007.
- 3
- 4 Gondim LFP, Sartor IF, Monteiro LA & Haritani M. *Neospora caninum* infection in an  
5 aborted bovine foetus in Brazil. *New Zealand Vet. J.*, 1999. 47(1):35. DOI:  
6 10.1080/00480169.1999.36106.
- 7
- 8 Gondim LFP, Pinheiro AM, Santos POM, Jesus EEV, Ribeiro MB, Fernandes HS,  
9 Almeida MAO., Freire SM, Meyer R, McAllister MM Isolation of *Neospora caninum*  
10 from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in  
11 gerbils. *Vet. Parasitol.*, 2001.101(1):1-7. DOI: 10.1016/s0304-4017(01)00493-9.
- 12
- 13 Gondim LFP, McAllister MM, Anderson-Sprecher RC, Bjorkman C, Lock TF, Firkins  
14 LD. Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum*  
15 oocysts. *J. of Parasitol.*, 2004. 90:1394–400. DOI: 10.1645/GE-359R.
- 16
- 17 Goodswen SJ, Kennedy PJ, Ellis JT. A review of the infection, genetics, and evolution  
18 of *Neospora caninum*: From the past to the present. *Infect., Genet. and Evol.*, 2013.13:  
19 133–150. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.08.012.
- 20
- 21 Goodswen SJ, Barratt JL, Kennedy PJ, Ellis JT. Improving the gene structure  
22 annotation of the apicomplexan parasite *Neospora caninum* fulfils a vital requirement  
23 towards an in silico-derived vaccine. *Intern. J. for parasitol.*, 2015. 45: 305-318. DOI:  
24 10.1016/j.ijpara.2015.01.006.
- 25
- 26 Hecker YP, Cantón G, Regidor-Cerrillo J, Chianini F, Morrell E, Lischinsky L, Ortega-  
27 Mora LM, Innes EA, Odeón A, Campero CM, Moore DP. Cell mediated immune  
28 responses in the placenta following challenge of vaccinated pregnant heifers with  
29 *Neospora caninum*. *Vet. parasitol.*, 2015.214:247-54. DOI:  
30 10.1016/j.vetpar.2015.10.015.
- 31
- 32 IBGE. Produção de Leite – São Paulo 2021, Disponível em: <  
33 <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/leite/br>>. Acesso: 06 de  
34 março de 2022.

- 1 Innes EA. The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora*  
2 *caninum*. *Parasitology. Cienc. anim. bras.*, 2007. 134(13): 1903-10. DOI:  
3 10.1017/S0031182007000194.  
4
- 5 Klauck V, Machado G, Paziano R, Radavelli WM, Santos DS, Berwaguer JC, Brauning  
6 P, Vogel FF, Silva AS. Relation between *Neospora caninum* and abortion in dairy  
7 cows: risk factors and pathogenesis of disease. *Microb. Pathogen.*, 2016. 92:46-49.  
8 DOI: 10.1016/j.micpath.2015.12.015.  
9
- 10 Klein C, Barua S, Liccioli S, Massolo A. *Neospora caninum* DNA in coyote fecal  
11 samples collected in an urban environment. *J. Wild Dis*, 2013. 55(1):196-199. DOI:  
12 <https://doi.org/10.7589/2018-02-027>.  
13
- 14 Llano HAB, Guimarães MS, Soares RM, Polo G, Silva AC. Soroprevalence and risk  
15 factors associated to *Neospora caninum* in dairy cattle herds in the municipality of  
16 pasto Colombia. *Rev. MZV*, 2013. 18(1): 3311-3316. DOI: 10.21897/rmvz.193.  
17
- 18 Macaldowie C, Maley SW, Wright S, Bartley P, Esteban-Redondo I, Buxton D, Innes  
19 EA. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora*  
20 *caninum* by two different routes in early pregnancy. *J. of comparat. Pathol.*,  
21 2004.131(2-3):142-56. DOI: 10.1016/j.jcpha.2004.02.005.  
22
- 23 Magalhães RS. Habilidades sociais no mercado do leite. *Revista de Administração de*  
24 *Empresas*, 2007. 47(2):15-25. DOI: 10.1590/S0034-75902007000200003.  
25
- 26 McAllister MM. Diagnosis and control of bovine neosporosis. *Vet. Clin.: Food Anim.*  
27 *Pract.*, 2016. 32: 443-63. DOI: 10.1016/j.cvfa.2016.01.012.  
28
- 29 Monney T & Hemphill A. Vaccines against neosporosis: what can we learn from the  
30 past studies?. *Experim. Parasitol.*, 2014. 140: 52-70. DOI:  
31 10.1016/j.exppara.2014.02.015.  
32
- 33 Pessoa GA, Martini AP, Trentin JM, Dalcin VC, Leonard CEP, Vogel FSF Impact of  
34 spontaneous *Neospora caninum* infection on pregnancy loss and subsequent

- 1 pregnancy in grazing lactating dairy cows. *Theriogenol.*, 2016. 85(3):519-527. DOI:  
2 10.1016/j.theriogenology.2015.09.034.
- 3
- 4 Regidor-Cerrillo J, Arranz-Solis D, Benavides J, Gomez-Bautista M, Castro-Hermida  
5 JA, Mezo M. *Neospora caninum* infection during early pregnancy in cattle: how the  
6 isolate influences infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local  
7 immune responses. *Vet. Res*, 2014.45:10. DOI: 10.1186/1297-9716-45-10.
- 8
- 9 Reichel MP, Ayanegui-Alcérreca AM, Gondim LF, Ellis JT. What is the global economic  
10 impact of *Neospora caninum* in cattle - The billion-dollar question. *Internat. J. for*  
11 *Parasitol.*, 2013. 43:133-142. DOI: 10.1016/j.ijpara.2012.10.022.

1 **3 OBJETIVOS**

2 **3.1 Objetivo Geral**

3  
4 Determinar a prevalência e acompanhar a cinética de IgG contra *N.*  
5 *caninum* em bovinos leiteiros

6  
7 **3.2 Objetivos Específicos**

8  
9 • Determinar a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T.*  
10 *gondii*, por meio da Imunofluorescência Indireta, em bovinos leiteiros de propriedades  
11 rurais situadas na região Oeste-noroeste do estado de São Paulo;

12 • Avaliar a ocorrência de fatores associados a soropositividade  
13 para *N. caninum* e *T. gondii* em bovinos leiteiros em bovinos leiteiros de propriedades  
14 rurais situadas na região Oeste-noroeste do estado de São Paulo;

15 • Acompanhar a cinética de IgG anti-*N. caninum* em matrizes e  
16 suas progênies;

17 • Calcular a taxa de transmissão transplacentária de *N. caninum*  
18 durante três gerações;

19 • Analisar fatores de risco para soropositividade para *N. caninum*  
20 por meio de um estudo de Coorte.

21

1 **4 ARTIGO A - SEROPREVALENCE AND RISK FACTORS FOR *Neospora***  
2 ***caninum* AND *Toxoplasma gondii* IN DAIRY CATTLE OF SAO PAULO STATE**

3 \*Artigo submetido para a Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária  
4

5 **Abstract**

6 *Neospora caninum* is considered one of the major causes of reproductive losses in  
7 cattle all over the world because of abortion and animal reposition. Whereas  
8 *Toxoplasma gondii* can present a risk for beef specially regarding milk transmission.  
9 This study aimed to evaluate the occurrence of anti-*N. caninum* and anti-*T. gondii*  
10 antibodies in dairy cattle from the west and northwest regions of the São Paulo State.  
11 A total of 653 serum samples from dairy cows were analyzed using Indirect Fluorescent  
12 Antibody Test (IFAT). Epidemiological data from farms was associated with serological  
13 results of animals by logistic regression based on the median values of antibody titers.  
14 The frequency of antibodies against *N. caninum* and *T. gondii* were 41.6% (272/653)  
15 and 11.5% (75/653), respectively A significant association between the serum  
16 occurrence of anti-*N. caninum* antibodies with breed, feed supplementation for calves,  
17 introduction of outside animals with reproductive problems and the gestation period  
18 was demonstrated. The presence of these factors increased the chance of  
19 seropositivity.

20  
21 **Keywords:** Neosporosis. Toxoplasmosis. Dairy Cattle. Seroprevalence. Risk factors.

22 **Introduction**

23 The milk production chain is one of the main economic activities in  
24 Brazil. The country is the fifth largest milk producer in the world which got R\$35 billion  
25 with its yield in 2019. The southeast region is the leader in milk production, responsible  
26 for 34.3% of the national yield (USDA, 2020) and 5% of the regional production comes  
27 from São Paulo State (Embrapa Gado de Leite, 2019).

28 *Neospora caninum* is one of the great causes of abortion in dairy cattle  
29 and the vertical transmission is considered the most relevant route (Dubey, 1999,  
30 2017; Reichel, et al., 2013). However, cattle can also be infected through horizontal

1 transmission, which can occur by ingestion of food or water contaminated by  
2 sporulated oocysts eliminated by definitive hosts of the parasite that are some species  
3 of canids (Dubey, 2017). In Brazil, *N. caninum* is widely distributed, with reports in 16  
4 Brazilian states (reviewed by Cerqueira-Cézar et al, 2017).

5           Although *Toxoplasma gondii* is not an important cause of abortion in  
6 cattle, its epidemiological importance in terms of infection in humans needs to be  
7 determined, mainly because the protozoan can be transmitted by the consumption of  
8 bovine products such as unpasteurized milk and raw meat (Dubey, 1986; Marana et  
9 al, 1995). The herd can be infected by the consumption of pastures contaminated with  
10 oocysts eliminated by felines. Clinical signs of toxoplasmosis are indistinguishable  
11 from neosporosis which makes *T. gondii* a mandatory differential diagnosis.  
12 Establishing the real causal agent is important for promoting efficiency in  
13 epidemiological knowledge and sanitation practices (Gomes, et al, 2020). The aim of  
14 the present study was to investigate the occurrence of anti-*N. caninum* and anti-*T.*  
15 *gondii* antibodies in dairy cattle from the west and northwest regions of São Paulo  
16 State, Brazil.

## 18 **Material And Methods**

### 19 Study Location and Ethics Approval

20           The study was conducted on ten dairy farms in the municipalities of  
21 Tupã (4 dairy farms), Iacri (1 dairy farms), Queiroz (1 dairy farms), Alto Alegre (2 dairy  
22 farms), and Penápolis (2 dairy farms), which belong to the west and northwest regions  
23 of São Paulo State, Brazil. This study was approved by the Committee of Animal Ethics  
24 from State University of Londrina (UEL) (CEUA 10/2019, number 23340.2018.90).

### 26 Sampling

27           Blood samples from dairy cows of Holstein, Jersey, Gir, Girolando,  
28 Jersolando, Brown Swiss, and crossbreds were obtained from 10 farms from March to  
29 April 2019. These farms used a semi-intensive livestock system, and they were chosen  
30 according to the region not yet studied. The sampling inclusion criteria of animals were  
31 all males and females' dairy cattle in farms which were up to 10 years of age, totaling  
32 653 animals, including 631 females and 22 males. The animals in this cross-sectional

1 study were divided into three age categories: 0–12 months, 12 to 24 months, and  $\geq$  24  
2 months.

3           The blood samples of the herds were deposited in tubes without  
4 anticoagulants and transported to the Center of Veterinary Medical Diagnosis  
5 (EMERGE, Tupã, São Paulo, Brazil) in isothermal boxes at 8°C. At the laboratory, the  
6 samples were centrifuged at  $3000 \times g$  for 10 min, and then the serum was transferred  
7 to a 2 mL microtube and stored at -20°C until serological analysis.

## 8 Serological Analysis

9           The presence of antibodies against *N. caninum* and *T. gondii* was  
10 verified by an indirect fluorescent antibody test (IFAT) using bovine anti-IgG marked  
11 with fluorescein (Fluoresceinisoithiocyanate - Sigma- Aldrich, San Luis, Missouri, USA)  
12 for both parasites and, slides fixed with tachyzoites from the NC-1 strain for *N. caninum*  
13 and from the RH strain for *T. gondii* (Conrad et al, 1993; Camargo, 1964). One positive  
14 and negative serum for the antibody presence were added to each slide as a control  
15 of analysis. For screening, serum samples were diluted to 1:50 and 1:100 and samples  
16 were considered positive for anti-*N. caninum* antibodies when calf and cow serum  
17 presented titers  $\geq 100$  (Antonello et al., 2015). For screening, the samples were diluted  
18 1:16 and 1:64 and were considered positive for anti-*T. gondii* antibodies when calf and  
19 cow serum presented titers  $\geq 1:64$  (Santos et al., 2020). All positive samples in  
20 screening analysis had their titers determined by complete dilution of sera performed  
21 until no fluorescent reaction was observed.

22

## 23 Epidemiological Characterization

24           To obtain epidemiological data, a questionnaire was applied regarding  
25 information about: structure and management of farms (variables: opened or closed  
26 market, crossbred of pure production system), zootechnical and health characteristics  
27 of animals (variables: sex, age, breed, food supplementation for calves, vaccines,  
28 trimerster wich occured reproductive problems, reproductive problems, neurological  
29 problems, previous disease, endo-ectoparasites), and environment (variables:  
30 presence of dogs, presence of cats, source of water for animals, wastewater  
31 destination, distance between water source and wastewater).

## 1 Statistics

2 Epi Info® 3.5.4 (CDC, Atlanta) and R environment (R Core Team,  
3 2016) were used for statistical analysis. For georeferencing, the QGIS software  
4 (QGIS.org Association - Free Software Foundation, Massachusetts, New York, USA)  
5 was applied using geospatial data from the Brazilian Institute of Geography and  
6 Statistics (IBGE, 2010).

7

## 8 Results

9 Blood samples from 653 animals (table 1) were collected, being 251  
10 (38.4%) in the west and 402 (61.6%) in the northwest region (653) of São Paulo State.  
11 Antibodies against *N. caninum* were verified in 41.6% (272/653 – CI: 37.93 - 45.47%)  
12 of these animals. The occurrence of the protozoan antibodies was 33.5% (84/251 CI:  
13 27.66 - 39.67%) in the west region and 46.8% (188/402 CI: 41.94 - 51.65%) in the  
14 northwest region (figure 1). *N. caninum* was observed in 100.00% (10/10) of the farms  
15 studied (table 2).

16 Regarding animal ages, 12.4% (81/653) were 0–12 months, 16.4%  
17 (107/653) were 12 to 24 months, and 71.2% (465/653) were ≥ 24 months. Although no  
18 statistical significance was observed among age and seroprevalence of parasites, a  
19 major part of the prevalence occurred in those ≥24 months old (44.1% - 205/465).

20 The model obtained by multivariate logistic regression demonstrated  
21 a significant association between the seropositivity for *N. caninum* with the following  
22 factors: breed, food supplementation for calves, presence of reproductive problems in  
23 animals, and reproductive period with a major number of reproductive losses. Herds  
24 composed of crossbred cows presented 2.08 (Odds-ratio Confidence Interval (OR CI):  
25 1.30- 3.31) times more chances of being seropositive in comparison to *N. caninum*. In  
26 the same way, farms that not supplemented calves were 4.67 (OR CI: 2.93 - 7.45)  
27 times more likely to be seropositive; and for cows bought with reproductive problems,  
28 the chances of being seropositive were 5.02 (OR CI: 3.14 - 8.00) times (Table 3). Each  
29 property followed specific diets for the calves, and the main supplements used were  
30 vitamins, minerals, and protein sources.

31 Animals presenting reproductive problems as abortion, retained  
32 placenta, and return to estrus in all three trimesters of pregnancy were observed 272  
33 (41.65%). As demonstrated by the model, reproductive problems were associated to

1 *N. caninum* infection mainly for farms that had an abortion episode in the second  
2 trimester of pregnancy which had 5.02 times more chances of being soropositive for  
3 the protozoan than cows with an abortion in the third trimester (Table 3).

4 *T. gondii* was verified in 11.5% (75/653 CI: 9.26 - 14.16%) of the  
5 animals, with 12.7% (32/251 CI: 8.89 - 17.52%) of them located in the northwest region  
6 and 10.7% (43/403 CI:8.04 - 14.10%) located in the west region and it was observed  
7 in 90% (9/10) of the farms studied (Table 2). There were no factors associated with the  
8 presence of *T. gondii* antibodies in animals.

## 10 Discussion

11 *Neospora* seropositivity in cattle was 41.6% (272/653). Similar results  
12 were found in the Presidente Prudente region of the São Paulo State, reporting 35.5%  
13 (145/408) of animals positive and a risk associated with the presence of anti-*N.*  
14 *caninum* in dairy cattle when compared to beef cattle (OR: 1.78), analysed using the  
15 immunoenzymatic ELISA test, which was explained by differences in management and  
16 rearing systems (Sartor et al., 2005). The municipality of Presidente Prudente is in the  
17 extreme west of the São Paulo State and has high activity in dairy farming and similar  
18 geophysical conditions to the region in the present study. The open management  
19 carried out in the studied properties (7/10) and the association with bought animals  
20 that presented later reproductive problems emphasizes the risk of neosporosis in herds  
21 when an exchange of animals between farms without veterinary control is used.

22 The seropositivity of *N. caninum* was evaluated in dairy cattle from the  
23 southeast region of São Paulo by Sartor et al. (2003) using two methodologies (ELISA  
24 and IFAT), and they found almost 47% positivity from 521 animals combining the two  
25 methodologies. Although a more reliable result comes from a combination of more than  
26 one serological test, IFAT is cheaper and more specific than ELISA. The authors also  
27 described anti-*N. caninum* antibodies in all cows that presented an abortion episode.  
28 Other studies have shown an association between *N. caninum* presence and abortion.  
29 These studies reported an average of 56.8% (23.3% to 91.7%) of *N. caninum*  
30 prevalence among animals in which abortion had occurred (Boas et al., 2015; Brunh  
31 et al., 2013; Chiebao et al., 2015; Corbellini et al., 2002; Hein et al., 2012; Oshiro et  
32 al., 2007; Pessoa et al., 2016).

33 In the present study, pregnancy was observed at the time of blood  
34 collection in 23.3% (152/653) of cows; among them only 17.1% (26/152) presented an

1 abortion episode and the presence of anti-*N. caninum* antibodies. Even without  
2 statistical significance, farmers described other clinical signs commonly seen in  
3 neosporosis, such as retained placenta, repeated heat, and parturition complications.  
4 It was also observed that pregnant cows seropositive to *Neospora*, which did not  
5 presented abortion, calved a stillborn. The clinical signs are in accordance with other  
6 studies that demonstrated a statistical association with abortion and *N. caninum*  
7 seroprevalence (Boas et al., 2015; Brunh et al., 2013; Chiebao et al., 2015; Corbellini  
8 et al., 2002; Hein et al., 2012; Oshiro et al., 2007; Pessoa et al., 2016).

9           In the northwest region of São Paulo, Curci et al. (2017) observed a  
10 *N. caninum* seroprevalence of 35.1% (332/945) in dairy herds from a family farming  
11 system by IFAT method. Using ELISA, Piagentini (2003) found an anti-*N. caninum*  
12 antibodies in 30.8% (114/370) of *Bos taurus* cattle located in the Avaré municipality  
13 (midwest region of São Paulo). Although these findings were not from the same region  
14 of the present study, it shows how widespread neosporosis is in family farming  
15 livestock in São Paulo and it could negatively affect the dairy yield in the state. This is  
16 a concern for dairy farming in Brazil because 52% of all dairy yield in the country comes  
17 from family farming (CTLeite, 2019).

18           Even with a high range in animal age, there was no statistically  
19 significant association with *Neospora* seropositivity. Some studies have demonstrated  
20 this association with *N. caninum* infection and animal age (Dyer et al., 2000;  
21 Guimarães, 2002; Sanderson et al., 2000;) which hypothesized that the cause is the  
22 exposure time of hosts to parasite forms. This was based on the results of previous  
23 studies that showed younger animals with lower seroprevalence compared to animals  
24 above 24 months of age. The lifetime of these animals in contact with a contaminated  
25 environment probably increases the chances of infection (Bastos et al., 2019; Dyer et  
26 al., 2000; Guimarães, 2002;).

27           In this study, evidence of a higher susceptibility to neosporosis in  
28 calves without dietary supplementation was observed. Bartles et al. (1999) found an  
29 association with farm management and the risk of infection in dairy herds from the  
30 Netherlands. According to Tokarnia et al. (2000), the unequilibrated management of  
31 nutrients may occur at many levels and cause metabolic disturbances, resulting in a  
32 decrease in productivity and immunity. These decreases may provide reactivation of  
33 the parasite and cause clinical signs. Non-supplemented calves are 4.67 times more  
34 likely seropositive for *N. caninum* and it was associated with farm management, as the

1 farms which offered the best nutrition program to cattle also had the most efficient  
2 sanitation parameters (Chiebao, 2010).

3 All farms with crossbred animals used open-market management  
4 while farms with European cattle used a closed-herd market. This absence of the  
5 introduction of foreign animals in the farms with European cows probably decreased  
6 the chances of transmission, which may explain their low rates of seropositive animals  
7 and low rates of *Neospora* transmission by the vertical pathway. The non-replacement  
8 of animals from other herd can be a protective factor against *N. caninum* infection in  
9 the dairy farm. The study that analyzed the impact of *N. caninum* on the reproductive  
10 parameters of 434 Holstein dairy cows belonging to a closed herd in Brazil even finding  
11 an association of risk for age at first calving and services by conception, they  
12 highlighted the low seropositivity of the animals due to closed handling (Barros et al.,  
13 2021).

14 Gindri et al. (2018) reported that 31.1% (100/322) of dairy cattle from  
15 the Rio Grande do Sul State were seropositive for *N. caninum*, with no statistical  
16 association with the productive system, reproductive management, breed, age, nor  
17 parturition number. However, purchase and animal substitution showed a significant  
18 correlation with anti-*N. caninum* antibodies. In Rondônia, both populations of dairy and  
19 beef/dairy herd had a higher risk of infection with *N. caninum* (Aguiar et al, 2006).

20 According to Dubey (2017), the pathogenesis of abortion is not  
21 completely clear. It is known that abortion caused by *Neospora* occur more in the  
22 second and third trimesters of pregnancy, but that in this gestational phase  
23 transplacental infection is very common; however, miscarriage rarely occurs.  
24 Nishikawa (2001) and Innes et al. (2005) affirmed that a seropositive cow could present  
25 with reactivation of *N. caninum* during pregnancy due to modulation of the humoral and  
26 cellular pathways of the immune system. This modulation is expressed by a decrease  
27 in cellular response, which causes the change of bradyzoites to tachyzoites and,  
28 consequently, the invasion of the placental barrier and infection of the fetus. In the  
29 present study, an association was found between the third trimester of pregnancy and  
30 *N. caninum* infection. Stenlend et al. (1999) and Almeria et al. (2009) showed higher  
31 IgG titers in the third trimester when compared to others, suggesting that the most  
32 probable period of *Neospora* reactivation occurs between the fourth and sixth months  
33 of pregnancy.

1                   This study verified seropositivity for *T. gondii* in 11.5% of the  
2 animals.%. Ogawa et al. (2005) observed the seroprevalence of *T. gondii* and *N.*  
3 *caninum* in dairy cattle from 90 farms in 12 municipalities in the northern region of  
4 Paraná and demonstrated that 26.0% (102/392) and 11.4% (45/392) of the animals  
5 were seropositive for *T. gondii* and *N. caninum*, respectively. In this population, only  
6 1.0% (4/392) of cows were positive for both protozoa, which was in accordance with  
7 the low seroprevalence of 4.0% (27/670) found in this study for both parasites. In Brazil,  
8 *T. gondii* seroprevalence in cattle varies among regions and diagnostic methodology.  
9 The seroprevalence amplitude of positive animals is approximately 1%–49% and  
10 studies highlight that the cows' resistance to *T. gondii* may interfere with prevalence  
11 rates and transmission (Albuquerque, et al, 2005; Daguer et al, 2004; Dubey, 1986;  
12 Costa, 1978; Garcia et al, 1999; Marana et al, 1995). This resistance of cows to  
13 *Toxoplasma* may be the reason for lower seroprevalence found in this study when  
14 compared to *N. caninum*.

15                   A study conducted in 58 dairy properties in Western Paraná, found a  
16 risk association of co-infection with *N. caninum* and *T. gondii*. The prevalence of co-  
17 infection was 8.7% (34/390), indicating to be a risk-associated factor mainly for  
18 abortion (Santos et al., 2020). Serological screening of *N. caninum* and *T. gondii* for  
19 the herd is essential to detect the real epidemiological prevalence of the disease and  
20 direct towards its control and eradication (Dubey & Schares, 2011).

## 21

## 22 **Conclusion**

23                   Herein, we described a high frequency of antibodies to *N. caninum* in  
24 study the studied farms, however, there was a low seropositivity for *T. gondii*. There  
25 was association between *N. caninum* infection and reproductive problems, however,  
26 there was not with *T. gondii*. This showed the importance of neosporosis in dairy cattle  
27 from study region, thus, the inclusion of this parasite in animals with reproductive  
28 disorders is fundamental for future diagnosis.

## 29

## 30 **Acknowledgments**

31                   We would like to acknowledge the financial support of Nacional  
32 Institute on Science and Technology - INCT/Leite (number 465725/2014-7) and the  
33 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) and  
34 to all those involved who contributed to the research.

1

## References

- 2 Aguiar DM, Cavalcante GT, Rodrigues AAR, Labruna MB, Camargo LMA, Camargo  
3 EP & Gennari SM. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and  
4 dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk  
5 factors. *Vet Parasitol* 2006; 142(1-2): 71-77.  
6 <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.06.014>.
- 7 Albuquerque G, Munhoz A, Flausino W, Silva R, Almeida C, Medeiros S & Lopes C.  
8 Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle from Sul  
9 Fluminense Paraíba Valley, State of Rio de Janeiro. *Rev Bras Parasitol Vet*  
10 2005; 14(3):125-8. PMID: 16229757.
- 11 Almeria S, Nogareda C, Santolaria P, Garcia-Ispierto I, Yaniz JL & Lopez-Gatius F.  
12 Specific anti-*Neospora caninum* IgG1 and IgG2 antibody responses during  
13 gestation in naturally infected cattle and their relationship with gamma interferon  
14 production. *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 130(1-2):35-42.  
15 <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.01.003>.
- 16 Anderson ML, Andrianarivo AG & Conrad PA. Neosporosis in cattle. *Anim Reprod*  
17 *Sci* 2000; (60–61):417-431. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00117-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00117-2).
- 18 Antonello AM, Camillo G, Weber A, Braunig P, Sangioni LA, & Vogel FSF. Dinâmica  
19 sorológica de anticorpos contra *Neospora caninum* durante a gestação de vacas  
20 naturalmente infectadas. *Cienc. Anim Bras.* 2015; 16(4), 553–559.  
21 <https://doi.org/10.1590/1089-6891v16i428127>.
- 22 Bastos SB, Martins AT, Sammi AS, Martins FDC, Cunha IAL, Barros LD & Garcia, J.  
23 L. *Neospora caninum*: seroepidemiology of cows and dogs from milk farms of  
24 Cunha, São Paulo, Brazil. *Semin Cienc Agrar* 2019; 6(Supl2):3123-3132.  
25 <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n6Supl2p3123>.
- 26 Barros LD, Bogado ALG, Furlan D, Jardim AM, Okano W, Silva LC & Garcia JL.  
27 Effects of *Neospora caninum* on reproductive parameters in dairy cows from a  
28 closed herd in Brazil. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 2021; 23:100524.  
29 <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100524>.
- 30 Bartels CJM, Wouda W & Schukken YH. Risk factors for *Neospora caninum*-  
31 associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 a 1997).  
32 *Theriogenology* 1999; 52(2):247-257. [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00126-0)  
33 [691X\(99\)00126-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00126-0)
- 34 Boas RV, Pacheco TA, Melo ALT, Oliveira ACS, Aguiar DM & Pacheco RC. Infection  
35 by *Neospora caninum* in dairy cattle belonging to family farmers in the northern  
36 region of Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2015;24(2): 204-208.  
37 <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612015035>.

- 1 Bruhn FRP, Daher DO, Lopes E, Barbieri JM, Rocha CMBM & Guimarães AM.  
2 Factors associated with seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in  
3 southeastern Brazil. *Trop Anim Health Prod* 2012;45(5):1093-1098.  
4 <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-012-0330-y>
- 5 Camargo ME. Introdução as técnicas de imunofluorescência. *J Bras Patol Med Lab*  
6 1974;10(1):143–171.
- 7 Cerqueira-Cezar CK, Calero-Bernal R, Dubey JP & Gennari SM. All about  
8 neosporosis in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet* 2017;26(3):253-279.  
9 <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612017045>
- 10 Chiebao DP (2010). *Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum, anti-Brucella*  
11 *abortuse anti-Leptospira spp. em bovinos do Estado do Pará: estudo de*  
12 *possíveis variáveis para ocorrência de infecção*. (Dissertação de Mestrado).  
13 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.  
14 Available in <[https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-](https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-10022011-135252/pt-br.php)  
15 [10022011-135252/pt-br.php](https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-10022011-135252/pt-br.php)>. Accessed: Jan 07, 2021.
- 16 Chiebao DP, Valadas SY, Minervino AH, Castro V, Romaldini AH, Calhau AS, De  
17 Souza RA, Gennari SM, Keid LB, Soares RM. Variables associated with  
18 infections of cattle by *Brucella abortus*, *Leptospira spp.* and *Neospora spp.* in  
19 Amazon Region in Brazil. *Transbound Emerg Dis* 2015;62(5):e30-e36.  
20 <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12201>.
- 21 Corbellini LG, Driemeier D, Cruz CFE, Gondim LFP & Wald V. Neosporosis as a  
22 cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Vet*  
23 *Parasitol* 2002;103(3):195-202. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(01)006008)  
24 [4017\(01\)006008](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(01)006008).
- 25 Costa AJ & Costa EP. Frequência de bovinos reagentes à imunofluorescência indireta  
26 para *Toxoplasma gondii* em Poços de Caldas, MG, Brasil. *Arq. da Esc. de Vet.*  
27 *da UFMG* 1978;-(1):47-51.
- 28 Conrad PA, Sverlow K, Anderson M, Rowe J, BonDurant R, Tuter G, Breitmeyer R,  
29 Palmer C, Thurmond M, Ardans A, Dubey JP, Duhamel D, Barr B. Detection of  
30 serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora*  
31 infections. *J Vet Diagn Invest* 1993;5(4):572-8.  
32 <http://dx.doi.org/10.1177/104063879300500412>.
- 33 Curci VCM (2017). Soroprevalência da neosporose em bovinos de leite criados em  
34 sistema de agricultura familiar. *Ver. Acad. Cienc. Anim.*, 15(Suppl 2): 37–38.  
35 <https://doi.org/10.7213/academica.15.s02.2017.18>.
- 36 Daguer, H., Hamann, W., Vicente, R.T., Amendoeira, M. R. R. (2003).  
37 Soropositividade para anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos da região

- 1 Sudoeste doParaná, Brasil. *Vet. Univ. Rural: Série Ciências da Vida*, 23(1):161-  
2 162.
- 3 Dubey, J. P. (1986). A review of toxoplasmosis in cattle. *Veterinary Parasitology*,  
4 22(3-4): 177-202.
- 5 Dubey, J. P. (1999). Recents advances in Neospora and neosporosis. *Veterinary*  
6 *Parasitology*, 84: 349 -367.
- 7 Dubey, J. P., Hemphill, A., Calero-Bernal, R. & Schares, G. (2017). Neosporosis in  
8 animals. *Boca Raton: CRC Press*.
- 9 Dubey, J. P., & Schares, G. (2011). Neosporosis in animals - the last five years. *Vet.*  
10 *Parasitol.*, 180(1-2), 90-108. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.05.031
- 11 Dyer, R. M., Jenkins, M. C., Kwok, O. C., Douglas, L. W. & Dubey, J. P. (2000).  
12 Serologic survey of *Neospora caninum* infection in a closed dairy cattle herd in  
13 Maryland: risk of serologic reactivity by production groups. *Vet Parasitol*,  
14 90(3):171-81. [http://dx.doi.org/10.1016/s0304-4017\(00\)00253-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-4017(00)00253-3).
- 15 Embrapa Gado De Leite. Centro de Inteligência do Leite - CILeite. (2019). Available  
16 form: [https://www.cileite.com.br/leite\\_numeros\\_producao](https://www.cileite.com.br/leite_numeros_producao).
- 17 Figueira, S. R. & Belik, W. (1999). Transformação no Elo Industrial da Cadeia  
18 Produtiva do Leite. *Revista Cadernos de Debate, Núcleo de Estudos e*  
19 *Pesquisas em Alimentos da UNICAMP*, VII.
- 20 Garcia, J. L., Navarro, I. T., Ogawa, L., Oliveira, R. C. (1999). Soroprevalência do  
21 *Toxoplasma gondii*, em suínos, bovinos, ovinos e equinos, e sua correlação com  
22 humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do  
23 Paraná- Brasil. *Cienc. Rural*, 29(1):91-97.
- 24 Gindri, P. C., Mion, B., Pradieé, G., Bialves, T. S., Souza, G. N., Dellagostin, A. O.,  
25 Schneider, A., Pegoraro, L. M. C. (2018). Seroprevalence estimate and  
26 associated risk factors for neosporosis in dairy cattle in the northwest region of  
27 Rio Grande do Sul State, Brazil. *Cienc. Rural*, 48(7).  
28 <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170921>.
- 29 Guimarães Júnior, J. S. & Gennari, S. M. (2002). *Neospora caninum* em bovinos de  
30 *exploração leiteira: soroprevalência, fatores de risco e comparação de técnicas*  
31 *sorológicas*. (Tese de Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e  
32 Zootecnia, Universidade de São Paulo. Available in <  
33 <https://repositorio.usp.br/item/001306559>>. Accessed: Jan 07, 2021.
- 34 Gomes, D. F. C., Krawczak, F. C., de Oliveira, C. H. S., Ferreira Júnior, A.,  
35 Fernandes, E. K. K., Lopes, W. D. Z., Sevá, A. P., Gennari, S. M. (2020).  
36 *Toxoplasma gondii* in cattle in Brazil: a review. *Rev. Bras. de Parasitol. Vet.* 29  
37 (1). <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019106>

- 1 Guerra, J. L., Okano, W., Bogado, A. L. G., Nino, B. de S. L., Martins, F. D. C.,  
2 Cardim, S. T., Barros, L. D. de, & Garcia, J. L. (2019). Anti-*Neospora caninum*  
3 antibodies in beef cattle from the northern region of Paraná state, Brazil. *Cienc.*  
4 *Rural*, 49(5), 3–6. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180869>
- 5 Haddad, J. P. A., Dohoo, I., Vanleeuwen, J. A., Keefe, G. & Weersink, A. (2005).  
6 Perdas na produção e custos no tratamento em rebanhos leiteiros canadense  
7 infectados com *Neospora caninum*. In: *Anais... I Fórum Brasileiro de Estudos*  
8 *sobre Neospora caninum*. Available in <  
9 [http://cbpv.com.br/artigos/CBPV\\_Anais\\_Neospora.pdf](http://cbpv.com.br/artigos/CBPV_Anais_Neospora.pdf)>. Accessed: Jan 12,  
10 2021.
- 11 Hein, H. E., Machado, G., Miranda, I. C. S., Costa, E. F., Pellegrini, D. C. P.,  
12 Driemeier, D., Corbellini, L. G. (2016). Neosporose bovina: avaliação da  
13 transmissão vertical e fração atribuível de aborto em uma população de bovinos  
14 no Estado do Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras*, 32(5): 396-400.  
15 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012000500006>.
- 16 IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Senso 2010. (2010). Available  
17 in: <<https://censo2010.ibge.gov.br/>>. Accessed: Nov. 10, 2020.
- 18 Innes, E. A., Wright, S., Bartley, P., Maley, S., Macaldowie, C., Esteban-Redondo, I.,  
19 Buxton, D. (2005). The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet*  
20 *Immunol Immunopathol*, 108(1-2):29-36.  
21 <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.07.004>.
- 22 Marana, E. R. M., Venturini, A.C. H., Freire, R. L., Vidotto, O., Navarro, I. T. (1995).  
23 Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos de leite, do norte  
24 do Paraná- Brasil. *Semina: Cienc. Agrar.*, 16(1):40-42.  
25 <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.1995v16n1p40>.
- 26 Munhoz, A., Jacintho, A. P. P. & Machado, R. Z. (2011). Bovine Abortion Associated  
27 with *Neospora caninum*: Diagnosis and Epidemiological Aspects of a Dairy  
28 Cattle Herd in the Northeast Region of São Paulo State, Brazil. *Braz J Vet*  
29 *Pathol*, 4(2), 112-116. Available in: <[http://bjvp.org.br/wp-](http://bjvp.org.br/wp-content/uploads/2015/07/DOWNLOAD-FULL-ARTICLE-20-20881_2011_7_5_39_32.pdf)  
30 [content/uploads/2015/07/DOWNLOAD-FULL-ARTICLE-20-](http://bjvp.org.br/wp-content/uploads/2015/07/DOWNLOAD-FULL-ARTICLE-20-20881_2011_7_5_39_32.pdf)  
31 [20881\\_2011\\_7\\_5\\_39\\_32.pdf](http://bjvp.org.br/wp-content/uploads/2015/07/DOWNLOAD-FULL-ARTICLE-20-20881_2011_7_5_39_32.pdf)>. Accessed: Nov. 10, 2020.
- 32 Nishikawa, Y., Inoue, N., Xuan, X., Nagasawa, H., Igarashi, I., Fujisaki, K., Otsuka,  
33 H., Mikami, T. (2001). Protective efficacy of vaccination by recombinant vaccinia  
34 virus against *Neospora caninum* infection. *Vaccine*, 19(11-12):1381-90.  
35 [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00389-3](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00389-3).
- 36 Ogawa, L., Freire, R. L., Vidotto, O., Gondim, L. F. P. & Navarro, I. T. (2005).  
37 Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy  
38 cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet.*  
39 *Zootec*, 57(3):312-316. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352005000300006>.

- 1 Oshiro, L. M., Matos, M. F. C., Oliveira, J. M., Monteiro, L. A. R. C. & Andreotti, R.  
2 (2017). Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle from the state  
3 of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, 16(3): 133-138.  
4 <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612007000300004>.
- 5 Pessoa, G. A., Martini, A. P., Trentin, J. M., Dalcin, V. C., Leonardi, C. E., Vogel, F.  
6 S., de Sá Filho, M. F., Rubin, M. I., Silva, C. A.(2016). Impact of spontaneous  
7 *Neospora caninum* infection on pregnancy loss and subsequent pregnancy in  
8 grazing lactating dairy cows. *Theriogenology*. 85(3):519-27.  
9 <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.034>.
- 10 Piagentini, M. & Sartor, I. F. (2003). *Dinâmica da infecção por Neospora caninum em*  
11 *rebanhos leiteiros do município de Avaré/SP*. (Dissertação de mestrado).  
12 Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,  
13 36 f. Available in <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/89321>>. Accessed:  
14 Nov 07, 2020.
- 15 Ragozo, A. M. A., Paula, V. S. O., Souza, S. L. P., Bergamaschi, D.P.& Gennari, S.  
16 M. (2003). Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos  
17 procedentes de seis estados brasileiros. *Rev Bras Parasitol Vet*, 12(1): 33-37.  
18 Available in:< [http://www.ufrj.br/rbpv/1212003/c12133\\_37.pdf](http://www.ufrj.br/rbpv/1212003/c12133_37.pdf)> Accessed: Nov.  
19 28, 2020.
- 20 Reichel, M. P., Ayanegui-Alcérreca, A. M., Gondim, L. F.& Ellis, J. T. (2013). What is  
21 the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar  
22 question. *J Parasitol*, 43(2):133-42.  
23 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.022>.
- 24 Sanderson, M. W., Gay, J. M. & Baszler, T. V. (2000). *Neospora caninum*  
25 seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern  
26 United States. *Vet Parasitol*. 90(1-2):15-24. [http://dx.doi.org/10.1016/s0304-](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-4017(00)00234-x)  
27 [4017\(00\)00234-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-4017(00)00234-x).
- 28 Santos, J.R., Grando, L., Nino, B. S. L., Langoni, H., Cunha, I. A. L., Barros, D. L., &  
29 Zulpo, D. L. (2020). *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*: seroprevalence  
30 and associated factors in cows from milk farms of Toledo, Parana, Brazil.  
31 *Semina: Ciências Agrárias*, 41(5):1581-1590. [http://dx.doi.org/10.5433/1679-](http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n5p1581)  
32 [0359.2020v41n5p1581](http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n5p1581).
- 33 Sartor, I. F., Garcia Filho, A., Vianna, L. C., Pituco, E. M., Dal Pai, V. & Sartor, R.  
34 (2005). Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros  
35 de corte da região de Presidente Prudente, SP. *Arq. Inst. Biol.*, 72(4): 413-418.  
36 Available  
37 in:<[http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v72\\_4/sartor.PDF](http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v72_4/sartor.PDF)>  
38 Accessed: Nov. 12, 2020.

- 1 Sartor, I. F., Hasegawa, M. Y., Canavessi, A. M. O. & Pinckney, R. D. (2003).  
 2 Ocorrência de anticorpos de *Neospora caninum* em vacas leiteiras avaliados  
 3 pelos métodos ELISA e RIFI no município de Avaré, SP. *Semina Cienc Agrar*,  
 4 24(1): 3-10. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2003v24n1p3>.
- 5 Stenlund, S., Kindahl, H., Magnusson, U., Uggla, A., Bjorkman, C. (1999). Serum  
 6 antibody profile and reproductive performance during two consecutive  
 7 pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.*,  
 8 85(4):227-34. Available in:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1048872518>>.  
 9 Accessed: nov. 12, 2020.
- 10 Tokarnia, C. H., Döbereiner, J. & Peixoto, P. V. Deficiências minerais em animais de  
 11 fazenda, principalmente bovinos em regime de campo. *Pesq. Vet. Bras.*, 20(3).  
 12 <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2000000300007>.
- 13 USDA.(2021). *United States Department of Agriculture. Dairy: World Markets and*  
 14 *Trade*. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/dairy.pdf>
- 15 Zilbersztajn, D. (2000). Conceito geral, evolução e apresentação dos sistemas  
 16 agroindustrial. In: ZILBERSZTAJN, D. e NEVES, M. F. *Economia e gestão de*  
 17 *negócios agroalimentares*. São Paulo: Pioneira.

Mesoregion	Age of animals (months)		
	0-12 (%)	12-24 (%)	> 24 (%)
West-northwest	40/653 (6.12)	41/653 (6.28)	170/653 (26.03)
West	41/653 (6.28)	66/653 (10.11)	295/653 (45.18)
<b>Total</b>	<b>81/653 (12.40)</b>	<b>107/653 (16.39)</b>	<b>465/653 (71.21)</b>

19 **Table 1** – Number of samples collected from cattle of west-northwest and west  
 20 regions of São Paulo State, Brazil, by their age - 2019.

Mesoregion	<i>N. caninum</i> farms	<i>N. caninum</i> Animals	<i>T. gondii</i> farms	<i>T. gondii</i> Animals
	Positive/Total (%)	Positive/Total (%)	Positive/Total (%)	Positive/Total (%)
West-northwest	6/6 (100.0)	84/251 (33.5)	6/6 (100.0)	32/251 (12,7)
West	4/4 (100.0)	188/402 (46.8)	3/4 (75.0)	43/403 (10.7)
<b>Total</b>	<b>10/10 (100.0)</b>	<b>272/653 (41.6)</b>	<b>9/10 (90.0)</b>	<b>75/653 (11.5)</b>

23 **Table 2-** Frequency of anti-*Neospora caninum* and anti-*Toxoplasma gondii* antibodies  
 24 in dairy cattle from São Paulo State, Brazil - 2019.

Variables	Positive/Total (%)	P*	OR (CI 95%)	P***	Adjusted OR (CI 95%)
<b>Breed</b>					
Crossbred	153/292 (52.4)	<0.0001	2.23 (1.62-3.07)	0.0016	2.08 (1.30-3.31)
Pure Breed	119/361 (33.0)				
<b>Food supplementation for calves</b>					
Yes	209/529 (39.5)	0.0223	1.58 (1.06-2.34)	< 0.0001	4.67 (2.93-7.45)
No	63/124 (50.8)				
<b>Bought animals that presented later reproductive problems</b>					
Yes	188/402 (46.8)	0.0007	1.74 (1.25-2.42)	0.0007	5.02 (3.14-8.00)
No	84/251 (33.5)				
<b>Trimester of gestation where cows had reproductive problem</b>					
First	31/112 (27.7)	0.0034	0.46 (0.24-0.86)	0.0007	0.88 (0.55-1.41)
Second	208/468 (44.4)		0.96 (0.52-1.80)		5.02 (3.14-8.00)
Third	33/73 (45.2)				

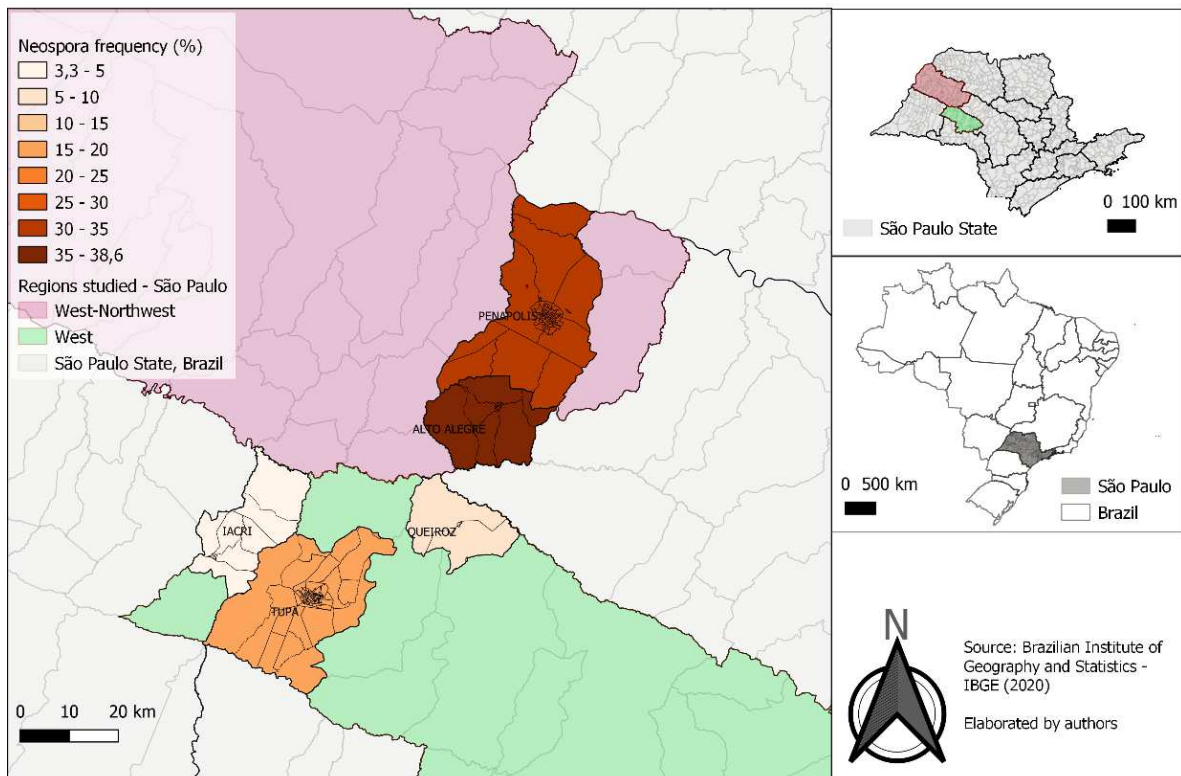
1 \*Bivariate

2 \*\*Multiple Logistic Regression

3 **Table 3** - Variables statistically associated with the prevalence of anti-*Neospora*  
4 *caninum* antibodies in bovine milk breeding properties of the west-northwest and west  
5 region of São Paulo State, Brazil - 2019.

6

7



1  
 2 **Figure 1-** Frequency of anti-*Neospora caninum* antibodies detected by IFAT in  
 3 bovine milk breeding cities in the northwest region of Sao Paulo State, Brazil.  
 4

1 **5 ARTIGO B *Neospora caninum*: Cinética de IgG bovinos leiteiros naturalmente**  
2 **infectadas em São Paulo, Brasil**

3 **Abstract**

4 This study aimed to evaluate the occurrence of *Neospora caninum* transmission in  
5 calves, heifers, and naturally infected dairy cows and to record the kinetics of  
6 antibodies to this protozoan in bovines. A total of 152 pregnant dams were selected  
7 from ten rural properties in the west and west-northwest regions of the State of São  
8 Paulo. Females whose first blood collection occurred from birth, before and up to the  
9 last third of gestation were followed, totalizing 37 animals. The indirect  
10 immunofluorescence reaction (IFAT) was used for the serodiagnosis. It was observed  
11 that 48.6% (18/37) of the heifer cows were seroreagent for *N. caninum* and 51.4%  
12 (19/37) negative. An additional risk of 88.9% on the occurrence of anti-*N. caninum*  
13 antibodies were observed in first progeny (P1) that was born from seroreagent dams  
14 ( $p < 0.001$ ) and transplacental transmissions originating from pre- and postnatal  
15 infection, 100.0% (3/3) of the second progeny (P2) remained reagent before the  
16 ingestion of colostrum. Regarding the group of non-reactive calves, it was observed  
17 that the frequency between generations in the horizontal transmission was 26.3%  
18 (5/19) at three months and 60% (6/10) at six months in the second generation (P1). It  
19 was observed that calves born from sero-reactive dams presented higher titers in the  
20 phases before colostrum ( $p = 0.0002$ ) at 90 days of life ( $p = 0.0474$ ) than those born from  
21 seronegative dams. *N. caninum* is widely spread in the studied region and this implies  
22 in an urgent need of control and prevention measures. This demonstrates that *N.*  
23 *caninum* is widely disseminated in the localized region. In addition, a high rate of  
24 infection by *N. caninum* for the subsequent emergency alerts for prevention measures  
25 in the investigated animals.

26  
27 **Keywords:** Antibody IgG; dairy cow; transplacental and horizontal infection;  
28 Neosporosis.

29  
30  
31  
32

## 1 **Resumo**

2   Objetivou-se avaliar a ocorrência da transmissão de *Neospora caninum* em bezerras,  
3   novilhas e vacas leiteiras naturalmente infectadas e monitorar a cinética de anticorpos  
4   para esse protozoário nas bovinas. Foram selecionadas 152 matrizes prenhes,  
5   provenientes de dez propriedades rurais pertencentes a região Oeste e Oeste-  
6   noroeste do estado de São Paulo, das quais, seguiram no acompanhamento apenas  
7   fêmeas cujo a primeira coleta de sangue ocorresse desde o nascimento, antes do  
8   colostro até o último terço gestacional, totalizando 37 animais. Foi utilizada a reação  
9   de imunofluorescência indireta (IFAT) para o sorodiagnóstico. Observou-se que 48,6%  
10   (18/37) das matrizes das bezerras eram sororreagentes para *N. caninum* e 51,4%  
11   (19/37) negativas. Foi observado um risco adicional de 88,9% de ocorrência de  
12   anticorpos anti-*N. caninum* em P1 que nasceram de matrizes sororreagentes  
13   ( $p < 0,001$ ), sendo que das transmissões transplacentárias oriundas de infecção pré e  
14   pós-natal, 100,0% (3/3) das progênie (P2) permaneceram reagentes antes da  
15   ingestão do colostro. Já em relação ao grupo de bezerras não reagentes, foi  
16   observado que a frequência entre as gerações na transmissão horizontal foi de 26,3%  
17   (5/19) aos três meses e 60% (6/10) aos seis meses da segunda geração (P1).  
18   Isso demonstra que *N. caninum* está amplamente disseminada na região estudada.  
19   Além disso, alta taxa de infecção por *N. caninum* para as gerações subsequentes  
20   aponta emergência para medidas de prevenção nos rebanhos analisados.

21

22   **Palavras-chave:** Anticorpos IgG; bovinos de leite; infecção transplacentária e  
23   horizontal; Neosporose.

24

## 25 **INTRODUÇÃO**

26

27                   A neosporose é uma das maiores doenças envolvidas em perdas  
28   reprodutivas em bovinos. Sem a existência de vacina, o diagnóstico de *Neospora*  
29   *caninum* em rebanhos é de grande importância, principalmente para programas de  
30   mitigar impactos produtivos e controle da doença. O parasito pode infectar diversas  
31   espécies animais, sendo os cães domésticos e alguns canídeos silvestres  
32   hospedeiros definitivos capazes de eliminar oocistos nas fezes. Os oocistos, quando  
33   esporulados, podem contaminar o ambiente e infectar bovinos, ovinos, caprinos,

1 cervídeos e animais silvestres, os quais são considerados como hospedeiros  
2 intermediários. Na bovinocultura de leite a principal via de transmissão é a vertical,  
3 entretanto, a transmissão horizontal, por meio da ingestão de oocistos esporulados  
4 em pastagem, solo, cochos e bebedouros também pode causar infecção nos animais  
5 (DUBEY, 2003; DAVIDSON et al, 1999, BERTOCCO & BERTOCCO, 2008).

6 Segundo Nicolino (2015), os prejuízos causados por *N. caninum* em  
7 bovinos de leite envolve custos com o descarte prematuro de animais, reposição de  
8 matrizes, queda na produção de leite e abortamentos.

9 O caráter persistente da infecção faz da investigação de anticorpos  
10 anti-*N. caninum* um indicador importante para a exposição e o status de portador em  
11 bovinos (DUBEY 2003; UGGLA et. al. 1998; SILVA 2005).

12 De acordo com Cerqueira-Cézar et al. (2017), no Brasil foram  
13 realizados diferentes estudos para determinar a soroprevalência de *N. caninum*. Os  
14 autores compilaram o resultado de diversas regiões do país, em diferentes espécies  
15 animais utilizando técnicas de imunodiagnóstico e diagnóstico molecular para  
16 determinar a ocorrência e incidência da neosporose no país, no entanto, ainda existem  
17 regiões no Brasil nas quais o cenário epidemiológico e imunológico da doença não é  
18 totalmente conhecido, como é o caso da região Oeste-noroeste do Estado de São  
19 Paulo.

20 Respostas imunes humorais não são protetoras contra *N. caninum*,  
21 porém, a soropositividade e o nível de anticorpos mostram-se como bons marcadores  
22 para o diagnóstico de neosporose bovina e o risco de abortamento associado. O  
23 conhecimento do perfil epidemiológico e imunológico, em especial em transmissões  
24 transplacentárias, importante via na manutenção do protozoário no rebanho, faz-se  
25 necessária para introduzir medidas preventivas e, assim diminuir perdas econômicas  
26 e reprodutivas que tanto impactam o agronegócio do leite e produção familiar nacional.  
27 Nesse sentido, esse trabalho teve como objetivos: a) analisar a ocorrência de IgG anti-  
28 *N. caninum* de três gerações de bovinas de leite; b) acompanhar a cinética de IgG  
29 anti-*N. caninum* em vacas e suas progênes.

## 31 **Material e Métodos**

### 33 **Desenho experimental**

34

1 O presente estudo foi realizado em dez propriedades produtoras de  
2 leite, localizadas na região Oeste e Oeste-noroeste de São Paulo composta,  
3 especificamente, pelos municípios de: Tupã, Iacri, Queiroz, Alto Alegre, e Penápolis.  
4 Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Estadual de  
5 Londrina – UEL nº 23340.2018.90, e financiado pelo Instituto Nacional de Ciência e  
6 Tecnologia – INCT/Leite nº 465725/2014-7.

7 O estudo foi conduzido em um delineamento epidemiológico de  
8 longitudinal prospectivo de três gerações de vacas leiteiras. Com uma das gerações,  
9 a progênie 1 (P1), foi conduzido um estudo de coorte com acompanhamento desde o  
10 nascimento até o primeiro parto. Nesse caso, o fator de exposição considerado para  
11 a separação das coortes foi a soropositividade para *N. caninum* das matrizes (primeira  
12 geração) e o desfecho foi a soropositividade da P1 (Figura 1).

#### 13 14 Amostras

15  
16 Para responder o acompanhamento longitudinal prospectivo foram  
17 coletadas 152 amostras de sangue de bovinas de leite primíparas prenhes entre o  
18 segundo e o terceiro terço de gestação, das raças Holandesa, Jersey, Gir, Girolando,  
19 Jersolando, Pardo-suíça e mestiças provenientes de rebanho com sistema de  
20 produção semi-intensivo e intensivo. Dessas, selecionou-se para o acompanhamento  
21 matrizes que tiveram descendentes fêmeas (segunda geração - Progênie 1 - P1) com  
22 primeira coleta de sangue antes da ingestão de colostro. O acompanhamento com  
23 coletas sanguíneo da progênie 1 seguiu as seguintes fases de vida: primeiro dia após  
24 o parto antes da ingestão do colostro, aos três meses, aos seis meses, aos doze  
25 meses, nos três terços do período gestacional até suas progênies fêmeas (terceira  
26 geração - Progênie 2 - P2). A cronologia do acompanhamento teve início em março  
27 de 2019 e seguiu até dezembro de 2021. Durante os três anos de acompanhamento  
28 foi realizado o monitoramento dos animais e contato semanal com os produtores.

#### 29 30 Coletas de sangue

31  
32 Realizou-se a coleta de sangue de bezerras, novilhas e vacas  
33 prenhes mediante punção da veia jugular ou coccígea, em tubos de 4 a 8 mL sem  
34 anticoagulante. Após coleta, o material foi transportado e armazenado em caixas

1 térmicas refrigeradas, até o laboratório de Diagnóstico Médico Veterinário – EMERGE  
2 (Tupã – SP), onde, as amostras foram centrifugadas a 3000 x g / 10 minutos para  
3 obtenção do soro, transferido para microtubos de 2 mL, armazenados em freezer até  
4 envio para o laboratório de Protozoologia Veterinária da Universidade Estadual de  
5 Londrina – UEL.

## 6

### 7 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

## 8

9                   A pesquisa de imunoglobulinas da classe G, anti-*N. caninum* no soro  
10 sanguíneo foi realizada pela RIFI como descrito por Camargo (1973). Utilizou-se  
11 conjugado anti-IgG espécie-específico para bovinos (Sigma-Aldrich, San Louis,  
12 Missouri, EUA) e taquizoítos da cepa NC- 1 de *N. caninum* como antígeno. Além disso,  
13 um controle positivo e um negativo foram incluídos em cada lâmina. Bezerras e  
14 fêmeas adultas com títulos de anticorpos  $\geq 100$  foram considerados positivas. Os soros  
15 coletados foram diluídos em uma razão de 1:2 e testados até que fosse obtido um  
16 resultado de titulação sérica negativa. Considerou-se reações positivas aquelas que  
17 apresentaram fluorescência periférica ou difusa dos taquizoítos, da mesma forma, as  
18 fluorescências com características apicais ou polares foram classificadas como  
19 negativas (Paré et al. 1995; Antonello et al., 2015).

## 20

### 21 Estatística

## 22

23                   O software Excel foi utilizado tabular os resultados sorológicos, bem  
24 como para confecção de gráficos e cálculo de ocorrências e incidências. O ambiente  
25 R (R Core Team, 2016) foi utilizado para os testes de hipóteses qui-quadrado, exato  
26 de Fisher e teste Wilcoxon, considerando uma significância nível de 5%.

## 27

### 28 **Resultados**

## 29

30                   Das 152 vacas prenhes, 42.8% (65/152) conceberam machos, 17.1%  
31 (26/152) sofreram abortamento, 11.9% (18/152) conceberam bezerras que foram  
32 descartadas do estudo devido a impossibilidade da coleta antes da ingestão do  
33 colostro, 3.9% (6/152) pariram natimortos fêmeas. Por fim, 24.3% (37/152) das  
34 matrizes tiveram fêmeas vivas, as quais foram selecionadas para o estudo longitudinal

1 prospectivo e coorte. Ressalta-se que 60,0% das propriedades pertencem ao sistema  
2 de produção semi-intensivo, o que impossibilitou um maior controle para as coletas  
3 antes da ingestão do colostro. Em relação ao nascimento de machos, apenas 40,0%  
4 das propriedades têm acesso ao sêmen sexado, as demais propriedades utilizam  
5 sêmen convencional.

6 A Figura 1 apresenta: (a) gerações divididas em estudo longitudinal  
7 prospectivo (P1): matrizes sororreagentes (48.7% - 18/37) e matrizes não  
8 sororreagentes (51.3% - 19/37) para *N. caninum*; (b) ocorrência de anticorpos anti-*N.*  
9 *caninum* em coorte (P2); (c) dinâmica da transmissão transplacentária/vertical do  
10 parasito entre os dois grupos.

11 No grupo de matrizes sororreagentes a idade gestacional  
12 correspondente foi de 27.8% (5/18) entre 150 a 170 dias, 55.5% (10/18) de 171 a 190  
13 dias e 16.7% (3/18) com 191 a 211 dias gestacionais. Observou-se que 88,9% (16/18)  
14 tiveram progênies (P1) reagentes para *N. caninum* em amostras coletadas antes da  
15 ingestão do colostro e 11.1% (2/18) não reagentes (Figura 1). Entre os períodos,  
16 destaca-se as progênies que permaneceram reativas para *N. caninum*. Na fase de 3  
17 meses, contatou-se que das P1 soropositivas, 33.3% (6/16) vieram a óbito, mudando  
18 o tamanho amostral do acompanhamento para 12 descendentes. Nos períodos de  
19 seis meses o acompanhamento seguiu com 83.3% (10/12) de P1 sororreagentes para  
20 *N. caninum*. Ao completar 12 meses, seguiram no acompanhamento as novilhas (P1)  
21 que entrassem no período reprodutivo com nascimento da progênie (P2) até  
22 dezembro de 2021, nesse caso excluiu-se 50% (6/10) de P1 reagentes que não  
23 atenderam esse critério.

24 A ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* na P1 ao nascer foi de  
25 43.2% (16/37), estatisticamente foi observado um risco adicional de 88.9% de  
26 ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em P1 que nasceram de matrizes  
27 sororreagentes ( $p < 0,001$ ).

28 Em relação ao grupo de matrizes soronegativas, 100% (19/19) das P1  
29 coletadas antes colostro também não foram reagentes para *N. caninum*. Aos três  
30 meses de idade 26.3% (5/19) de P1 soro converteram para reagentes, outros 26.3%  
31 (5/19) permaneceram não reagentes a *N. caninum* e 47.4% (9/19) de P1 vieram a  
32 óbito. No período de seis meses a dinâmica seguiu com 10 progênies, das quais,  
33 60.0% (6/10) de P1 foram sororreagentes para *N. caninum* e 40.0% (4/10) não  
34 reagentes. Aos 12 meses, atendendo o mesmo critério citado anteriormente, foram

1 excluídas 60.0% (6/10) de P1 do período reprodutivo. A frequência entre as gerações  
2 na transmissão horizontal foi de 26.3% (5/19) aos três meses e 60.0% (6/10) aos seis  
3 meses da segunda geração (P1).

4 Na terceira fase da prospecção, foi observado a dinâmica da  
5 transmissão pré-natal, pós-natal e ausência de soropositividade em um mesmo  
6 seguimento. Essa fase acompanhou nove novilhas (P1) no período gestacional.

7 O primeiro e segundo terços gestacionais seguiram com 77.8% (7/9)  
8 de P1 reagentes para *N. caninum* e 22.2% (2/9) não reagentes. No terceiro terço,  
9 42.8% (3/7) de P1 permaneceram soropositivas, 57.2% (1/7) sofreram abortamento.  
10 As P1 desse grupo que seguiram sem o contato com o agente, 50.0% (1/2)  
11 continuaram não reagentes e outras 50.0% abortaram.

12 A prospecção se encerrou no nascimento da P2, totalizando quatro  
13 descendentes da P1. Das quais, 100.0% (4/4) permaneceram reagentes para *N.*  
14 *caninum* na coleta antes colostro oriundas de transmissão pré-natal. E 100.0% (1/1)  
15 das P2 persistiram não reagentes para o parasito (Figura 1).

16 Observou-se que um total de 40.5% (15/37) das bezerras morreram  
17 antes de completar seis meses por causas variadas e, portanto, foram removidas do  
18 experimento.

19 O planejamento reprodutivo das novilhas decorreu de acordo com o  
20 manejo de cada propriedade. Dentre os protocolos reprodutivos, 75.0% das  
21 propriedades induziram as novilhas à inseminação artificial com ou sem sêmen  
22 sexado e 25.0% seguiram a monta natural.

23 Durante o acompanhamento verificou-se que a flutuação de IgG em  
24 progênes positivas por transmissão vertical até um ano variou entre títulos de 100 a  
25 800 (Figura 2), demonstrando flutuação maior entre os três e seis meses de vida. Em  
26 relação a comparação dos títulos de anticorpos IgG nos indivíduos da P1, observou-  
27 se que nascidas de matrizes sororreagentes apresentaram maiores títulos nas fases  
28 antes do colostro ( $p= 0,0002$ ) e aos 90 dias de vida ( $p=0,0474$ ) do que as nascidas de  
29 matrizes soronegativas.

## 31 **Discussão**

32  
33 A ocorrência da *N. caninum* em bovinos de leite do estado de São  
34 Paulo, varia entre 10,4% a 15,9% (CERQUEIRA-CÉZAR et al., 2017). No presente

1 estudo, a ocorrência de *N. caninum* foi de 48.7% (18/37) para as matrizes. Para excluir  
2 reações cruzadas com outros protozoários do filo Apicomplexa, foram consideradas  
3 positivas as vacas, novilhas e bezerras que apresentaram titulação  $\geq 100$  (ALVAREZ-  
4 GARCÍA et al., 2003). No entanto, os valores do ponto de corte não são totalmente  
5 comparáveis entre os estudos, uma vez que diferentes pontos de corte podem ser  
6 aplicados e a leitura da RIFI é considerada parcialmente subjetiva (ÁLVAREZ-  
7 GARCÍA et al., 2003; CAMPERO et al., 2018).

8 O nascimento de machos e perdas por problemas reprodutivos  
9 representaram 21.0% dos critérios de exclusão do acompanhamento no presente  
10 trabalho. Um estudo realizado com 23,5 milhões de vacas ordenhadas no Brasil  
11 observou que 42.5% dos descendentes eram machos de origem leiteira (EMBRAPA,  
12 2012). A taxa de nascimento de machos das matrizes estudadas foi de 46.2%,  
13 considerando o uso do sistema semi-intensivo e baixa tecnologia no manejo das  
14 propriedades; o resultado se aproxima do percentual encontrado no país,  
15 considerando as diferentes tecnologias reprodutivas (IBGE, 2017; GARNER et al.,  
16 2008; BORCHERSEN & PEACOCK, 2009; HOLDEN, S., & BUTLER, 2018).

17 Em relação à observação soropidemiológica em gerações  
18 subsequentes, o presente estudo constatou que progênies de matrizes soropositivas  
19 teve 88.9% vezes mais chance de serem soro reagente para *N. caninum*, alcançando  
20 100,0% das progênies da terceira geração detectadas no final dos três anos da  
21 prospecção. De acordo com Trees & Williams (2005) a infecção transplacentária (TPI)  
22 endógena é muito eficiente na transmissão de *N. caninum* em bovinos devido a  
23 recrudescência de uma infecção materna pré-existente durante a gravidez. Entretanto,  
24 tais comparações tornam-se relativas, uma vez que uma matriz é soropositiva no terço  
25 final da gestação, haverá uma chance muito grande de apresentar transmissão  
26 vertical, já a matriz que é soropositiva no início da gestação, caso não apresente  
27 infecção vertical, tende a se tornar soronegativa no decorrer da gestação. Em um  
28 estudo transversal realizado com 98 matrizes e foi possível observar que 38.0% das  
29 filhas soropositivas eram nascidas de mães soropositivas (BERGERON et al., 2000),

30 No presente estudo, o grupo de matrizes não reagente para *N.*  
31 *caninum* pode ter apresentado transmissão horizontal a partir dos três meses de vida,  
32 sendo que a TPI ocorreu até a P2 da terceira geração com 33.0% de descendentes  
33 reagentes, o que ressalta as lacunas na comparação entre a importância da  
34 transmissão vertical e horizontal. Um estudo sobre infecção natural por *N. caninum*

1 em 244 vacas de leite observou transmissão transplacentária de bovinos infectados  
2 pós-natal de 58.0% (14/24) no rebanho, já em um estudo anterior realizado com três  
3 rebanhos, foi encontrada transmissão transplacentária de aproximadamente 45.0%  
4 em animais infectados pós-natal (BJÖRKMAN et al., 2006; DIJKSTRA et al., 2008).

5 Com relação a flutuação de anticorpos em P1 sorreagentes, o  
6 presente estudo detectou relação significativa nas duas primeiras fases de coleta, no  
7 entanto não foi observado diferença estatística nas fases subsequentes da segunda  
8 geração. Esse evento pode ser associado a estabilidade de anticorpos mediada na  
9 imunossupressão natural durante o período gestacional (INNES et al., 2002).

10 Sabe-se que problemas reprodutivos tem impacto significativo na  
11 produção de bovinos de leite. Um estudo realizado por Corbellini et al. (2006) na região  
12 sul do Brasil constatou que 88% dos fetos abortados foram associados a agentes  
13 infecciosos, sendo que, os animais infectados com *N. caninum* apresentaram 2,4  
14 vezes mais chance de abortar (IC 95% de OR=0,9-6,8, P=0,06) quando comparado  
15 com outros agentes.

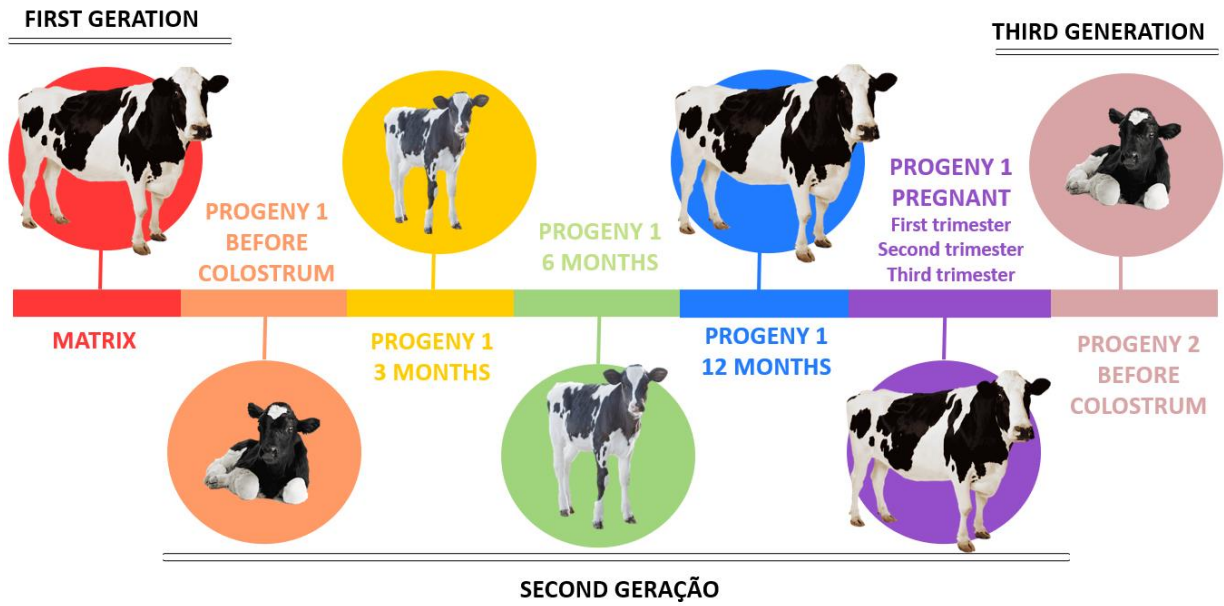
## 17 **Conclusão**

18  
19 As vacas, novilhas e bezerras estão constantemente expostas a *N.*  
20 *caninum* na região estuda. A alta taxa de infecção por *N. caninum* para as gerações  
21 subsequentes demonstrada pela cinética de IgG anti-*N. caninum* em vacas e suas  
22 progênes aponta emergência para medidas de prevenção nos rebanhos analisados.  
23 Ao considerar que matrizes soropositivas no terço final de gestação apresentam uma  
24 maior possibilidade de gerar progênes positivas as demonstrações entre transmissão  
25 vertical e horizontal do presente estudo indicam a necessidade de mais estudos  
26 epidemiológicos sobre *N. caninum* nos rebanhos leiteiros.

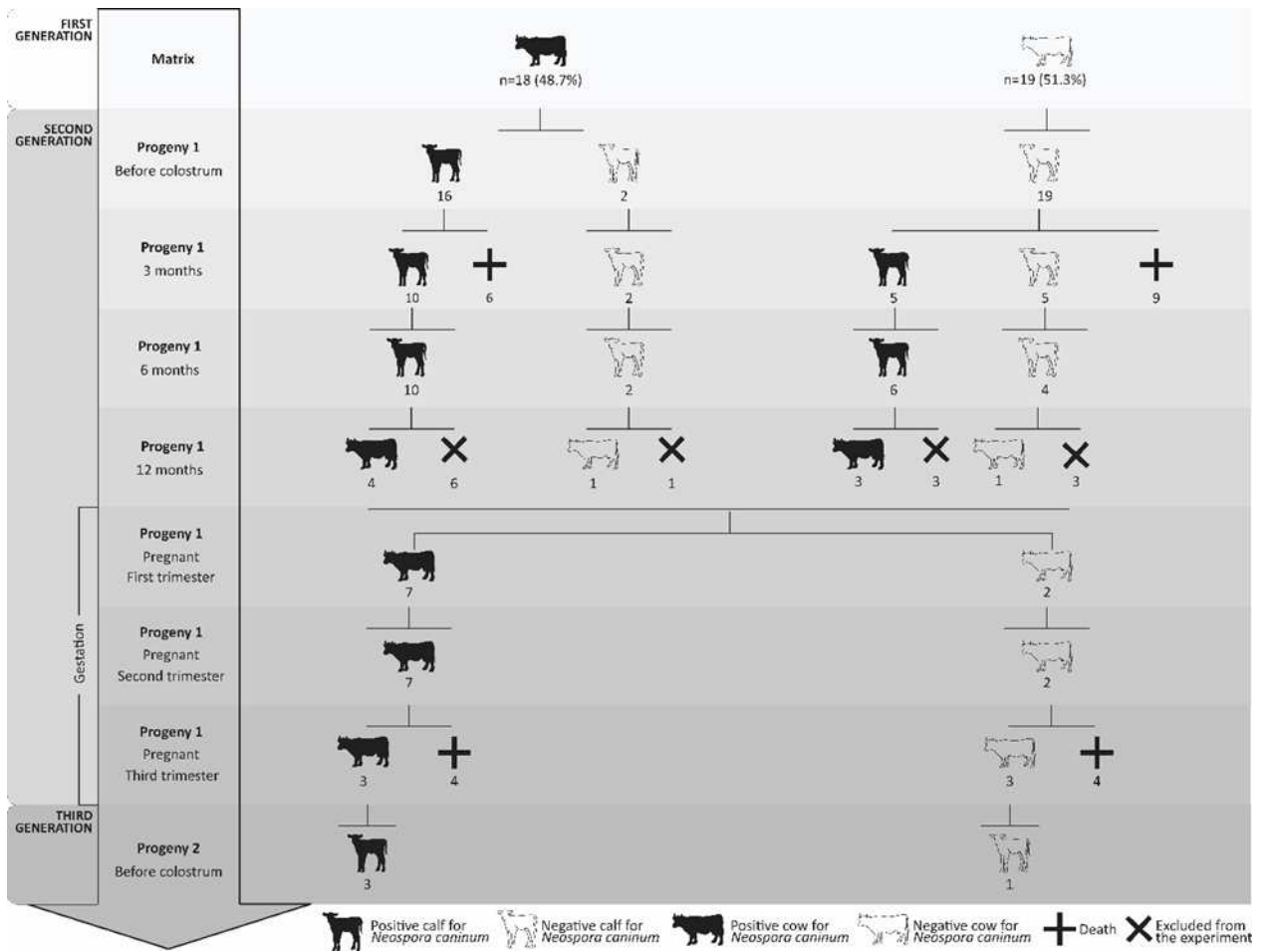


- 1 aborted fetuses in southern Brazil. *Vet. J.*, 2006. 172(1):114-120. DOI:  
2 10.1016/j.tvjl.2005.03.006.
- 3 Davison HC, Otter A, Trees AJ. Estimation of vertical and horizontal transmission  
4 parameters of *Neospora caninum* infection in dairy cattle. *Int. J. Parasitol.*, 1999.  
5 29: 1683-1689. DOI: 10.1016/s0020-7519(99)00129-0.
- 6 Dijkstra TH, Lam TJGM, Bartels CJM, Eysker M, Wouda W. Natural postnatal  
7 *Neospora caninum* infection in cattle can persist and lead to endogenous  
8 transplacental infection. *Veterinary Parasitology*, 2008. 152(3–4): 220-225. DOI:  
9 10.1016/j.vetpar.2007.12.034.
- 10 Dubey JP. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean*  
11 *Journal of Parasitology*, 2003.41(1):1-16. DOI:10.3347/kjp.2003.41.1.1
- 12 EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Gado de leite  
13 (Informações técnicas/Estatística do leite/Produção). *Produção de leite, vacas*  
14 *ordenhadas e produtividade animal no Brasil – 1980/2010. 2012.* Disponível em:  
15 <[https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/164236/1/Pecuaria-de-](https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/164236/1/Pecuaria-de-leite-no-Brasil.pdf)  
16 [leite-no-Brasil.pdf](https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/164236/1/Pecuaria-de-leite-no-Brasil.pdf)>. Acesso em: jan., 2022.
- 17 Garner DL & Seidel JR GE. History of commercializing sexed semen for cattle.  
18 *Theriogenology*, 2008. 69:886–895. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.01.006.
- 19 Guimarães Júnior JS & Gennari SM. (2022). *Neospora caninum em bovinos de*  
20 *exploração leiteira: soroprevalência, fatores de risco e comparação de técnicas*  
21 *sorológicas*. (Tese de Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e  
22 Zootecnia, Universidade de São Paulo. Available in <  
23 <https://repositorio.usp.br/item/001306559>>. Accessed: Jan 07, 2022.
- 24 Holden S & Butler S. (2018). Review: Applications and benefits of sexed semen in  
25 dairy and beef herds. *Animal*, 12(S1), S97-S103.  
26 DOI:10.1017/S1751731118000721.
- 27 IBGE. *Pecuária*. 2017. Disponível em: <[https://www.ibge.gov.br/estatisticas/econo-](https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=o-que-e)  
28 [micas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=o-](https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=o-que-e)  
29 [que-e](https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=o-que-e)>. Acesso em: jan., 2019.
- 30 Innes EA, Andrianarivo AG, Björkman C, Williams DJ, Conrad PA. Immune  
31 responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol*  
32 2002; 18(11): 497-504. DOI: 10.1016/S1471-4922(02)02372-3
- 33 Nicolino RR, Capanema RO, Oliveira SFS, Pastrana MEO, Lopes LB, Haddad JPA.  
34 Estimativa da diferença do risco de aborto em vacas leiteiras soropositivas para  
35 *Neospora caninum* no Brasil. *Cienc. Rural [online]*, 2015. 45(9):1629-1633.  
36 DOI:10.1590/0103-8478cr20141428.

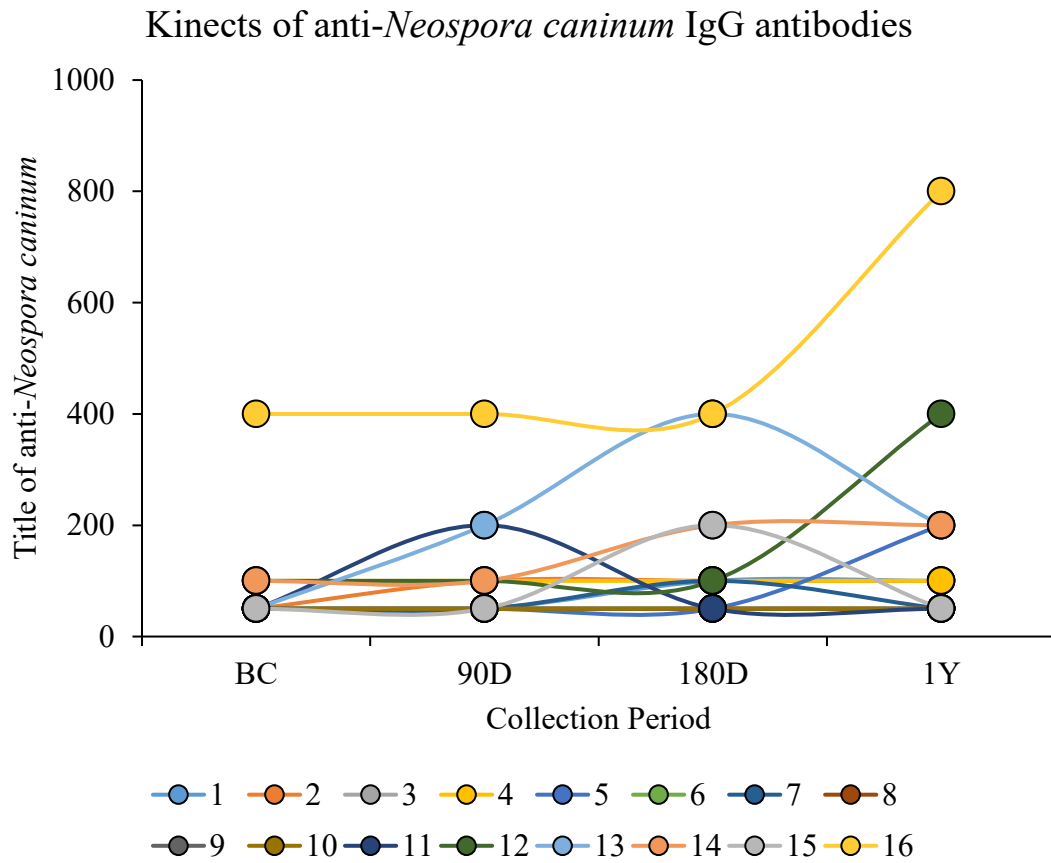
- 1 Paré J, Hietala SK. & Thurmond MC. Interpretation of an indirect fluorescent antibody  
2 test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *J. Vet. Diag.* 1995. 7:273-  
3 275. DOI: 10.1177/104063879500700222.
- 4 Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy  
5 cattle and associated calfhoo mortality Can. *J. Vet. Res.*, 1996. 60 :133-139.  
6 ISSN 1984-2961.
- 7 Silva da.C. Diagnóstico da neosporose bovina. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2005.13:29-  
8 33.
- 9 Trees AJ & Williams DJL. Endogenous and exogenous transplacental infection in  
10 *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol.*, 2005. 21:558-  
11 561. DOI: 10.1016/j.pt.2005.09.005.
- 12 Uggla A, Stenlund S, Holmdahl OJM, Jakubek EB, Thebo P, Kindahl H & Björkman  
13 C. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *Int. J. Parasitol* 1998;  
14 28:1467-1472. DOI: 10.1016/s0020-7519(98)00110-6
- 15 Wouda W, Brinkhof J, van Maanen C, de Gee AL, Moen AR. Serodiagnosis of  
16 neosporosis in individual cows and dairy herds, a comparison of three enzyme  
17 linked immunosorbent assays. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1998. 5:711-716.  
18 DOI: 10.1128/CDLI.5.5.711-716.1998.
- 19  
20  
21  
22  
23  
24  
25



1 **Figura 1.** Delineamento epidemiológico longitudinal prospectivo e de coorte em  
 2 progênes bovinas.  
 3



4 **Figura 2.** Ocorrência de anticorpos G anti-*N. caninum* em bezerras, novilhas e vacas  
 5 leiteiras naturalmente infectadas.  
 6



1

2 **Gráfico 1.** Dinâmica cinética de anticorpos anti-*Neospora caninum* (RIFI) em  
 3 progênieis sororreagentes desde o nascimento até doze meses de vida.

4

5

6

## 1 CONCLUSÃO

2 Este estudo apresenta a primeira descrição da ocorrência de  
3 anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos leiteiros (41,6%) nas regiões Oeste e Oeste-  
4 Noroeste do estado de São Paulo, e é a primeira vez que é realizado um estudo  
5 longitudinal prospectivo e coorte sobre *N. caninum* no estado de São Paulo.

6 *N. caninum* está amplamente disseminada na região estudada.  
7 Embora os animais do presente estudo não apresentaram ocorrência de anticorpos  
8 anti-*T. gondii* não podemos excluir a presença deste protozoário.

9 A alta possibilidade da transmissão transplacentária de *N. caninum*  
10 nos dois últimos terços gestacionais não exclui a importância da transmissão  
11 horizontal.

12 A alta taxa de TPI pré-natal em matrizes e suas descendentes  
13 apresenta-se como indicativo para reestruturação do manejo preventivo nas  
14 propriedades estudadas e determina a necessidade de um maior aprofundamento em  
15 pesquisa na região.

16 O acompanhamento prospectivo e de coorte identificou a presença e  
17 manutenção da *N. caninum* nas gerações analisadas, o que evidencia a importância  
18 de medidas eficientes de prevenção.

19 Durante os quase três anos de acompanhamento, o presente estudo  
20 estabeleceu contato semanal com os 10 produtores envolvidos. Além do  
21 monitoramento dos rebanhos, as propriedades receberam assistência técnica,  
22 palestras e retorno dos resultados obtidos no decorrer do experimento.

23

24

25

1

**ANEXOS**

2

**ANEXO A**

3

Termo de Autorização dos Produtores de acordo com Comitê de Ética Animal  
em Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina

4

5

6

7

**TERMO DE CIÊNCIA E AUTORIZAÇÃO**

8

9

10 Eu XX, RG: XX, responsável pelos bovinos de leite e cães da propriedade rural XX  
11 autorizo a participação dos animais no projeto de pesquisa intitulado *Neospora*  
12 *caninum*: acompanhamento da cinética de anticorpos IgG e expressão de citocinas  
13 IFN- $\gamma$ , IL10 e IL7B em bezerras, novilhas e vacas leiteiras sob coordenação do  
14 pesquisador da Universidade Estadual de Londrina que assina abaixo. Fui esclarecido  
15 sobre os objetivos do projeto/aula, que são: avaliar a cinética de anticorpos IgG contra  
16 *N. caninum* em fêmeas bovinas leiteiras, desde o nascimento até o primeiro parto;  
17 especificamente, analisar a associação de riscos, bem como a taxa de transmissão  
18 transplacentária do *N. caninum* em novilhas; avaliar a expressão de citocinas IFN- $\gamma$ ,  
19 IL 10 e IL17B nas vacas e bezerras durante o nascimento até o primeiro parto; e  
20 levantamento epidemiológico do rebanho leiteiro situado na região Tupã, São Paulo.  
21 Assim como a pesquisa da ocorrência de outros patógenos de interesse do trabalho.  
22 Também fui esclarecido quanto aos procedimentos a serem empregados e suas  
23 possíveis consequências sobre o animal, os quais serão: coleta de sangue venoso,  
24 por meio de punção da veia coccígea (vacas e novilhas) e veia jugular (bezerras e  
25 cães), na seguinte frequência: vaca/novilha: pré-parto; bezerra/novilha: pós-parto, 90  
26 dias, 180 dias, 365 dias, período gestacional (1/3, 2/3 e 3/3 de gestação), pós-parto.  
27 Tenho conhecimento de que os resultados obtidos serão divulgados exclusiva e  
28 anonimamente em publicações científicas; e de que tenho o direito e a liberdade de  
29 suspender essa autorização a qualquer momento que julgue necessário.

30

31 Tupã, XX de dezembro de 2018.

32

33

34

35

---

(Nome do proprietário)

36

37

38

39

40

---

Prof. João Luis Garcia

41

Coordenador do projeto e orientador

42

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

43

Universidade Estadual de Londrina - UEL

44

(43) 3371-4766

45

46



Animal Nº _____	Nome:	3. Idade:	4. Raça:
Animal Nº _____	Nome:	3. Idade:	4. Raça:
Animal Nº _____	Nome:	3. Idade:	4. Raça:
<b>4. Atividades desenvolvidas:</b> (1) agricultura (2) pecuária			
<b>5. Tipo de criação:</b> (1) de subsistência (2) pec. leiteira intensiva (3) pec. leit. Semi intensiva (4) pec.leit. extensiva (5) pec. de corte intensiva (6) pec. corte semi-intensiva (7) pec. corte extensiva			

<b>6. Características raciais dos animais:</b> (1) europeu (2) zebú (3) mestiços
(1) holandês (2) gir (3) Girolanda (4) jersey (5) jersolando (6) pardo-suíço (7) outra: _____

<b>8. Alimentação volumosa:</b> (1) pastagem (2) silagem (3) forrageira (4) feno
<b>9. Alimentação controlada:</b> (1) ração comercial (2) ração produzida na propriedade (3) cama de frango (4) outro: _____
<b>10. Suplementação mineral:</b> (1) sal comum (2) sal comum + sal mineral (3) não

11. Vacinas efetuadas: (1) febre aftosa (2) raiva (3) brucelose (4) leptospirose (5) BVD (6) IBR (7) salmonelose-paratifo (8) diarreias víricas (9) diarreias bacterianas (10) campilobacteriose (11) carbúnculo (clostridiose) (12) Teste PPD - resultado: _____ (13) outras: _____
<b>12. Brucelose:</b> (1) Quando? ANIMAIS DE 3 A 8 MESES (2) _____ idade _____ atual: _____
<b>13. Leptospirose:</b> (1) Quando? DOSE REFORÇO E DE 6 EM 6 MESES (2) idade atual: _____

<b>14. Criação de bezerros:</b> (1) sim (2) não
<b>15. Bezerreiros:</b> (1) a campo (2) casinha (3) coletivo (4) outros: _____
16. Alimentação: leite de vaca (2) leite em pó
17. Realizada: (1) na vaca (2) artificial-balde (3) artificial-mamadeira (1) sim (2) não

18.

Colostro:

19. Tipo de colostro: (1) na vaca (2) fresco (3) descongelado

20. Suplementação: (1) ração (2) feno  
(3) outro: \_\_\_\_\_

21. Tratamento de Umbigo: (1) sim (2) não

(3) Produto: \_\_\_\_\_ (4) como é feito?

22. Média de produção de leite por animal: 18 A 20 LITROS DURANTE O ANO

23. Produção de leite do rebanho: (1) até 50 l (2) 51 a 100 l (3) 101 a 150 l (4) + de 150 l  
(5) números de vacas lactantes: 50

24. Tipo de leite: (1) cru refrigerado (2) leite pasteurizado (3) leite A

25. Subproduto do leite: (1) sim (2) não

26. Qual? (1) queijo (2) coalhada (3) requeijão  
(4) outro: \_\_\_\_\_

27. Número de ordenhas diárias: (1) uma (2) duas (3) três

28. Higiene de ordenha: (1) sim (2) não

29. Limpeza: (1) úbere (2) teto

30. Utilização de: (1) água/sabão (2) papel toalha  
(3) outro: \_\_\_\_\_

31. Tipo de ordenha: (1) manual (2) mecânica

32. Realiza: (1) pré dipping (2) pós dipping (3) os dois (4) nenhum  
(5) Produto:

33. Teste para mastite: (1) caneca (2) CMT (3) caneca + CMT (4) não

34. Antibiograma: (1) sim (2) não (3) tratamento:

35. Presença de cão: ( ) sim (2) não quantos? 2  
Presença de gato: (1) sim ( ) não quantos? \_\_\_\_\_

**36. Criação mista:** (1) suíno ( ) equino (3) ovino (5) outras  
(4)

1

**37. Problemas reprodutivos:** (1) sim (3) faixa etária mais acometida: TODAS  
(2) não

**38. Fase de gestação acometida:** (1) (2) terço médio (3) terço final  
terço inicial

**39. Problemas reprodutivos mais frequentes:**

(1) metrite (2) (3) vulvovaginite (4) repetição de cio  
corrimento

(5) aborto (6) (7) fetos mumificados (8) recém-natos debilitados  
natimortos

(9) retenção de placenta (10) problemas durante o parto (11) anomalia  
congenita

(12) Outros: \_\_\_\_\_

**40. Frequência dos problemas reprodutivos:**

(1) 1ª (2) 2ª cria (3) 3ª cria (4) 4ª cria (5) todas as (6) não há  
cria crias

(7)

outro:

\_\_\_\_\_

**41. Diagnosticado:** (1) sim (2) não

(3) Qual? \_\_\_\_\_

**42. Compra de animais:** (1) sim (2) não (3) Quando?

**43. Este animal apresentou problema?** ( 1 ) sim (2) não

(3) Qual? \_\_\_\_\_

**44. Problemas neurológicos:** (1) sim (2) não

(3) Faixa etária afetada: \_\_\_\_\_

(4) Quais? \_\_\_\_\_

**45. Diagnosticado:** (1) sim (2) não

(3) Qual? \_\_\_\_\_

**46. Problemas respiratórios:** (1) sim (2) não

(3) Faixa etária afetada: \_\_\_\_\_

(4)

Quais?

\_\_\_\_\_

**47. Diagnosticado:** (1) sim (2) não

(3) Qual? \_\_\_\_\_

**48. Problemas digestivos:** (1) sim (2) não (3) Faixa etária afetada:

(4) Quais? \_\_\_\_\_

**49. Diagnosticado:** (1) sim (2) não (3) Qual? \_\_\_\_\_

**50. Problemas Parasitológicos:**

Exames de fezes: (1) sim (2) não

**51. Exame de sangue:** (1) sim (2) não

**52. Frequência:** (1) 1m (2) 2m (3) 3m (4) 4m (5) 6m (6) 1 ano

(7) outro: \_\_\_\_\_

(8) resultados: \_\_\_\_\_

**53. Anti-helmínticos utilizados:**

**54. via de administração:** (1) oral (2) injetável

(3) outro: \_\_\_\_\_

**55. Frequência:** (1) 1m (2) 2m (3) 3m (4) 4m (5) 6m (6) 1 ano

(7) outro: \_\_\_\_\_

**56. Rotação de anti-helmínticos:** (1) sim (2) não

**57. Presença de carrapatos:**

(1) baixa infestação (2) média infestação (3) alta infestação (4) ausência

**58. Época do ano que aparecem:**

(1) primavera (2) verão (3) outono (4) inverno (5) ano todo

**59. Uso de carrapaticida:** (1) sim (2) não

**60. Frequência:** (1) 15 dias (2) 20 dias (3) 30 dias (4) 2 m (5) 4 m (6) 6 m

(7) outro: \_\_\_\_\_ (8) Qual?:

**61. Rotação de princípio ativo:** (1) sim (2) não

(3) como é feita?: \_\_\_\_\_

**62. Tipo de aplicação:** (1) pulverização (2) Vol. médio por animal:

(1) aspersão (4) injetável (5) pour on (6)

outro: \_\_\_\_\_

**63. Uso de mosquicidas:** (1) sim (2) não

(3) Qual? \_\_\_\_\_

**64. Aplicação:** (1) animal (2) instalações (3) esterco

(4) outro: \_\_\_\_\_

**65. Tristeza Parasitária Bovina-TPB:** (1) sim (2) não

**66. Acomete:** (1) bezerro (2) novilha (o) (3) adulto




1  
2

1  
2 **ANEXO C**

3 Boletim Informativo para o Produtor: Instruções sobre o experimento, coleta,  
4 armazenamento e transporte



10 **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
11 **CIÊNCIA ANIMAL**  
12 **DOUTORADO ACADÊMICO**  
13 **DISCENTE: JULIANA CORREA BERNARDES**  
14 **ORIENTADOR: DR. JOÃO LUIS GARCIA**

15 Olá, amigo(a) produtor(a)!

16 Mais uma vez agradecemos sua parceria nesse experimento.

17 Siga algumas **informações importantes** no **quadro 1** e **orientações para uso dos**  
18 **materiais de coleta** no **quadro 2**.

19 Nós da Universidade Estadual de Londrina – UEL, estaremos a disposição caso você tenha  
20 alguma dúvida ou problemas durante o decorrer do experimento.

21  
22

**QUADRO 1: INFORMAÇÕES IMPORTANTES SOBRE O EXPERIMENTO**

**1** – O experimento irá acompanhar três gerações e serão coletados sangue e fezes dos animais inseridos no experimento.

**A- Vaca prenha (mãe);**

**B- Bezerro 1 - Filha (do nascimento até sua cria);**

**C- Bezerro 2 – Neta (cria da bezerro 1).**



**2** – As coletas seguirão um **calendário** que será **acompanhado junto com vocês**, qualquer **dúvida** durante o decorrer do experimento é só **entrar em contato**.

1ª Coleta: **vacas prenhas**

2ª Coleta: **bezerro 1 – filha** (antes de mamar o colostro)

3ª Coleta: **bezerro 1 – filha** com 3 meses

4ª Coleta: **bezerro 1 – filha** com 6 meses

5ª Coleta: **bezerro 1 – filha** com 12 meses

6ª Coleta: **novilha 1 – filha** durante a prenhez (1/3)

7ª Coleta: **novilha 1 – filha** durante a prenhez (2/3)

8ª Coleta: **novilha 1 – filha** durante a prenhez (2/3)

9ª Coleta: **bezerro 2 – Neta** (antes de mamar o colostro)

3 – É de **EXTREMA IMPORTÂNCIA** a **1ª coleta** de sangue da bezerra (1 e 2) ser **ANTES** de mamar o colostro, **FIQUE**



**ATENÇÃO!** 😊

4 – Conforme **conversamos anteriormente**, durante o experimento os animais participantes **NÃO DEVEM SER VENDIDOS!**



5 – Se alguma vaca **ABORTAR** durante o período do experimento, envolva o **FETO** em sacos plásticos, nos comunique e **congele até irmos coletá-lo**.



6 – A coleta de sangue e fezes dos cachorros é para **complementação do experimento** e a coleta de fezes das vacas é para ajudá-los no controle parasitário da propriedade. Poderemos auxiliá-lo com medidas preventivas e tratamentos.



1

## QUADRO 2: ORIENTAÇÕES SOBRE A COLETA, ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS

1 – Materiais para coleta de sangue e fezes:



Tubos coleta a vácuo de sangue, adaptador e agulha.  
(gado de leite)



Luva de látex para coleta de fezes.  
(gado de leite e cães)



KIT TRANSPORTE DE AMOSTRAS (gelox/estante para tubos)

2 – Locais de coleta de sangue no gado de leite:

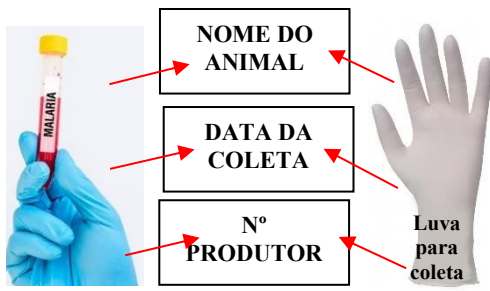


Coleta na base do rabo (veia coccígea)



Coleta jugular (veia jugular)

**3 – Identificação das amostras:**



**4 – Descarte de agulhas e materiais contaminados:**



**5 – Armazenamento das amostras e transporte:**



Após coleta refrigerar os materiais na geladeira até transportá-lo para o Laboratório EMERGE (Silvana)  
\*A amostra deve ser encaminhada ao Emerge no mesmo dia da coleta.



Transportar no Isopor (já montado para transporte), com os GELOX congelados e tubos na estante.

**6 – Dúvidas e/ou problemas, entre em contato:**



**(14) 99866-6164**  
**M.V. Juliana**

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6

EMERGE  
Rua Caingangs, 1.132  
Tupã/SP