

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THAIS DE ALMEIDA KNOFF

**LEITE COMO POTENCIAL VEÍCULO DE TRANSMISSÃO DE *NEOSPORA*  
*CANINUM***



CURITIBA

2014

THAIS DE ALMEIDA KNOFF

**LEITE COMO POTENCIAL VEÍCULO DE TRANSMISSÃO DE *NEOSPORA*  
*CANINUM***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração Patologia Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção de título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Prof. Dra. Rosângela Locatelli Dittrich

CURITIBA

2014

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “LEITE COMO POTENCIAL VEÍCULO DE TRANSMISSÃO DE *Neospora caninum*” apresentada pela Mestranda THAIS DE ALMEIDA KNOPF declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou a candidata APTA para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 28 de março de 2014

Professora Dra. Rosângela Locatelli Dittrich  
Presidente/Orientadora

Professor Dr. Fernando Paiva  
Membro

Professor Dr. Ivan Roque de Barros Filho  
Membro



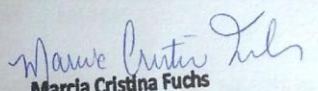
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS

### DECLARAÇÃO

Declaramos para fins de comprovação junto à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, que nada consta em nossos registros referente a débito por parte de **THAIS DE ALMEIDA KNOFF**, 06486284935, nesta biblioteca.

E, por ser verdade firmo a presente.

Curitiba, 04 de Agosto de 2017.

  
**Marcia Cristina Fuchs**  
Chefe da Biblioteca de Ciências Agrárias  
CRB 9/1321

*Dedico este trabalho à minha mãe,*

*Maria de Lourdes,*

*que hoje é um dos meus anjos que acompanha todos os meus passos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus, por sempre me dar força e saúde para me dedicar a minha carreira que sempre sonhei.

Ao meu pai e meus irmãos, por simplesmente existirem e serem meus melhores amigos.

À professora Rosângela, por todo o ensinamento, dedicação, paciência e confiança que foi me dada durante esses dois anos. Minha eterna admiração e amizade.

Aos colegas residentes e funcionários do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFPR, Rafael H. Hagi, Fabiana Tieme, Carlos Czp Ktz e Olair C. Beltrame por sempre me ajudarem e tornarem meus dias mais alegres. Minha eterna gratificação.

À minha colega mestranda Marília Koch pelas horas de ensinamento no cultivo celular e na PCR. Sua ajuda me possibilitou crescimento profissional. Muito obrigada.

À minha colega mestranda Patrícia Y. Montañó que foi muito importante para mim nesses dois anos. Sempre me ajudando quando precisava. Obrigada pela amizade e paciência.

À minha colega Ana Paula Brenner Busch por me acompanhar nas madrugadas na fazenda e pela paciência de me ensinar a lidar com os animais do meu projeto. Obrigada.

Aos alunos de iniciação científica Daniele Von Kruger, Felipe Webber, Ana Paula Costa e Nathalie Silva Algayer por contribuírem para este trabalho se realizar. Obrigada!

À Universidade Federal do Paraná, instituição que me deu a oportunidade de aprendizado e de conquistar este título. Obrigada!

E aos animais, seres inocentes que nos mostram que é possível amar incondicionalmente.

“Ama-se mais o que se conquista com esforço”

Benjamin Disrael

## RESUMO

O protozoário *Neospora caninum*, do phylum Apicomplexa e família Sarcocystidae, é um parasita intracelular obrigatório que infecta várias espécies animais, mas tem predileção por cães e bovinos. Em bovinos a neosporose causa aborto, infertilidade, nascimento de bezerros natimortos ou doentes. A transmissão vertical é a principal via de transmissão da *N. caninum*. A transmissão horizontal ocorre quando há ingestão de oocistos pelos hospedeiros intermediários e pela ingestão de cistos teciduais contendo os bradizoítas por carnívoros. A doença nos bovinos causa sérios prejuízos econômicos em muitos países, inclusive no Brasil e no Paraná. A toxoplasmose é uma zoonose que em humanos causa graves danos ao feto. Os protozoários são transmitidos via horizontal e vertical, e foram evidenciados em diferentes amostras biológicas, bem como em amostras de leite *in natura*. Os parasitas tem sido detectados em amostras de leite de diversas espécies animais, sugerindo a possível veiculação dos taquizoítas. No leite bovino há relatos de detecção de DNA de *N. caninum* e de *T.gondii*, levantando a hipótese da possibilidade de transmissão lactogênica no leite cru. Neste estudo objetiva-se monitorar os anticorpos anti-*Neospora caninum* no leite e no soro em vacas leiteiras, avaliar os fatores que interferem na detecção dos anticorpos na RIFI, avaliar os tipos de amostra de leite para melhor detecção, isolar taquizoítas de *N. caninum* e de *T.gondii* do leite cru e investigar o DNA dos protozoários no leite. As análises de amostras pareadas de sangue e leite demonstraram boa concordância na detecção de anticorpos IgG anti-*Neospora caninum* durante seis meses (89,%); amostras coletivas de leite podem ser empregadas para estudos epidemiológicos, fornecendo informações sobre a soropositividade de *N. caninum*. A coleta de *pool* de leite deve ser realizada para o diagnóstico de *Neospora caninum* para análise; a presença da mastite subclínica e a quantidade de produção leiteira diária não interferem na detecção de anticorpos anti-*N. caninum* no leite utilizando a RIFI e o tipo de amostra interfere no diagnóstico. *Toxoplasma gondii* pode ser eliminado no leite de vacas soropositivas com título persistente de 1:50, comprovado por PCR no leite e no isolamento.

Palavras-chave: Neosporose, Toxoplasmose, anticorpos, leite, PCR.

## ABSTRACT

The protozoan *Neospora caninum*, of the Apicomplexa phylum and family Sarcocystidae, is an obligate intracellular parasite that infects several animal species, but has a predilection for dogs and cattle. In cattle, neosporosis causes abortion, infertility, birth of stillborn or diseased calves. Vertical transmission is the main transmission route of *N. caninum*. Horizontal transmission occurs when there is ingestion of oocysts by the intermediate hosts and by the ingestion of tissue cysts containing the bradyzoites by carnivores. The disease in cattle causes serious economic losses in many countries, including Brazil and Paraná. Toxoplasmosis is a zoonosis that can cause serious damage to the fetus in both men and cattle. The protozoa are transmitted horizontally and vertically, and were evidenced in different biological samples, as well as in samples of fresh milk. The parasites were detected in samples of milk of several animal species, suggesting the possible transmission of the tachyzoites. In bovine milk there are reports of DNA detection of *N. caninum* and *T.gondii*, raising the hypothesis of the possibility of lactogenic transmission in raw milk. The objective of this study was to monitor anti-*Neospora caninum* antibodies in milk and serum in dairy cows, to evaluate the factors that interfere in the detection of antibodies in IFAT, to evaluate milk sample types for better detection, to isolate tachyzoites of *N. caninum* And *T.gondii* from raw milk and to investigate the DNA of protozoa in milk. Analyzes of paired samples of blood and milk showed good agreement in detecting anti-*Neospora caninum* IgG antibodies for six months (89,%); Collective samples of milk can be used for epidemiological studies, providing information on the seropositivity of *N. caninum*. The collection of milk pool should be performed for the diagnosis of *Neospora caninum* for analysis; The presence of subclinical mastitis and the amount of daily milk production does not interfere with the detection of anti-*N. caninum* antibodies milk using IFAT and the type of sample interferes with the diagnosis. *Toxoplasma gondii* can be eliminated in the milk of seropositive cows with a persistent titer of 1:50, proven by PCR in milk and in isolation.

Key words: Neosporosis, Toxoplasmosis, antibodies, milk, PCR

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	12
2. OBJETIVOS .....	14
2.1 OBJETIVO GERAL .....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	15
3.1. HISTÓRICO. ....	15
3.2. BIOLOGIA DO <i>N. CANINUM</i> .....	15
3.3 TRANSMISSÃO. ....	17
3.4 PATOLOGIA E SINAIS CLÍNICOS.....	20
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	21
CAPÍTULO I – ASSOCIAÇÃO E MONITORAMENTO DE ANTICORPOS ANTI-NEOSPORA CANINUM NO SORO E EM AMOSTRAS INDIVIDUAIS E COLETIVAS DE LEITE. ....	28
RESUMO. ....	28
ABSTRACT .....	29
1. INTRODUÇÃO .....	30
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	31
2.1 ANIMAIS.....	31
2.2 AMOSTRAS .....	32
2.3 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI). 32	
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	33
3 RESULTADOS.....	34
4. DISCUSSÃO. ....	35
5. CONCLUSÃO.....	36
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	37
CAPÍTULO II - INFLUÊNCIA DA MASTITE SUBCLÍNICA E DA PRODUÇÃO LEITEIRA NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- <i>Neospora caninum</i> NO	

LEITE .....	40
RESUMO. ....	40
ABSTRACT .....	41
1. INTRODUÇÃO .....	42
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	43
2.1. ANIMAIS.....	43
2.2. AMOSTRAS .....	43
2.3. CALIFORNIA MASTITIS TEST – CMT.....	44
2.4 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)...	44
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
3. RESULTADOS .....	45
4. DISCUSSÃO. ....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50
CAPÍTULO III – DIAGNÓSTICO DE <i>NEOSPORA CANINUM</i> E <i>TOXOPLASMA GONDII</i> EM LEITE DE VACAS .....	53
RESUMO. ....	53
ABSTRACT .....	54
1. INTRODUÇÃO .....	55
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	57
2.1 ÁREA GEOGRÁFICA E ANIMAIS.....	57
2.2 AMOSTRAS .....	58
2.3 SOROLOGIA.....	58
2.4 ISOLAMENTO <i>IN VITRO</i> .....	59
2.4.1 CULTIVO DE CÉLULAS VERO.....	59
2.4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE LEITE PARA ISOLAMENTO.....	60
2.5 CRIOPRESERVAÇÃO DOS PROTOZOÁRIOS .....	61

2.6	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>N.CANINUM</i> E <i>T. GONDII</i> .....	62
2.6.1	EXTRAÇÃO DE DNA .....	62
2.6.2	REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA PCR 63	63
2.6.3	SOLUÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DA PCR 63	63
2.6.4	AMPLIFICAÇÃO DO DNA.....	65
2.7	IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DA PCR 65	65
2.8	PCR REGIÃO ITS 1 .....	66
2.9	PRODUTOS AMPLIFICADOS OBTIDOS DA REGIÃO ITS1 SUBMETIDOS AO SEQUENCIAMENTO PARA CONFIRMAR A IDENTIDADE DE <i>T. GONDII</i> E/OU <i>N. CANINUM</i> .....	67
3.0	RESULTADOS .....	67
3.1	SOROLOGIA.....	67
3.2	ISOLAMENTO <i>IN VITRO</i> .....	67
3.3	REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA – PCR.....	69
3.4	ANÁLISE DAS SEQUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DA REGIÃO ITS 1 .....	72
4.0	DISCUSSÃO. ....	73
5.0	CONCLUSÃO.....	76
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	77
	ANEXOS .....	85

## LISTA DE FIGURAS

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA – Leite como potencial veículo de *Neospora caninum***

Figura 1 – Ciclo de vida e transmissão do *Neospora caninum* através da eliminação de oocistos por fezes de cães, coiotes e dingos, e a ingestão dos oocistos esporulados pelos hospedeiros intermediários. Os hospedeiros se contaminam pela ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos. A transmissão congênita ocorre com a forma de taquizoítos. Fonte: CARDOSO (2010)..... 20

### **CAPÍTULO III – Detecção de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* no leite de vacas.**

Figura 1 – Monocamada de célula Vero infectada com o isolado de *T.gondii* (RH). Presença de efeito citopático com áreas de rompimento celular. Microscópio invertido (200X).....69

Figura 2 – Figura representativa dos produtos de PCR separados em gel de agarose e corado com safer®, indicando a presença do DNA de *T. gondii* (primers TOX4/TOX5) amplificado de amostras e de isolados do leite cru de vacas..... 72

## LISTA DE TABELAS

### **Capítulo I – Associação e monitoramento de anticorpos anti-*Neospora caninum* no soro e em amostras individuais e coletivas de leite**

Tabela 1 – Monitoramento de anticorpos anti-*nespora caninum* em amostras simultâneas de sangue e leite de bovinos, por RIFI ..... 35

Tabela 2 – Titulação quinzenal para *neospora caninum* no soro sanguíneo de bovinos, por RIFI ..... 35

### **Capítulo II – Influência da mastite subclínica e da produção leiteira na detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* no leite**

Tabela 1 - Resultados da RIFI para *Neospora caninum* no leite individual e no *pool*, na primeira coleta ..... 47

Tabela 2 – Resultados da RIFI para *Neospora caninum* do leite individual e no *pool*, na segunda coleta.....48

### **CAPÍTULO III – Detecção de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* no leite de vacas**

Tabela 1 - Especificações dos *primers* utilizados na reação da polimerase em cadeia para identificação de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*..... 63

Tabela 2 – Componentes da reação da polimerase em cadeia para amplificação do DNA de *Neospora caninum* e respectivas concentrações na reação com os *primers* np6/np21 .....64

Tabela 3 - Componentes da reação da polimerase em cadeia para amplificação do DNA de *Toxoplasma gondii* e respectivas concentrações na reação com os *primers* TOX4/TOX5..... 65

Tabela 4 – Quantidade de DNA obtido de amostras de leite íntegro de 12 vacas..... 70

Tabela 5 - Resultados sorológicos para *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* (RIFI titulada) e da PCR em amostras de leite íntegro de vacas e sedimento dos isolados obtidos em cultivo de célula Vero.....71

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O protozoário *Neospora caninum* é um parasita intracelular obrigatório que desde sua primeira observação em cães na Noruega (BJERKAS *et al.*, 1984) e a sua identificação por DUBEY, 1988, emergiu como uma importante doença, acometendo, principalmente cães e bovinos (DUBEY *et al.*, 2011). Na última década despontou como principal doença reprodutiva de bovinos do mundo inteiro e atualmente é considerada como uma importante causa de aborto em rebanhos leiteiros (TREES *et al.*, 1999; ANDERSON *et al.*, 2000; DUBEY *et al.*, 2003; DUBEY *et al.*, 2011).

A neosporose permanece nos rebanhos bovinos durante várias gerações como uma infecção crônica, sendo transmitido por via transplacentária ao feto (DUBEY *et al.*, 2007). A introdução do protozoário no rebanho foi explicada quando McALLISTER *et al.* (1998) identificaram os oocistos não esporulados nas fezes de cães que ingeriram cistos de *N. caninum*. Esta descoberta permitiu identificar o cão como hospedeiro definitivo do parasita, além do seu papel como hospedeiro intermediário, pela presença das formas de taquizoítas e cistos teciduais. Os bezerros recém-nascidos podem ser infectados após a ingestão de leite contaminado por taquizoítas (UGGLA *et al.*, 1998; DAVISON *et al.*, 2001) e o DNA do protozoário foi detectado no leite e no colostro. Porém não há evidências conclusivas de que a transmissão lactogênica pode ocorrer naturalmente (UGGLA *et al.*, 1998; DIJKSTRA *et al.*, 2001; BJORKMAN *et al.*, 2005; DUBEY *et al.*, 2007).

A infecção por *N. caninum* em bovinos é investigada pela pesquisa de anticorpos no soro sanguíneo, embora o diagnóstico definitivo deve ser realizado com a detecção de antígenos ou DNA do protozoário em tecidos (SILVA *et al.*, 2005; CAMILLO *et al.*, 2011). Contudo, devido ao caráter persistente da infecção, a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* geralmente indica o *status* de portador em bovinos adultos.

Os testes sorológicos mais utilizados no diagnóstico da neosporose bovina são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaios imunoenzimáticos (ELISA), imunoblotting (IB) e testes de aglutinação (AT) (SILVA *et al.*, 2004). A RIFI foi o primeiro teste sorológico utilizado para a demonstração de anticorpos anti-*N. caninum* (DUBEY *et al.*, 1988) e tem sido reconhecida como o teste de referência, com o qual outros testes para detecção de anticorpos têm sido comparados e calibrados (BJORKMAN e UGGLA *et al.*, 1999; ATKINSON *et al.*, 2000).

A neosporose bovina está amplamente distribuída em vários países e é considerada a maior causa de aborto (DUBEY *et al.*, 2007). No Brasil, *N. caninum* foi identificado pela primeira vez na Bahia (GONDIM *et al.*, 1999), e desde então tem sido notificado em diferentes estados, indicando que a neosporose está difundida no país. Estudos sorológicos têm sido realizados em várias regiões do país, como Bahia, São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais (CORBELINI *et al.*, 2000; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2001, ANDREOTTI *et al.*, 2006). O parasita foi demonstrado em fetos bovinos em São Paulo e no Rio Grande do Sul, e cepas de *N. caninum* foram isoladas de cão, na Bahia e de feto bovino, no Paraná (GONDIM *et al.*, 2001; LOCATELLI-DITTRICH, 2002). No Paraná, anticorpos anti-*N. caninum* foram detectados em bovinos leiteiros na região norte do estado e nos municípios de Carambeí, Witmarsum, Chopinzinho, Quatro Barras e em São José dos Pinhais, próximo a Curitiba (OGAWA *et al.*, 1999; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2002; RAGOZO *et al.*, 2003; GUIMARÃES JÚNIOR *et al.*, 2004).

Considerando-se as soroprevalências elevadas da neosporose bovina no Paraná, a ampla distribuição geográfica da doença nas mesorregiões do estado e que a infecção por *Neospora caninum* despontou como a principal doença reprodutiva de bovinos no mundo inteiro, é de fundamental importância investigar o diagnóstico em amostras de leite para diminuir custos e avaliar a viabilidade dos taquizoítas em amostras de leite e, conseqüentemente, o risco de transmissão lactogênica.

Este trabalho está dividido em duas partes. A primeira parte constitui-se de revisão bibliográfica sobre a neosporose bovina. A segunda parte está dividida em três artigos científicos apresentados em forma de capítulos, que foram escritos baseados nos resultados obtidos com o experimento, intitulados: Capítulo I – “Associação e monitoramento de anticorpos anti-*Neospora caninum* no soro e em amostras individuais e coletivas de leite”; Capítulo II – “Influência da mastite subclínica e da produção leiteira na detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* no leite” e Capítulo III – “Detecção de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* no leite de vacas”.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a presença do protozoário *N. caninum* e *T. gondii* no leite.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 monitorar os anticorpos anti-*Neospora caninum* no leite e no soro sanguíneo em vacas leiteiras;

2.2.2 realizar exames sorológicos de neosporose em bovinos;

2.2.3 isolar taquizoítas de *N. caninum* e de *T. gondii* a partir de amostras de leite cru de vacas soropositivas para os dois protozoários

2.2.4 avaliar fatores que interferem na detecção de anticorpos anti-*N. caninum* no leite

2.2.5 avaliar tipos de amostras de leite para pesquisa de anticorpos

2.2.6 realizar PCR em leite cru de vacas soropositivas para *N. caninum* e *T. gondii*.

### 3 REVISÃO LITERATURA

#### 3.1 HISTÓRICO

Em 1984, na Noruega, BJERKAS et al., observaram um protozoário semelhante ao *Toxoplasma gondii* em tecidos de cães. O parasita foi identificado pela primeira vez em 1988, em cães com encefalomielite e em 1989, foi confirmado o primeiro caso de neosporose em bovinos. *Neospora caninum* é morfologicamente similar a outros protozoários apicomplexa de importância em medicina veterinária como *Toxoplasma gondii* e *Sarcocystis sp.* (ANDERSON et al., 2000; DUBEY et al., 2002).

O cão foi o primeiro hospedeiro definitivo do *N. caninum* descrito (McALLISTER et al., 1998) e, recentemente, observou-se que os coiotes também eliminam oocistos pelas fezes (GONDIM et al., 2004) sendo os primeiros canídeos selvagens confirmados como hospedeiros definitivos desse agente.

A neosporose emergiu como uma séria doença no mundo inteiro acometendo, em especial, bovinos e cães. Entretanto o agente também foi isolado de eqüinos, ovinos, caprinos, veados e búfalos e anticorpos foram detectados em gatos, camelos, raposas e vários outros canídeos e hoje está mundialmente distribuída (DUBEY et al, 2011).

#### 3.2 BIOLOGIA DO *Neospora caninum*

O protozoário *Neospora caninum* é um parasita intracelular obrigatório que pertence ao filo Apicomplexa, a classe Sporozoea, ordem Eucoccidiida e família Sarcocistidae. Há duas espécies descritas do gênero *Neospora*, o *Neospora caninum* (DUBEY, 1988), isolado de cérebro de cão, e *Neospora hughesi* (MARSH et al., 1998), isolado de cérebro e medula espinhal de equino.

As formas identificadas do ciclo de vida do *N. caninum* são os: taquizoítas, cistos teciduais (bradizoítas) e oocistos. Taquizoítas e cistos teciduais são os estágios encontrados nos hospedeiros intermediários e ocorrem intracelularmente (DUBEY *et al.*, 2002). Os taquizoítas (organismos proliferativos) são ovoides ou em forma de meia-lua, com núcleo em posição central ou terminal. Nos animais infectados os taquizoítas foram observados em células nervosas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, miócitos, células epiteliais dos túbulos renais e hepatócitos (DUBEY *et al.*, 1988). Nos bovinos há predileção em cérebro, coração, fígado, pulmões de fetos, placenta e medula espinhal de bezerros (DUBEY, 1999).

Os bradizoítas (organismos de multiplicação lenta) localizam-se em grande número dentro do cisto tecidual que são encontrados principalmente em sistema nervoso central e músculos (DUBEY, 2007). Esses cistos podem persistir no hospedeiro infectado por vários anos, sem causar nenhuma manifestação clínica (PETERS *et al.*, 2001). O início da resposta imune do hospedeiro e a presença de outros fatores fisiológicos provavelmente induzam a entrada dos taquizoítas nas células e a diferenciação em bradizoítas, estabelecendo a infecção pela presença dos cistos (PETERS *et al.*, 2001).

Os oocistos são excretados pelas fezes dos hospedeiros definitivos na forma não esporulada. No ambiente ocorre a esporulação e a resistência dos oocistos de *N. caninum* é semelhante ao do *T. gondii*. Porém as informações sobre a biologia do oocisto são escassas. Os cães liberam os oocistos cinco dias ou mais depois de terem sido infectados experimentalmente. O número total de oocistos, o período de latência e a duração da liberação dos oocistos variam (DUBEY, 2007).

Os hospedeiros definitivos são os cães, coiotes e lobos (McALLISTER *et al.*, 1998; GONDIM *et al.*, 2004; DUBEY, *et al.*, 2011), e quando ingerem os cistos de *Neospora caninum* eliminam os oocistos não esporulados nas fezes. Os oocistos não esporulados não são infectivos e esporulam somente fora do hospedeiro. Ocorrendo a esporulação no ambiente, formam-se dois esporocistos, cada qual com quatro esporozoítas. Os oocistos de *N. caninum* são morfológicamente similares aos oocistos de *Hammondia heydorni*

encontrados nas fezes de cães, e *Toxoplasma gondii* e *Hammondia hammondi* encontrados nas fezes de gatos (DUBEY *et al.*, 2003).

Os hospedeiros intermediários do protozoário *N. caninum* são os cães, bovinos, ovinos, caprinos, equinos, búfalos, cervos, ratos silvestres e as raposas (ANDERSON *et al.*, 2000; ALMERIA *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2004).

### 3.3 TRANSMISSÃO

A transmissão do *Neospora caninum* pode ser horizontal, através da ingestão de tecidos infectados com taquizoítas, por cistos teciduais (bradizoítas) ou pela ingestão de água ou comida contaminada pelos oocistos esporulados. A ingestão de oocistos esporulados é a única forma de infecção natural em bovinos depois do nascimento (TREES *et al.*, 2002; GONDIM *et al.*, 2004). Os hospedeiros intermediários infectam-se consumindo os oocistos esporulados (McALLITER, 1999). A infecção é mais frequente em cães de áreas rurais (WANHA *et al.*, 2005; HORNOK *et al.*, 2006). Isso se deve ao fato de que os animais destas áreas têm maior contato com carne e vísceras infectadas, quando comparado aos cães domiciliados de áreas urbanas (MELO *et al.*, 2005).

A transmissão vertical ou transplacentária pode ocorrer em vários hospedeiros, sendo esta via considerada como a principal forma de infecção em bovinos. Uma vaca cronicamente infectada pode transmitir a infecção ao feto por sucessivas gestações e pode apresentar um ou mais abortos durante a sua vida reprodutiva. As vacas infectadas são três a sete vezes mais suscetíveis ao aborto que as vacas não infectadas (DAVIDSON *et al.*, 1999; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2001). A maioria dos bezerros que nascem de mães infectadas são portadores da infecção e, uma vez infectado, o animal parece permanecer infectado por toda a vida (DUBEY, 2003), é a maior parte das infecções congênitas resulta no nascimento de bezerros aparentemente saudáveis (ANTONY & WILLIAMSON, 2001). Dessa forma, o parasita pode

permanecer no rebanho por muitas gerações, sem o envolvimento de um hospedeiro definitivo. No entanto, existem evidências que em abortos epidêmicos causados pelo protozoário, a fonte de infecção seja preferencialmente externa, e não uma reativação da infecção crônica nas vacas (Mc ALLISTER *et al.*, 1996; WOUNDA *et al.*, 1999; Mc ALLISTER *et al.*, 2000). Estudos sorológicos demonstram que vacas que abortam durante um surto epidêmico, provavelmente adquiriram a infecção após o nascimento, devido à falta de associação entre soropositividade de mães e filhas (ANDREOTTI *et al.*, 2005).

A infecção congênita pode resultar em aborto ou natimorto, porém a maioria dos bezerros infectados nasce clinicamente saudável, mas cronicamente infectados. Novilhas congenitamente infectadas podem parir bezerros infectados a infecção pode, assim, ser mantida em um rebanho bovino por muitos anos, sem o envolvimento do hospedeiro definitivo (BJORKMAN *et al.*, 1996; ANDERSON *et al.*, 1997; BJORKMAN *et al.*, 2006). Surtos de aborto em rebanhos bovinos foram relacionados com infecção recente nas novilhas e/ou vacas prenhes (DUBEY *et al.*, 2007).

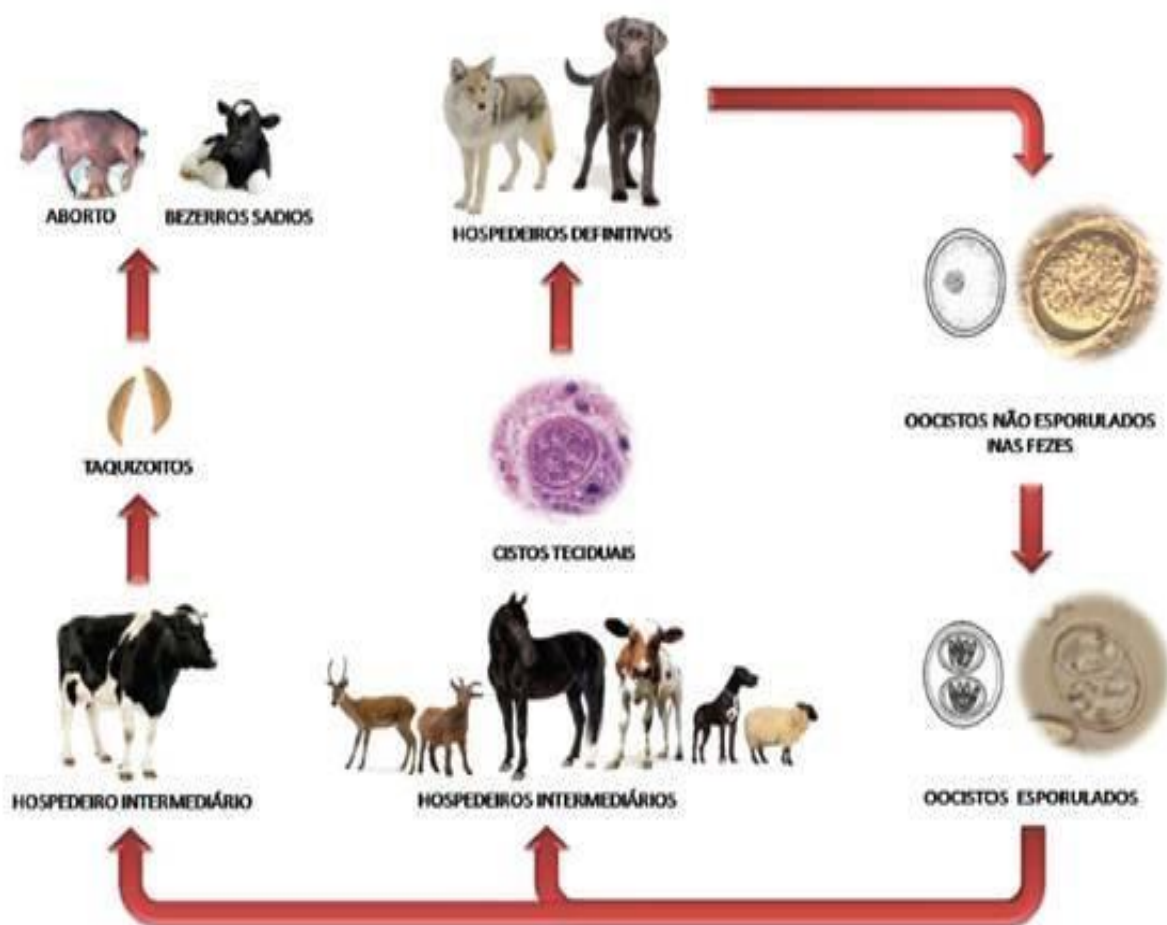
A transmissão lactogênica de *N. caninum* foi demonstrada experimentalmente em bezerros recém-nascidos, alimentados com colostro com taquizoítas, mas não há evidências da infecção natural (DAVISON *et al.*, 2001). O DNA do protozoário foi detectado no leite e no colostro (MOSKWA *et al.*, 2007; DUBEY, 2007).

Cole *et al.* (1995) relataram transmissão lactogênica em ratos amamentados por um rato infectado experimentalmente, e, em outro estudo, dois bezerros foram infectados depois de ingerirem colostro contendo  $3 \times 10^7$  de taquizoítas de *N. caninum* após seis horas do nascimento. Outros dois bezerros que receberam a mesma quantidade de taquizoítas através do leite, por sonda no estômago, não foram infectados (UGGLA *et al.*, 1998). A alimentação de colostro e leite é uma prática comum em rebanhos leiteiros e estudos foram realizados para investigar a possibilidade de transmissão de *N. caninum* em bovinos de diferentes idades quando desafiados oralmente com taquizoítas, porém não se sabe sobre a ocorrência na natureza (DAVISON *et*

*al.*, 2001). Há escassez de informações sobre a transmissão lactogênica de *Neospora caninum* em bovinos.

A transmissão venérea pode ser possível, porém pouco provável, como evidenciado recentemente em novilhas infectadas experimentalmente através da inoculação intrauterina de sêmen contaminado por taquizoítas. Os níveis de anticorpos foram mantidos, sem aumentar sua titulação (SERRANO *et al.*, 2006). Entretanto, o DNA do protozoário foi detectado em sêmen de touros (ORTEGA-MORA *et al.*, 2003; CAETANO-DA-SILVA *et al.*, 2004; FERRE *et al.*, 2005), sugerindo que, se há taquizoítas viáveis, são em pequenas quantidades e infrequentes para a contaminação.

FIGURA 1 – CICLO BIOLÓGICO DE *N. caninum*



FONTE: CARDOSO (2010)

### 3.4 PATOLOGIA E SINAIS CLÍNICOS EM BOVINOS

O *Neospora caninum* encista-se no tecido nervoso (cérebro, medula espinhal, cerebelo e nervos), na retina e no músculo esquelético. Em fetos bovinos, os cistos são encontrados principalmente no cérebro. Nos bezerros com neosporose congênita, os cistos localizam-se no cérebro e na medula espinhal. Ratos foram infectados com sucesso pela inoculação por via oral de taquizoítas e bradizoítas (LINDSAY *et al.*, 1990). Esse resultado é interessante, pois sabe-se que somente os bradizoítas dos cistos são resistentes à solução de pepsina ácida, indicando que o hábito dos carnívoros é uma via de infecção de *N. caninum*.

A neosporose é a maior causa de abortamento em bovinos de leite, causando alterações reprodutivas e bezerros doentes (DUBEY, 2011). As vacas de todas as idades podem abortar, a partir de três meses de gestação até o termo, porém, a maioria dos abortamentos ocorre entre o quinto e o sexto mês de gestação. Os fetos podem morrer no útero, serem reabsorvidos, mumificados, autolisados, nascerem mortos, nascerem vivos com sinais clínicos, nascerem vivos e clinicamente normais, mas infectados (THURMOND *et al.*, 1995). A probabilidade de abortamentos é maior nas vacas soropositivas do que as soronegativas (THURMOND e HIETALA *et al.*, 1997; DUBEY, *et al.*, 2007).

A grande maioria dos bezerros que nascem de vacas soropositivas foi infectada via congênita e mantém a infecção no rebanho. Os animais que nascem sem sinais clínicos são portadores e reservatórios potenciais no rebanho (LINDSAY & DUBEY, 1990). Nos rebanhos bovinos os abortamentos endêmicos são associados com o estado sorológico da mãe e das filhas, ou seja, a principal via de transmissão nestes rebanhos é vertical (THURMOND E HIETALA, 1997; SCHARES *et al.*, 2002). Outros sinais clínicos foram relatados como: deformações de membros, ataxia, diminuição dos reflexos patelares, perda da propriocepção, paralisia, opistótono, exoftalmia, cegueira e deformações associadas com lesões das células nervosas embrionárias (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2003).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMERÍA, S; FERRER, D.; PAVÓN, M.; CASTELLÀ, J; MANAS, S.; Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediated host of *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, n.107, p. 287-294. 2002.

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

ANDERSON, M.L.; REYNOLDS, J.P.; ROWE, J.D.; SVERLOW, K.W.; PACKHAM A.E.; BARR, B.C.; CONRAD, P.A. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. Infection in dairy cattle. **Journal American Veterinary Association**, v. 210, p. 1169-1172, 1997.

ANDREOTTI, R.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; PAIVA, F. Neosporose em bovinos. UFMS. **Série Qualificação Rural**, v.3, p.71-103, 2005.

ANDREOTTI, R.; OLIVEIRA, J.M.; ARAÚJO E SILVA, E.; OSHIRO, L.M.; MATOS, M.F.C. Occurrence of *Neospora caninum* in dogs and its correlation with visceral leishmaniasis in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 375-379, 2006.

ANTONY, A.; WILLIAMSON, N.B. Recent advances in understanding the epidemiology of *Neospora caninum* in cattle. **New Zealand Veterinary Journal**, v.49, p.42-47, 2001.

ATKINSON, R.A.; COOK, R.W.; REDDACLIFF, L.A.; ROTHWELL, J.; BROADY, K.W.; HARPER, P.A.W., ELLIS, J.T. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in a dairy cattle herd. **Australian Veterinary Journal**, v. 78, p. 262-266, 2000.

BJERKAS, J; MOHN, S. F; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Z. Parasitenkd** v. 70, p. 271-274. 1984.

BJORKMAN, C., ALVAREZ-GARCIA, G.; CONRATHS, F.J.; MATTSSON, J.G.; ORTEGA-MORA, L.M., SAGER, H.; SCHARES, G. *Neospora caninum* IgG avidity tests: an interlaboratory comparison. *Veterinary Parasitology*, v. 140, p. 273-280, 2006.

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

BJORKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, v.29, P. 1497-1507, 1999.

CAETANO-DA-SILVA, A.; FERRE, I.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; NAVARRO, V.; ADURIZ, G.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L.M. Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended sêmen from naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 62, p. 1329-1336, 2004.

CAMILLO, G.; CEZAR, A.S.; ANTONELLO, A.M.; SANGIONI, A.; FLORES, E.F.; PEREIRA, G.R.; GONÇALVES, P.B.D.; VOGEL, F.S.F. Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras individuais e coletivas de leite de bovinos pela reação de imunofluorescência indireta. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 482-486, 2011.

COBERLLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.F.E.; GONDIM, L.F.P.; WALD, V. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.103, n.3, p.195-201, 2002.

COLE, R.A.; LINDSAY, D.S.; BLAGBUM, B.L.; DUBEY, J.P. Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. **American Society of Parasitologists**, v.816. p. 730-732, 1995.

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

DAVISON, H. C; GUY, J. W; McGARRY, F; GUY, F; WILLIAMS, D. J. L; KELLY, D. F; TREES, A. J; Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. **Research Veterinary Science**, v. 70, p. 163-168. 2001.

DIJKSTRA, T.; EYSKER, M.; SCHARES, G.; CONRATHS, F.J.; WOUDA, W.; BARKEMA, H.W. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v.8, p.747-752, 2001.

DUBEY J.P.; BARR B.C; BARTA J.R., BJERKAS I.; BJORKMAN C.; BLAGBURN B.L.; BOWMAN D.D.; BUXTON D.; ELLIS J.T.; GOTTSTEIN B.; HEMPHILL A.; HILL D.E.; HOWE D.J.; JENKINS M.C.; KOBAYASHI Y.; KOUDELA B.; MARSH A.E.; MATTSSON J.G.; MCALLISTER M.M.; MODRY D.; OMATA Y.; SIBLEY L.D.; SPEER C.A.; TREES A.J.; UGGLA A.; UPTON S.J.; WILLIAMS D.J.; LINDSAY D.S.; Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 929-946, 2002.

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

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

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

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

FERRE, I.; ADURIZ, G.; DEL-POZO, I.; REGIDOR-CERRILHO, J.; ATXAERANDIO, R.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; HURTADO, A.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L.M. Detection of *Neospora caninum* in the

sêmen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, v.63, p. 1504-1518, 2005.

GONDIM, L. F. P.; McALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLIKA, D. E. Coyotes (*Canis Latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n.02; p. 159-16. 2004.

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

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

HORNOK, S.; EDELHOFER, R.; FOK, É.; BERTA, K.; FEJES, P.; RÉPÁSI, A.; FARKAS, R. Canine neosporosis in Hungary: Screening for seroconversion of household, herding and stray dogs. **Veterinary Parasitology**, v.137, P. 197-201, 2006.

HUANG, C. C.; YANG, C .H.; WATANABE, Y.; LIAO, Y. K.; OOI, H. K. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). **Veterinary Research**, v.35, p. 283-290. 2004.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). **Journal Parasitology**, v.76, p.410-413, 1990.

LOCATELLI-DITTRICH, R. **Diagnóstico sorológico, isolamento, cultivo e caracterização molecular de Neospora caninum em bovinos leiteiros e em equinos no estado do Paraná, Brasil**. 184 p. Tese Doutorado em Processos Biotecnológicos, Agroindústria, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

LOCATELLI-DITTRICH, R., RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; PINCKNEY, R.D.; SOUSA, R.S.; LEITE, L.C.; THOMAZ-SOCCOL, V. Isolation

of *Neospora caninum* from a blind calf in Paraná, southern Brazil. **The Veterinary Record**, v.153, n. 12, p.366-367, 2003.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V.T.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; VINNE, R.; PINCKNEY, R.D. Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in Southern Brazil. **The Journal of Parasitology**, v. 87, n. 6, p. 1493-1494, 2001.

MARSH, A. E.; BARR, B. C.; PACKHAM, A. E.; CONRAD, P. A. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **The Journal of Parasitology**, v. 84, p. 530-535. 1998.

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

MCALLISTER, M.M.;BJORKMAN, C.; ANDERSON-SPRECHER, R.; ROGERS, D.G. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 217, p. 881-887, 2000.

MOSKWA, B.; PASTUSIAK, K.; BIEN, J.; CABAJ, W. The first detection of *Neospora caninum* DNA in colostrum of infected cows. **Research Parasitology**, v. 100, p. 633-636, 2007.

OGAWA, L.; NAVARRO, I.T.; VIDOTO, O.; FREIRE, R.L.; GONDIM, L.F.P.; MARANA, E.R.M.; SILVA, E.H.; SEDEMAKA, T.M.; DAMAS, A.C.; MATTOS, M.R.; PRUDENCIO, L.B.; TSUTSUI, V.S.; SANTOS, A.P.M. Avaliação sorológica do *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em bovinos de leite da região do norte do Paraná. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11, 1999, Salvador, Anais...Salvador: **Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, 1999. P.225.

ORTEGA-MORA, L.M; FERRE, I.; DEL-POZO, I.; CAETANO-DA-SILVA, A.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ADURIZ, G. Detection of *Neospora caninum* in sêmen of bulls. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 301-308, 2003.

PETERS, M., LUTKEFELS, E.; HECKEROTH, A. R.; SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **International Journal Parasitology**, v. 31; p. 1144-1148. 2001.

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

RODRIGUES, A. A. R., GENNARI, S. M., AGUIAR, D. M., SREEKUMAR, C., HILL, D. E., MISKA, K. B., VIANNA, M. C. B., DUBEY, J. P. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 124; p. 139-150. 2004.

SHARES, G.; BARWALD, A.; STAUBACH, C.; SONDGEN, P.; RAUSER, M.; SCHRODER, M.; PETERS, M.; WURM, R.; SELHORST, T.; CONRATHS, F.J. p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **Veterinary Parasitology**, v.106, p.293-305, 2002.

SILVA, C.A. Diagnóstico da neosporose bovina. In: **XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e I Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses**, Ouro Preto, MG, 2004.

SILVA, D.A.O.; VITALIANO, S.N.; MINEO, T.W.P.; FERREIRA, R.A.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J.R. Evaluation of homologous, heterologous, and affinity conjugates from the serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). **Journal Parasitology**, v. 91, p. 1212-1216, 2005.

THURMOND, M.; HIETALA, S.K. Strategies to control *Neospora* infection in cattle. **Bovine Practice**, v.29, p.60-63, 1995.

THURMOND, M.C.; and HIETALA, S.K. Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first lactation dairy cows. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.210, p. 672-674, 1997.

TREES, A. J.; DAVIDSON, H. C.; INNES, E. A.; WADTLING, J. M. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International Journal Parasitology**, v. 29, p. 1195-1200. 1999.

TREES, A.J.; MCALLISTER, M.M.; GUY, C.S.; MCGARRY, J.W.; SMITH, R.F.; WILLIAMS, D.J.L. *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 147-154, 2002.

UGGLA, A; STENLUND, O. J. M; HOLMDAHL, E. B; JAKUBEK, P; THEBO, H. KINDAHL; BJORKAN, C. Oral *Neospora Caninum* inoculation of neonatal calves. **Interest Journal Parasitology**, v.28, p. 1467-1472. 1998.

WANHA, K.; EDELHOFER, R.; GABLER-EDUARDO, C.; PROSL, H. Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs and foxes in Austria. **Veterinary Parasitology**, v.128, p. 189-193, 2005.

WOUDA, W.; DIJKSTRA, Th.; KRAMER, A.M.H.; VAN MAANEN, C.; BRINKHOF, J.M.A. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1677-1682, 1999.

## CAPÍTULO I

### MONITORAMENTO DE ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum* NO SORO E EM AMOSTRAS INDIVIDUAIS E COLETIVAS DE LEITE

#### RESUMO

A neosporose bovina é uma doença causada pelo protozoário *Neospora caninum* que acarreta em prejuízo econômico em rebanhos leiteiros. A infecção pode resultar em abortos, mumificações, mortes uterinas seguidas de absorções e natimortos. O diagnóstico é realizado com a detecção de anticorpos séricos pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) como metodologia de referência. As fontes de transmissão da neosporose conhecidas são a vertical e a horizontal, porém a transmissão lactogênica tem sido observada experimentalmente. O objetivo deste trabalho foi detectar, monitorar e verificar a concordância entre a presença de anticorpos no soro sanguíneo e no leite de bovinos pertencentes a um rebanho leiteiro da região metropolitana de Curitiba, no Paraná; avaliar a eficácia da detecção de anticorpos em amostras coletivas de leite, para diminuir custos. Foram monitoradas amostras simultâneas e quinzenais de sangue e leite de 12 vacas soropositivas, para *Neospora caninum*, totalizando 165 amostras, durante seis meses. As amostras soropositivas foram tituladas. Amostras de leite proveniente do tanque de armazenamento foram coletadas semanalmente, totalizando 20 amostras. A soroprevalência da neosporose no rebanho foi de 23,07% (12/52 animais). Houve boa concordância entre as amostras de sangue e leite (89,6%). Somente 3,63 % (6/165) das amostras foram positivas no sangue e negativas no leite e essas vacas tinham título 1:50. Houve boa correlação de diagnóstico entre amostras coletivas e amostras individuais de leite (90%). Os anticorpos anti-*Neospora caninum* podem ser detectados no leite pelo método da RIFI, e o diagnóstico pode ser realizado no rebanho em amostras de leite.

Palavras-chave: *Neospora caninum*, RIFI, leite, sangue.

## ABSTRACT

Bovine neosporose is a disease caused by protozoan *Neospora caninum* and causes economic losses in dairy herds. The infection can result in abortion, mummification, deaths in the uterus followed by absorptions and stillbirths. The diagnosis is made by detection of serum antibodies by indirect immunofluorescence assay (IFA) as the reference methodology. The transmission form of neosporosis known are the vertical and horizontal, however, the lactogenic transmission has been experimentally observed. The objective of this study was to detect, monitor and verify the correlation between the presence of antibodies in serum and milk of cattle from a dairy herd in the metropolitan region of Curitiba, Parana; evaluate the effectiveness of antibody detection in milk collective samples to reduce costs. Simultaneous and biweekly blood and milk samples of 12 seropositive cows were monitored for *Neospora caninum*, totaling 165 samples, for six months. The seropositive samples were titrated. Milk samples from the storage tank were collected weekly, totaling 20 samples. The neosporosis seroprevalence in the herd was 23.07% (12/52 animals). There was good agreement between blood and milk samples (89.6 %). Only 3.63 % (6/165) of the samples were positive in the blood and negative in the milk and these cows had a 1:50 titer. There was good diagnostic correlation between the collective and individual milk samples (90%). The anti-*Neospora caninum* antibodies in the milk can be detected by IFA method, and the diagnosis in the herd can be made in milk samples.

Key words: *Neospora caninum*, IFI, milk, serum

## 1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo protozoário *Neospora caninum* está distribuída em várias espécies, principalmente em vacas leiteiras (DUBEY, 2003). *Neospora caninum* é considerado a maior causa de abortamento em vacas em vários países, causando perdas econômicas consideráveis (DUBEY *et al*, 2007). O diagnóstico é baseado, principalmente, em testes sorológicos como reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaios imunoenzimáticos (ELISA), Imunoblotting (IB) e aglutinação direta, usando taquizoítos intactos ou antígenos de taquizoítos para a detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos (JENKINS *et al.*, 2002). A RIFI foi o primeiro teste sorológico utilizado para detecção de anticorpos anti- *N. caninum*, e apresenta uma boa sensibilidade e especificidade, sendo considerado teste de referência (padrão ouro) (SILVA *et al*, 2004). Na RIFI os taquizoítos utilizados são intactos, e os anticorpos detectados são os direcionados para antígenos presentes na superfície celular do parasita (TREES *et al*, 1999).

Amostras coletivas de leite foram utilizadas para a detecção de anticorpos através de ensaios enzimáticos contra agentes infecciosos como vírus (PRITCHARD, 2001; DIAS e SAMARA, 2003; HUMPHRY *et al*, 2012), bactérias (TABATABAEIZADEH *et al*, 2011; LEONARD *et al*, 2004; NIELSEN *et al.*, 2000) e helmintos (SANCHEZ *et al.*, 2002). Amostras coletivas de leite também foram utilizadas para a detecção de *N. caninum* utilizando o ELISA como teste diagnóstico e foi observada boa concordância com amostras de soro e leite individuais (CHANLUN *et al.*, 2006; GONZÁLEZ-WARLETA *et al.*, 2011). A maioria dos estudos com amostras coletivas de leite são de amostras pontuais, porém Humphry *et al* (2013) ressaltaram a importância de monitorar a presença de anticorpos em amostras coletivas de leite em pelo menos dois momentos diferentes. Chanlun *et al* (2006) relataram que somente uma amostra coletiva de leite deve ser interpretada com cautela e a repetição dos testes com amostras coletivas em intervalos regulares determina melhor o *status* do rebanho. TABATABAEIZADEH *et al* (2011) ressaltaram que devem ser coletadas amostras coletivas de leite pelo menos a cada três meses.

Alguns estudos utilizaram o ELISA como teste para detecção de anticorpos anti-*N.caninum* no leite ( UGGLA *et al.*, 1998; DAVISON *et al.*, 2001; CHANLUN *et al.*, 2002; SCHARES *et al* 2004; HURKOVA *et al*, 2005; MILNE *et al.*, 2006; GONZALÉZ-WARLETA *et al.*, 2011; BYREM *et al.*, 2012), porém, existem poucos estudos com a utilização da RIFI para pesquisa de anticorpos no leite bovino. Existem poucas informações sobre a RIFI e detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* no leite e não há estudos sobre a dinâmica de anticorpos anti-*N. caninum* no soro sanguíneo, amostras individuais de leite e amostras coletivas de leite utilizando a RIFI como teste.

Nos estudos epidemiológicos, o teste de ELISA é utilizado e verificou excelente correlação entre detecção de anticorpos IgG no leite e soro, porém há escassez de estudos que monitorem os anticorpos anti-*Neospora caninum* durante um período de tempo.

O presente estudo objetivou avaliar o uso de amostras individuais e coletivas de leite para pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum*; monitorar os títulos de anticorpos séricos e comparar com a detecção de anticorpos em amostras simultâneas de leite durante seis meses, para estabelecer a correlação diagnóstica de neosporose no leite e no soro.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. ANIMAIS**

No presente estudo 12 vacas em lactação, soropositivas para *Neospora caninum*, e três vacas soronegativas para o parasita, foram monitoradas quinzenalmente, de Outubro de 2012 a Março de 2013. As vacas são procedentes de um rebanho leiteiro com histórico de abortamentos e localizado na região metropolitana de Curitiba/PR (Quatro Barras: 25° 22' 2" Sul, 49° 4' 30" Oeste). O rebanho possui 52 vacas e é submetido à imunização semestral de brucelose e febre aftosa e ao controle de tuberculose periodicamente.

## 2.2. AMOSTRAS

Foram realizadas 11 coletas quinzenais e simultâneas de sangue e leite das 15 vacas, totalizando 165 amostras de sangue e 165 amostras de leite, durante seis meses. Amostras coletivas de leite foram coletadas semanalmente do tanque de armazenamento, totalizando 20 amostras, para monitorar e correlacionar com a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* séricos e no leite individual. Amostras de sangue foram coletadas por punção da veia coccígea e acondicionadas em tubos vacutainer sem anticoagulante. As amostras foram centrifugadas durante cinco minutos, a 5000 rpm para a obtenção do soro. As amostras de leite foram coletadas dos quatro tetos obtendo-se o *pool* de leite por vaca. Realizou-se a desinfecção prévia dos tetos com álcool 70% e o leite foi acondicionado em tubos estéreis. Os tubos foram centrifugados a 3.500 rpm por 10 minutos para a extração da camada de gordura com pipetas estéreis. As amostras de soro e de leite desnatado foram armazenadas a -20 °C até a análise.

## 2.3. REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

A pesquisa de anticorpos (IgG) anti *N. caninum* no soro e leite foi realizada pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI). As lâminas foram sensibilizadas previamente com taquizoítas de *N. caninum* (cepa NC-1), segundo Locatelli-Dittrich *et al* ,2006. Os soros sanguíneos bovinos foram diluídos a 1:50, em solução salina tamponada (PBS pH 7,2) e as amostras positivas foram submetidas à titulação para determinação do título máximo da reação.

O leite foi utilizado puro seguindo a técnica padronizada da imunofluorescência indireta (Dubey, 2003). O conjugado anti-IgG bovino (SIGMA®) foi diluído a 1:100 em PBS pH 7,2. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio equipado com fonte de luz ultravioleta. Os soros-controle negativo e positivo foram utilizados em cada lâmina analisada. A

presença de fluorescência em todo o taquizoíta foi considerada como resultado positivo. A fluorescência na porção apical do taquizoíta foi considerada negativa.

#### 2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As amostras de soro sanguíneo e de leite de cada vaca foram testadas paralelamente. Os resultados da detecção de anticorpos no soro e leite de cada vaca foram comparados, utilizando-se os resultados da RIFI dos soros como referência. As amostras coletivas foram comparadas com os resultados individuais de leite. Os dados foram submetidos às análises descritivas para o cálculo dos percentuais de positividade. O índice *kappa* de concordância foi calculado utilizando o software GraphPad® entre as amostras de leite e soro sanguíneo. A sensibilidade foi de 100% e a especificidade 85%.

### 3. RESULTADOS

A soroprevalência de anticorpos anti-*N. caninum* do rebanho foi de 23,07% (12/52). A comparação entre os resultados de detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* no soro sanguíneo e no leite (TABELA 1) demonstrou 96,36% (159/165) de concordância e o índice *kappa* de 89,6%. Nas amostras positivas, os títulos de anticorpos variaram de 50 a 400 (TABELA 2). As vacas que mantiveram o título de 1:50 (33,3%) negativaram no leite em algumas amostras (6/165) e nenhuma vaca com título acima de 1:100 foi negativa para o leite. Das três vacas soronegativas do estudo, em todas as amostras, não houve detecção de anticorpos anti- *N. caninum* no soro e no leite.

Das 20 amostras coletivas de leite proveniente do tanque de armazenamento 90% (18/20) foram positivas para *Neospora caninum* na RIFI.

TABELA 1 – MONITORAMENTO DE ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum* EM AMOSTRAS SIMULTÂNEAS DE SANGUE E LEITE DE BOVINOS PELA TÉCNICA DE RIFI

Dia	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
Bovino	S L	S L	S L	S L	S L	S L	S L	S L	S L	S L	S L
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
7	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

S: SANGUE L: LEITE

+: POSITIVO -: NEGATIVO

RIFI: REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

TABELA 2 – TITULAÇÃO QUINZENAL PARA *Neospora caninum* NO SORO SANGUÍNEO DE BOVINOS PELA TÉCNICA DE RIFI

Dia	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
Bovino											
1	1:100	1:100	1:200	1:200	1:50	1:50	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200
2	1:50	1:50	1:200	1:100	1:100	1:400	1:400	1:400	1:400	1:200	1:200
3	1:400	1:400	1:400	1:200	1:400	1:200	1:400	1:200	1:400	1:200	1:200
4	1:400	1:200	1:400	1:200	1:400	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200
5	1:400	1:200	1:200	1:200	1:200	1:100	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200
6	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50
7	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	-	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50
8	1:100	1:400	1:200	1:400	1:400	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200
9	1:100	1:400	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:400
10	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50
11	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50
12	1:50	1:400	1:200	1:200	1:50	1:100	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200

-: NEGATIVO

RIFI: REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

#### 4. DISCUSSÃO

A concordância nos resultados entre a detecção de anticorpos nas amostras de leite e de soro sanguíneo na RIFI foram similares com aqueles obtidos por CAMILLO *et al* (2011a) em que amostras de soro sanguíneo com titulação igual ou acima de 1:100 obtiveram 100% de concordância entre as amostras simultâneas. Amostras cujo título de anticorpos foi de 50, CAMILLO *et al* (2011a) obtiveram apenas 40% de concordância, provavelmente porque foram utilizadas amostras pontuais e não houve um monitoramento na detecção de anticorpos anti-*N. caninum* no sangue e no leite, simultaneamente. Observa-se que quando utilizadas amostras de leite de vacas com título de anticorpos acima de 1:200, há 100 % de concordância (OOI *et al.*, 2000), o que discorda com o presente estudo em que amostras acima de 1:100 no soro foram todas positivas no leite. Camillo *et al* (2011a) observaram que amostras soropositivas com titulação 1:50 foram negativas no leite, o que ocorreu em algumas amostras no presente estudo.

Estudos utilizando o ELISA para a detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* no soro, em amostras individuais e coletivas de leite mostram boa concordância entre os resultados (SHARES *et al*, 2004; MILNE *et al.*, 2006; GONZÁLEZ-WARLETA *et al.*, 2011).

GONZÁLEZ-WARLETA *et al* (2011), relacionaram as variações nos valores de ELISA no leite com variações de anticorpos no soro. Estes resultados são consistentes com o fato de que anticorpos IgG são transferidos a partir do sangue circulante para o leite, que é também o mecanismo mais provável para a determinação do nível de anticorpos contra *N. caninum* no leite, ou seja, quanto maior o título de anticorpos no soro, maior a chance de detecção no leite (SHERER *et al*, 2002; DIAS e SAMARA *et al*, 2003; TIZARD *et al*, 2008).

Não há informações sobre monitoramento periódico dos anticorpos em amostras simultâneas de sangue e leite com a RIFI. No presente estudo foi avaliada a cinética dos anticorpos de maneira simultânea, durante seis meses. Somente uma vaca tornou-se negativa na detecção de anticorpos no soro sanguíneo, demonstrando uma estabilidade dos níveis de anticorpos séricos, que conseqüentemente, apresentam-se no leite.

Observou-se que as amostras negativas no leite foram de vacas com titulações 1:50 devido à baixa quantidade de anticorpo no sangue e, conseqüentemente, no leite.

Os níveis de anticorpos em amostras coletivas de leite possuem uma boa correlação com a proporção de animais soropositivos (CHANLUN *et al*, 2002; CAMILLO *et al*, 2011ab). Estudos que utilizaram detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras coletivas de leite utilizando o ELISA como teste diagnóstico, afirmam que para os anticorpos serem detectados pelo menos 10-15% das vacas devem ser positivas (UGGLA *et al.*, 2000; CHANLUN *et al.*, 2002). Das amostras coletivas de leite, 90% (18/20) foram positivas na detecção de anticorpos anti-*N. caninum* com a soroprevalência do rebanho de 23,07% provavelmente devido à alta concordância de resultados entre soro sanguíneo e leite mesmo variando as titulações de 50 a 400.

Neste estudo uma grande maioria das amostras coletivas de leite foi positiva, demonstrando a viabilidade do teste e sua aplicabilidade para o diagnóstico do rebanho, os resultados foram similares com Camillo *et al*, (2011b); porém Humphry *et al* (2012) ressalta a importância de coletar pelo menos duas amostras em momentos diferentes para obter resultados mais confiáveis para o diagnóstico.

## 5. CONCLUSÃO

As análises de amostras pareadas de sangue e leite demonstram boa concordância na detecção de anticorpos IgG anti-*Neospora caninum* durante seis meses; amostras coletivas de leite podem ser empregadas para estudos epidemiológicos, fornecendo informações sobre a soropositividade de *N. caninum*.

O monitoramento de anticorpos de amostras pareadas demonstra que há estabilidade de anticorpos da classe G no leite e no sangue.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BYREM, T.M; BARTLETT, P.C; DONOHUE, H; VOISINET, B.D; HOUSEMAN, J.T. Performance of a commercial serum ELISA for the detection of antibodies to *Neospora caninum* in whole and skim milk samples. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p.249-253, 2012.

CAMILLO, G., ANTONELLO, M.A e colaboradores. Reação de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras coletivas de leite. **Ciência Rural.**, v.41, n.9, p.1600-1604, 2011.

CAMILLO, G.; CEZAR, A.S.; ANTONELLO, A.M.; SANGIONI, A.; FLORES, E.F.; PEREIRA, G.R.; GONÇALVES, P.B.D.; VOGEL, F.S.F. Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras individuais e coletivas de leite de bovinos pela reação de imunofluorescência indireta. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 482-486, 2011.

CHANLUN, A., NASLUND, K., AIUMLAMAI, S., BJORKMAN, C. Use of bulk milk for detection of *Neospora caninum* infection in dairy herds in Thailand. **Veterinary Parasitology.**, v.110, p.35-44, 2002.

CHANLUN, A.; EMANUELSON, U; AIUMLAMAI, S; BJORKMAN, C. Variations of *Neospora caninum* antibody levels in milk during lactation in dairy cows. **Veterinary Parasitology**, v. 141, p. 349-355, 2006.

DAVISON, H. C; GUY, J. W; McGARRY, F; GUY, F; WILLIAMS, D. J. L; KELLY, D. F; TREES, A. J; Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. **Research Veterinary Science**, v. 70, p. 163-168. 2001.

DIAS, F.C; SAMARA, S.I. Detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina no soro sanguíneo, no leite individual e no leite de conjunto em tanque de expansão de rebanhos não vacinados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.**, v.40, p.161-168, 2003.

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

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

GONZÁLEZ-WARLETA, M; CASTR-HERMIDA, J.A; CARRO-CORRAL, C; MEZO, M. Anti-*Neospora caninum* antibodies in milk in relation to production losses in dairy cattle. **Preventive Veterinay Medice**, v.101, p.58-64, 2011.

HUMPHRY, R.W; BRULISAUER, F; McKENDRICK, I.J; NETTETON, P.F; GUNN, G.J. Prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and associated risk factors in Scottish diary herds. **Veterinary Record**, v.3, 2012.

JENKINS, M; BASZLER, T; BJORKMAN, C.; CHARES, G; WILLIAMS, D. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-assiciated bovine abortion. **International Journal Parasitology**, v.32, p.631-636, 2002.

LOCATELLI-DITTRICH, R; DITTRICH, J.R; TICHARTZ, R.R.T.B; GASINO-JOINEAU, M.E; ANTUNES, J; PINCKNEY, R.D; DECONTO, I; HOFFMANN, D.C.S; THOMAZ-SOCCOL, V. Investigation of *Neospora sp.* and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Parana State, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.135, p.215-221, 2006.

MILNE, E; CRAWSHAW, M; BROCKLEHURSTS, S; WRIGHT, S; MALEY, S; INNES, E. Associations between *Neospora caninum* specific antibodies in serum and milk in two dairy herds in Scotland. **Preventive Veterinary Medicine**, v.77, p.31-47, 2006.

NIELSEN, S.S. et al. Bulk tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v.44, p.1-7, 2000.

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

PRITCHARD, G. Milk antibody testing in cattle. **In practice**, v.23, p.542-549, 2001.

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

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

SCHARES, G; BARWALD, A; STAUBACH, C; WURM, R; RAUSER, M; CONRATHS, F.J; SCHOEDER, C. Adaptation of a comercial ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. **Veterinary Parasitology**, v.120, p.55-63, 2004.

SILVA, C.A. Diagnóstico da neosporose bovina. In: **XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e I Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses**, Ouro Preto, MG, 2004.

TABATABAEIZADEH, E; TABAR, G.H; FARZANEH, N. Prevalence of *Lepstospira hardjo* antibody in bulk tank milk in some dairy herds in Mashhad Suburb. **African Journal Microbiology**, v.33, 2011.

TREES, A. J.; DAVIDSON, H. C.; INNES, E. A.; WADTLING, J. M. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International Journal Parasitology**, v. 29, p. 1195-1200. 1999

UGGLA, A; STENLUND, O. J. M; HOLMDAHL, E. B; JAKUBEK, P; THEBO, H. KINDAHL; BJORKAN, C. Oral *Neospora Caninum* inoculation of neonatal calves. **Interest Journal Parasitology**, v.28, p. 1467-1472. 1998.

## CAPÍTULO II

### INFLUÊNCIA DA MASTITE SUBCLÍNICA E DA PRODUÇÃO LEITEIRA NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*NEOSPORA CANINUM* NO LEITE

#### RESUMO

Neosporose é uma das principais causas de aborto, acarretando importantes perdas econômicas, principalmente em bovinos de leite. O diagnóstico da doença é baseado na pesquisa de anticorpos no soro sanguíneo através das técnicas sorológicas como ensaio imunoenzimático (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Porém, atualmente, têm sido utilizadas amostras de leite para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum*. Há boa concordância com amostras de soro sanguíneo, sendo mais prático e diminuindo custos. No entanto, os fatores como fase de lactação, produção leiteira e inflamação da glândula mamária poderiam influenciar no diagnóstico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da mastite subclínica, da produção leiteira e avaliar o melhor tipo de amostra para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* no leite. Durante seis meses foram obtidas 132 amostras de leite (*pool*) antes da primeira ordenha da manhã de 12 vacas soropositivas para *Neospora caninum* e realizado o CMT. A RIFI foi realizada com amostras de leite desnatado (puro) e os dados de produção leiteira foram obtidos diariamente. Das 132 amostras de leite, em 56 (42,4%) amostras foram detectadas anticorpos e o CMT foi positivo. Em 69 (54,3%) amostras de leite foram detectados anticorpos anti-*Neospora caninum*, porém o CMT foi negativo. Em 4,5% (6/132) amostras foram negativas na detecção de anticorpos no leite e o CMT negativo e em somente uma amostra (0,75%) a detecção de anticorpos no leite foi negativa e o CMT foi positivo. Os anticorpos anti-*Neospora caninum* foram detectados no leite das 12 vacas e em todas as categorias de produção leiteira: 18,2% (2/11) com produção leiteira diária < 10 litros; 45,4% (5/11) com a produção leiteira diária entre 10-15 litros e em 36,4% (4/11) a produção leiteira diária entre 15-25 litros. Os resultados obtidos demonstram que o leite representa uma alternativa de amostragem diagnóstica para propriedades leiteiras e que a presença da mastite subclínica e o volume de produção leiteira diária não interferem na detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* no leite e a melhor amostra para a pesquisa de anticorpos no leite é a do *pool* dos quatro tetos.

Palavras-chave: *Neospora caninum*, anticorpos, leite, interferência

## ABSTRACT

Neosporosis is one of the major cause of abortion, causing serious economic losses, especially in dairy cattle. The diagnosis is based on the detection of antibodies in serum by serological techniques such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect immunofluorescence assay (IFA). However, nowadays milk samples have been used to detect anti-*Neospora caninum* antibodies. There is good agreement with blood samples as it is more practical and reducing costs. However, factors such as stage of lactation, milk production and inflammation of the mammary gland could influence the diagnosis. The objective of this study was to evaluate the influence of subclinical mastitis and milk production and evaluate the best type of sample for detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in the milk. For six months 132 milk samples (pool) were obtained before the first morning milking of 12 *Neospora caninum* seropositive cows and performed the CMT. The IFA was performed in samples of skimmed milk (non-diluted) and milk production data were obtained daily. In 56 of the 132 milk samples (42.4%) were detected antibodies and the CMT was positive. In 69 (54.3%) milk samples, anti-*Neospora caninum* antibodies were detected , but the CMT was negative. 4.5% (6 /132) samples were negative for the detection of antibodies in the milk and the CMT was negative and only in one sample (0.75%) the detection of antibodies in the milk and was negative and the CMT was positive. The anti-*Neospora caninum* antibodies were detected in the milk of 12 cows and in all categories of dairy production: 18.2 % (2/11) with daily milk production < 10 liters; 45.4 % (5/11) with daily milk production of 10 to 15 liters and 36.4% (4/11) with daily milk production between 15 to 25 liters. The results demonstrate that milk is an alternative of diagnostic sampling for dairy herd and the presence of subclinical mastitis and the amount of daily milk production does not interfere in the detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in the milk and the best sample for the detection of antibodies in the milk is a pool of the four udders.

Key words: *Neospora caninum*, milk, antibody, interference

## 1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo protozoário *Neospora caninum* está amplamente distribuída em todo o mundo e é reconhecida como uma das maiores causas de aborto, causando com importantes perdas econômicas, principalmente em bovinos de leite (DUBEY, 2003). O diagnóstico da neosporose é baseado, principalmente, na pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* no soro sanguíneo. Entretanto, alguns estudos utilizaram como amostra o leite, destacando-se a praticidade e os menores custos inerentes a essa metodologia (DAVISON *et al.*, 2001; SHARES *et al.*, 2004; MILNE *et al.*, 2006; GONZÁLEZ – WARLETA *et al.*, 2011; CAMILLO, 2011; BYREM *et al.*, 2012).

Vários estudos utilizaram o ELISA para detecção de anticorpos anti-*N. caninum* no leite (CHANLUN *et al.*, 2002; SHARES *et al.* 2004; HURKOVA *et al.*, 2005; CHANLUN *et al.*, 2006; MILNE *et al.*, 2006), e existem poucos estudos com a utilização da RIFI para pesquisa de anticorpos no leite bovino. Alguns fatores podem interferir na detecção de anticorpos no leite, tais como fase da lactação, produção leiteira diária e mastite (DAVISON *et al.*, 2001; SHERER *et al.*, 2002; MILNE *et al.*, 2006; CAMILLO *et al.*, 2011; BYREM *et al.*, 2012.).

A mastite é a principal doença nos bovinos leiteiros (BARKEMA *et al.*, 2009; RINALDI *et al.*, 2010). Dentre as formas de mastite, a mastite clínica é facilmente diagnosticada por alterações no leite e no úbere, enquanto que a subclínica necessita de ferramentas diagnósticas para detecção do aumento da contagem de células somáticas (CCS) (LADEIRA *et al.*, 1998, ANDERSON *et al.*, 2004) e a interferência dessa enfermidade deve ser avaliada sobre o diagnóstico da neosporose no leite. Existem poucas informações sobre a RIFI e os fatores que interferem na detecção de anticorpos no leite (CHANLUN *et al.*, 2006; CAMILLO *et al.*, 2011) em amostras individuais e coletivas de leite. Milne *et al.* (2011) utilizaram amostras de leite de um teto para a pesquisa de anticorpos, porém não há estudos sobre o tipo de amostra de leite que interfere na pesquisa de anticorpo.

Poucos estudos analisaram o efeito da produção leiteira na detecção de anticorpos anti-*N. caninum* e os resultados foram contraditórios (TIWARI *et al.*, 2007)

Os objetivos do estudo foram avaliar se há interferência da mastite subclínica e da produção leiteira na detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras individuais de leite; analisar se o tipo de amostras interfere na pesquisa de anticorpo no leite de amostras individuais.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. ANIMAIS

No presente estudo foram avaliadas 12 vacas em lactação, soropositivas para *Neospora caninum*, monitoradas quinzenalmente, de Outubro de 2012 a Março de 2013. As vacas são procedentes de um rebanho leiteiro com histórico de abortamentos e localizado na região metropolitana de Curitiba/PR (Quatro Barras: 25° 22' 2" Sul, 49° 4' 30" Oeste). O rebanho têm 52 vacas e é submetido à imunização semestral de brucelose e febre aftosa e ao controle de tuberculose periodicamente.

### 2.2. AMOSTRAS

Foram realizadas 11 coletas quinzenais de leite (*pool*), totalizando 132 amostras, durante seis meses, a fim de monitorar anticorpos anti-*N. caninum* pela RIFI. As amostras de leite foram coletadas dos quatro tetos obtendo-se o *pool* de leite por vaca. Realizou-se desinfecção prévia dos tetos com álcool 70% e as coletas foram em tubos estéreis. As amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm durante dez minutos para a extração da camada de gordura.

Durante o mesmo período, em dois momentos, foram obtidas amostras de leite de cada teto das 12 vacas, totalizando 96 amostras individuais de leite

e a realização do CMT e da RIFI nas amostras de leite de cada teto. As amostras foram armazenadas a -20 °C até a análise.

Os dados de produção leiteira diária foram coletados quinzenalmente de cada vaca soropositiva e foram divididas em categorias de produção leiteira: < 10 litros; com a produção leiteira diária entre 10-15 litros e produção leiteira diária entre 15-25 litros.

### 2.3. CALIFORNIA MASTITIS TEST – CMT

Nas amostras de leite de todos os tetos das vacas soropositivas (a cada quinze dias), foi realizado o CMT (*Califórnia Mastitis Test*). As amostras foram coletadas após a higienização com álcool 70% em cada teto, desprezando os três primeiros jatos. O CMT foi realizado em uma raquete contendo quatro cavidades e o reagente do CMT.

O leite foi misturado com o reagente, homogeneizado e feita a leitura após 10 segundos. De acordo com a quantidade de células somáticas do leite, forma-se um gel, de espessura variada. Os resultados foram obtidos em escores, que variam de traços (leve formação de gel) a + (fracamente positivo), ++ (reação positiva) e +++ (reação fortemente positiva).

### 2.4. REAÇÃO DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

A pesquisa de anticorpos (IgG) anti *N. caninum* no leite foi realizada pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI). As lâminas foram sensibilizadas previamente com taquizoítas de *N. caninum* (cepa NC-1), segundo Locatelli-Dittrich *et al*, 2006 O leite foi utilizado puro seguindo a técnica padronizada da imunofluorescência indireta (DUBEY, 2003). O conjugado anti-IgG bovino (SIGMA®) foi diluído a 1:100 em PBS pH 7,2. A leitura das lâminas foi

realizada em microscópio equipado com fonte de luz ultravioleta. Os soros-controle negativo e positivo foram utilizados em cada lâmina analisada. A presença de fluorescência em todo o taquizoíta foi considerada como resultado positivo. A fluorescência apenas na porção do taquizoíta foram consideradas negativas (fluorescência apical).

## 2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da RIFI das amostras de leite (*pool*) foram comparados com os resultados do CMT. Os resultados do CMT das amostras de leite de cada teto foram comparados com o CMT de cada teto.

Os dados foram submetidos às análises descritivas e calculados os percentuais de positividade.

## 3. RESULTADOS

As amostras (*pool*) positivas na detecção de anticorpos anti-*N.caninum* no leite e positivas no CMT totalizaram 42,4% (56/132), e os resultados de amostras positivas no leite e negativas no CMT foi de 52,3% (69/132).

Das amostras individuais de leite obtidas de cada teto 64,6% (62/96) foram positivas na detecção de anticorpos anti-*N. caninum* e negativas no CMT; 18,7% (18/96) das amostras de leite foram positivas na RIFI e no CMT; 15,6% (15/96) foram negativas tanto na detecção de anticorpos quanto no CMT e 1,04% (1/96) foram positivas no CMT e não houve detecção de anticorpos no leite.

Comparando os resultados da RIFI das amostras de leite de cada teto com os resultados das RIFI de *pool* de leite, 12,5% (12/96) das amostras de leite de cada teto foram negativas na detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* sendo que o *pool* foi positivo para o parasita. Nas tabelas 1 e 2 estão

apresentados os resultados referentes à pesquisa de anticorpo em amostras de leite de cada teto comparando com o resultado do *pool* pela RIFI.

Os anticorpos anti-*Neospora caninum* foram detectados no leite das 12 vacas em todas as categorias de produção leiteira: 16,6% (2/12) com produção leiteira diária < 10 litros; 41,6% (5/12) com a produção leiteira diária entre 10-15 litros e em 33,3% (4/12) a produção leiteira diária entre 15-25 litros.

TABELA 1 – RESULTADOS DA RIFI PARA *Neospora caninum* NO LEITE DE CADA TETO E NO *POOL*, NA PRIMEIRA COLETA

VACA	TETOS				<i>POOL</i>
	AD	AE	PD	PE	
1	+	+	+	+	+
2	-	-	+	+	+
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
6	-	-	+	-	+
7	+	+	-	-	+
8	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+
10	+	-	-	+	+
11	+	-	+	+	+
12	-	+	+	+	+

-: NEGATIVO +: POSITIVO

RIFI: REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

AD: ANTERIOR DIREITO

AE: ANTERIOR ESQUERDO

PD: POSTERIOR DIREITO

PE: POSTERIOR ESQUERDO

TABELA 2 - RESULTADOS DA RIFI PARA *Neospora caninum* NO LEITE DE CADA TETO E NO POOL, NA SEGUNDA COLETA

VACA	TETOS				POOL
	AD	AE	PD	PE	
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
6	-	+	-	+	+
7	-	-	+	+	+
8	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+
10	+	-	+	+	+
11	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+

-: NEGATIVO +: POSITIVO

RIFI: REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

AD: ANTERIOR DIREITO

AE: ANTERIOR ESQUERDO

PD: POSTERIOR DIREITO

PE: POSTERIOR ESQUERDO

#### 4. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a mastite não interferiu na detecção de anticorpos em 42,4% das amostras de leite (*pool*) e comparando os resultados das amostras de leite de cada teto, 18,7% foram passíveis de detecção de anticorpos e positivas no CMT.

González - Warleta *et al* (2011) tiveram resultados de amostras de soro negativo e positivo no leite, e relatam que a mastite subclínica, ocasionalmente, causou reações falso-positivas em amostras de leite para a detecção de anticorpos contra outros agentes patogênicos (KLINNTEVALL *et al.*, 1991; SÀNCHEZ *et al.*, 2004; CHARLIER *et al.*, 2006).

No presente estudo, a mastite não interferiu na pesquisa de anticorpos, mesmo em amostras em que o resultado do gel do CMT resultou na formação fortemente positiva (+++). Em amostras que não foram passíveis de detecção de anticorpos no leite, provavelmente ocorreu devido à baixa concentração de anticorpos (CHRISTENSEN e GARDNER, 2000). E correlações positivas entre anticorpo no soro sanguíneo e no leite são explicadas porque os níveis de anticorpos séricos influenciam nos níveis de anticorpos no leite (SHERER *et al*, 2002; DIAS e SAMARA *et al*, 2003; TIZARD *et al*, 2008).

Sabe-se que outros fatores afetam a sensibilidade e especificidade da RIFI, tais como a fase de lactação, a amostragem e a produção de leite (STENLUND *et al.*, 1999; CAMILLO *et al*, 2011). Porém não há estudos sobre os fatores que interferem na detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* no leite utilizando a técnica da RIFI.

Miles *et al* (2006) notaram que a variação de sólidos totais de leite e concentração de IgG durante a lactação pode ser um fator adicional que pode resultar em menor sensibilidade e especificidade, fatores que Schares *et al* (2004) também consideraram. Porém, Byrem *et al* (2012) observaram que os anticorpos podem ser detectados em todas as fases de lactação. Embora estudos anteriores tenham mostrado um aumento do nível de anticorpos no soro na medida em que a gestação avança (STENLUND *et al.*, 1999; GUY *et al.*, 2001), há pouca (SCHARES *et al.*, 2004; CHANLUN *et al.*, 2006) ou nenhuma associação (GONZÁLEZ – WARLETA *et al.*, 2011) entre dias de lactação e o desempenho do teste ELISA no leite para *N. caninum*.

No presente estudo, observou-se que a quantidade de produção leiteira diária não interferiu na detecção de anticorpos, provavelmente devido à alta concentração de anticorpos anti-*Neospora caninum* no leite e que a variação de quantidade de leite não foi significativa para interferir na pesquisa de anticorpos.

Os poucos estudos que analisaram o efeito da produção de leite na presença de infecção por *N. caninum* apresentaram resultados contraditórios. Em aqueles realizados em rebanhos leiteiros individuais, a produção de leite em vacas soropositivas para *N. caninum* foi de aproximadamente 1,3 dia kg / vaca menor do que em vacas soronegativas (THURMOND e HIETALA *et al.*, 1997; HERNÁNDEZ *et al.*, 2001). No entanto, em estudos com grande número

de rebanhos selecionados de forma aleatória, não associaram status sorológico com produção leiteira (HOBSON *et al.*, 2002; ROMERO *et al.*, 2005) ou só foram detectados em *N. caninum* novilhas soropositivas de primeira lactação (TIWARI *et al.*, 2007).

Não há estudos comparando detecção de anticorpos em amostras individuais de leite de cada teto com amostras individuais de *pool* de leite de cada vaca para padronizar a coleta de amostra. Milne *et al* (2006), coletaram amostras de leite de um teto somente, e obtiveram boa concordância, porém no presente estudo os resultados mostram que a melhor coleta é a do *pool*. Byrem *et al* (2012), compararam a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em amostras de leite cru total e leite desnatado e observaram que em amostras desnatadas existe vantagem em concentrar IgG em amostras, além de reduzir o teor de gordura e potenciais interações entre a gordura do leite e quantificação das imunoglobulinas. Verificou-se que em 12,5% (12/96) das amostras de leite de cada teto não foram passíveis de detecção de anticorpos, porém o *pool* foi positivo, demonstrando a necessidade da coleta do *pool*, provavelmente devido á oscilação da concentração de anticorpos em cada quarto de teto.

Não há estudos com produção leiteira e detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* pela RIFI, porém foram passíveis de detecção em ambas as categorias de produção leiteira, necessitando de mais estudos sobre esse fator de interferência.

## 5. CONCLUSÕES

A coleta de *pool* de leite deve ser realizada para o diagnóstico de *Neospora caninum* para análise; a presença da mastite subclínica e a quantidade de produção leiteira diária não interferem na detecção de anticorpos anti-*N. caninum* no leite utilizando a RIFI e o tipo de amostra interfere no diagnóstico para *Neospora caninum*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BYREM, T.M; BARTLETT, P.C; DONOHUE, H; VOISINET, B.D; HOUSEMAN, J.T. Performance of a commercial serum ELISA for the detection of antibodies to *Neospora caninum* in whole and skim milk samples. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p.249-253, 2012.

CAMILLO, G., ANTONELLO, M.A e colaboradores. Reação de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras coletivas de leite. **Ciência Rural.**, v.41, n.9, p.1600-1604, 2011.

CHANLUN, A., NASLUND, K., AIUMLAMAI, S., BJORKMAN, C. Use of bulk milk for detection of *Neospora caninum* infection in dairy herds in Thailand. **Veterinary Parasitology.**, v.110, p.35-44, 2002.

CHANLUN, A.; EMANUELSON, U; AIUMLAMAI, S; BJORKMAN, C. Variations of *Neospora caninum* antibody levels in milk during lactation in dairy cows. **Veterinary Parasitology**, v. 141, p. 349-355, 2006.

CHARLIER, J; DUCHATEAU, L; VANGROENWEGHE, F; CLAEREBOUT, E; BURVENICH, C; VERCRUYSSSE, J. The effect of an experimentally induced acute mastitis on the results of an *Ostertagia ostertagi* milk ELISA. **Veterinary Parasitology**, v.135, p.161-165, 2006.

CHRISTENSEN, J.; GARDNER, I.A. Herd-level interpretation of test results for epidemiologic studies of animal diseases. **Preventive Veterinary Medicine**, v.45, p.83-106, 2000.

DAVISON, H. C; GUY, J. W; MCGARRY, F; GUY, F; WILLIAMS, D. J. L; KELLY, D. F; TREES, A. J; Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. **Research Veterinary Science**, v. 70, p. 163-168. 2001.

DIAS, F.C; SAMARA, S.I. Detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina no soro sanguíneo, no leite individual e no leite de conjunto em tanque de expansão de rebanhos não vacinados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.**, v.40, p.161-168, 2003.

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

GONZÁLEZ-WARLETA, M; CASTR-HERMIDA, J.A; CARRO-CORRAL, C; MEZO, M. Anti-*Neospora caninum* antibodies in milk in relation to production losses in dairy cattle. **Preventive Veterinay Medice**, v.101, p.58-64, 2011.

LOCATELLI-DITTRICH, R; DITTRICH, J.R; TICHARTZ, R.R.T.B; GASINO-JOINEAU, M.E; ANTUNES, J; PINCKNEY, R.D; DECONTO, I; HOFFMANN, D.C.S; THOMAZ-SOCCOL, V. Investigation of *Neospora sp.* and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Parana State, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.135, p.215-221, 2006.

MILNE, E; CRAWSHAW, M; BROCKLEHURSTS, S; WRIGHT, S; MALEY, S; INNES, E. Associations between *Neospora caninum* specific antibodies in serum and milk in two dairy herds in Scotland. **Preventive Veterinary Medicine**, v.77, p.31-47, 2006.

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

SCHARES, G; BARWALD, A; STAUBACH, C; WURM, R; RAUSER, M; CONRATHS, F.J; SCHOEDER, C. Adaptation of a comercial ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. **Veterinary Parasitology**, v.120, p.55-63, 2004.

STENLUND,S; KINDAHL, H; MAGNUSSON, U. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecives pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 85, p.227-234, 1999.

TABATABAEIZADEH, E; TABAR, G.H; FARZANEH, N. Prevalence of *Leptospira hardjo* antibody in bulk tank milk in some dairy herds in Mashhad Suburb. **African Journal Microbiology**, v.33, 2011.

THURMOND, M; HIETALA, S. Strategies to control Neospora infection in cattle. **Bovine Practice**, v.29, p.60-63, 1997.

TIWARI, A; VANLEEUEWENN, J.A; DOHOO, I.R; KEEFE, G.P, HADDAD; J.P; TREMBLAY, R. Production effects of pathogens causing bovine leucosis, bovine viral diarrhoea, paratuberculosis and neosporosis. **Journal Dairy Science**, v. 90, p.659-669, 2007.

TREES, A. J.; DAVIDSON, H. C.; INNES, E. A.; WADTLING, J. M. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International Journal Parasitology**, v. 29, p. 1195-1200. 1999.

UGGLA, A; STENLUND, O. J. M; HOLMDAHL, E. B; JAKUBEK, P; THEBO, H. KINDAHL; BJORKAN, C. Oral *Neospora Caninum* inoculation of neonatal calves. **Interest Journal Parasitology**, v.28, p. 1467-1472. 1998.

### CAPÍTULO III

## DETECÇÃO DE *NEOSPORA CANINUM* E *TOXOPLASMA GONDII* NO LEITE DE VACAS

### RESUMO

*Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* são parasitas intracelulares obrigatórios com distribuição mundial. A neosporose desponta como uma das principais causas de aborto e problemas reprodutivos em bovinos, causando perdas econômicas. A toxoplasmose é uma zoonose que pode provocar graves danos ao feto, em humanos. Os protozoários são transmitidos via horizontal e vertical, e foram evidenciados em diferentes amostras biológicas, bem como em amostras de leite *in natura*. Os parasitas foram detectados em amostras de leite de diversas espécies animais, sugerindo a possível veiculação dos taquizoítas, levantando a possibilidade de transmissão lactogênica dessas doenças. Os objetivos deste trabalho foram detectar os protozoários *N. caninum* e *T. gondii* em amostras de leite de vacas, em cultivo celular (isolamento) e por PCR. Foram realizadas três coletas de leite de 12 vacas, a cada dois meses, totalizando 36 amostras. As amostras de leite foram inoculadas em garrafas de cultivo celular, para isolamento *in vitro*. A reação em cadeia de polimerase (PCR) foi realizada nas amostras de leite cru e nos isolados obtidos nos cultivos. Na sorologia, dez vacas foram soropositivas para *N. caninum* e duas soropositivas para *T. gondii*. Nas garrafas de cultivo, foram observados protozoários e efeito citopático em 36,1% amostras. Nas amostras de leite cru e nos isolados obtidos nos cultivos, das vacas soropositivas para *N. caninum*, o resultado foi negativo na PCR. Uma amostra de leite cru, obtida de vaca soropositiva para *T. gondii*, foi positiva para o parasita na PCR e foi isolado o protozoário em cultivo celular. Na PCR o isolado foi positivo para *T. gondii*.

Palavras-chave: Leite, bovinos, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, PCR

## ABSTRACT

*Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* are obligate intracellular parasites that are distributed worldwide. Neosporosis emerges as a major cause of miscarriage and reproductive problems in cattle, causing economic losses. Toxoplasmosis is a zoonosis that can cause serious damage to the fetus in both men and cattle. The protozoa are transmitted horizontally and vertically, and were evidenced in different biological samples, as well as in samples of fresh milk. The parasites were detected in samples of milk of several animal species, suggesting the possible transmission of the tachyzoites, raising the possibility of lactogenic transmission of these diseases. The objectives of this work were to detect *N. caninum* and *T. gondii* protozoa in cow milk samples, in cell culture (isolation) and by PCR. Three milk samples were collected from 12 cows every two months, totaling 36 samples. The milk samples were inoculated in cell culture bottles for in vitro isolation. Polymerase chain reaction (PCR) was performed on raw milk samples and isolates from cultures. In serology, ten cows were seropositive for *N. caninum* and two seropositive for *T. gondii*. In the culture bottles, protozoa and cytopathic effect were observed in 36.1% samples. In the samples of raw milk and isolates obtained from the cultures of the seropositive cows for *N. caninum*, the result was negative in the PCR. A sample of raw milk obtained from cows seropositive to *T. gondii* was positive for the parasite in PCR and the protozoan was isolated in cell culture. In PCR the isolate was positive for *T. gondii*.

Key words: Milk, bovine, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, PCR

## 1. INTRODUÇÃO

*Neospora caninum* é um parasita intracelular obrigatório que despontou como a principal causa de abortos em bovinos leiteiros, em vários países (DUBEY, *et al* 2011). A infecção provoca perdas econômicas importantes em bovinos devido à falha reprodutiva associadas com o aborto e mortalidade em bezerros congenitamente infectados (DUBEY., *et al* 2007).

Devido à localização específica do *N. caninum* no cérebro, medula espinhal e músculos, é difícil a detecção do parasita pelos métodos diretos (DUBEY e LINDSAY, 1999; PETERS *et al.*, 2001), sendo também utilizados os testes sorológicos (MALEY *et al.*, 2001). A neosporose é diagnosticada em amostras de tecidos pela detecção dos parasitas, do antígeno e do DNA, utilizando métodos como a histopatologia, imunohistoquímica e pela reação em cadeia de polimerase (PCR) (PETER *et al.*, 2001; HURKOVÁ-HOFMANNOVÁ *et al*, 2006).

As técnicas moleculares, como a PCR, são utilizadas no diagnóstico da neosporose. Usando este método, a presença do DNA do *N. caninum* foi confirmada em diferentes tecidos, como o cérebro, medula espinhal e músculo (GUY *et al.*, 2001; SAGER *et al.*, 2003). Em animais vivos, a presença de anticorpos específicos e de DNA no soro, leite e sêmen indica a possibilidade de infecção pelo parasita (CHANLUN *et al.*, 2002; MOSKWA *et al.*, 2003; ORTEGA-MORA *et al.*, 2003; SHARES *et al.*, 2004, 2005; VARCASIA *et al.*, 2006; SERRANO-MARTINEZ *et al.*, 2007).

A transmissão vertical do *N. caninum* ocorre de mãe para filho no útero (TREES *et al*, 1999) e a transmissão horizontal através da ingestão de oocistos, taquizoítas e cistos teciduais (DUBEY, 2003), porém estudos têm sido feitos sobre a transmissão vertical durante o aleitamento. Ugglá (1998) e Davison *et al* (2001) observaram que bezerros podem ser infectados com *N. caninum* por via oral com taquizoítas inoculados experimentalmente no colostro ou no leite, até uma semana após o nascimento.

A transmissão lactogênica do *Neospora caninum* pode ocorrer, pois o DNA do parasita foi detectado em leite de vacas em lactação na presença de um nível elevado de IgG (MOSKWA *et al.*, 2003) e em colostro de vacas soropositivas (MOSKWA *et al.*, 2007). Porém não há relatos de isolamento do

protozoário no leite e nenhum estudo conseguiu confirmar sua viabilidade no leite.

No isolamento de *Neospora caninum* os tecidos infectados são inoculados em cultivo celular (isolamento *in vitro*) ou em camundongos e gerbis (isolamento *in vivo*). O tempo de isolamento *in vitro* do parasita é de até 60 dias. O método de isolamento é demorado e difícil para ser utilizado na rotina, entretanto, é importante e necessário para o estudo e caracterização do parasita (SAWADA *et al.*, 2000).

Outro fator importante é se *N. caninum* pode infectar pessoas e se esse risco aumenta no consumo de leite cru (DAVISON *et al.*, 2001). Estudos demonstraram que a infecção por *N. caninum* não ocorre em humanos (PETERSEN *et al.*, 1999). Anticorpos anti-*N. caninum* foram detectados em pacientes com HIV (38%), pacientes com desordens neurológicas (18%) e recém-nascidos (5%) (LABATO *et al.*, 2006).

Os estudos realizados por Moskwa *et al.* (2003) e (2007) revelaram a presença de DNA de *N. caninum* em leite e colostro de bovinos, porém, não verificaram a viabilidade do parasita nessas amostras.

O *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório e possui uma ampla distribuição mundial. Por acometer animais e o ser humano, tem grande importância na saúde pública, por se tratar de uma zoonose, e na medicina veterinária, pois acarreta perdas econômicas nos rebanhos (OSSANI, 2014). O parasito pode ser transmitido pela via horizontal (ingestão de alimentos contaminados com oocistos ou tecidos com cistos) e vertical (infecção congênita ou placentária). A toxoplasmose congênita constitui-se numa das formas de transmissão mais importante tanto em humanos quanto em animais domésticos, e que se manifesta com maior frequência durante os dois primeiros trimestres da gestação. Em ovinos, caprinos, suínos e bovinos, a transmissão congênita de *T. gondii* pode ocasionar grandes prejuízos econômicos, decorrentes principalmente de abortos, natimortos e descendentes debilitados (VITOR e PINTO, 1991; FILHO *et al.*, 2001).

O agente pode ser transmitido pelo consumo de carne crua ou mal cozida e de leite “*in natura*”, procedentes de animais contaminados (DUBEY, 1980; SACKS *et al.*, 1982; CHIARI e NEVES, 1984; SKINNER *et al.*, 1990;

VITOR *et al.*, 1991; LUFT e REMINGTON, 1992; DUBEY, 1996; FIGUEIREDO *et al.*, 2001).

A maioria dos casos de toxoplasmose humana é atribuída ao consumo de carnes cruas ou água e alimentos infectados por oocistos dos hospedeiros definitivos, os felídeos. Trabalhos relatam a presença de *T. gondii* no sêmen de algumas espécies como os ovinos (SPENCE *et al.*, 1978, BLEWETT *et al.*, 1982, TEALE *et al.*, 1982, LOPES *et al.*, 2009, MORAES *et al.*, 2010), caprinos (DUBEY e SHARMA, 1980), humanos (DALIMI e ABDOLI, 2013), suínos (MOURA *et al.*, 2007), bovinos (SCARPELLI *et al.*, 2009) e cães (ARANTES *et al.*, 2009) originando discussões de possível transmissão venérea do parasita. Também é relatada a transmissão de taquizoítas pela ingestão de leite logo após o nascimento (DUBEY, 1993). Há referências na literatura de infecção humana através de leite materno (BONAMETTI *et al.*, 1997), enfatizando que o consumo de leite contaminado pode causar sérios distúrbios clínicos em crianças imunossuprimidas e gestantes (SKINNER *et al.* 1990).

A presença de taquizoítos de *T. gondii* foi relatada no leite de ovelhas (CAMOSSO, 2010; OSSANI, 2014), cabras (CHIARI, NEVES, 1984., VITOR *et al.*, 1991), vacas e camundongos (RAGOZO *et al.*, 2009; REMINGTON *et al.*, 2001), sendo investigada possível transmissão lactogênica da doença. Apesar do leite cru não ser a principal via de transmissão da toxoplasmose, ele pode veicular o parasito durante a fase aguda da doença, portanto deve ser ingerido somente após a pasteurização ou fervura (SUARÉZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2005).

Os objetivos deste trabalho foram investigar a presença de *N. caninum* e *T.gondii* (DNA e do parasita), por PCR e isolamento em cultivo celular, em amostras de leite cru de vacas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. ÁREA GEOGRÁFICA E ANIMAIS

Foram utilizadas 12 vacas em lactação, procedentes de um rebanho leiteiro submetido à imunização semestral de brucelose e febre aftosa e ao

controle de tuberculose periodicamente. O rebanho tem histórico de abortamentos e localizado na região metropolitana de Curitiba/PR (Quatro Barras: 25° 22' 2" Sul, 49° 4' 30" Oeste).

## 2.2. AMOSTRAS

Foram realizadas 11 coletas quinzenais e simultâneas de sangue e leite das 12 vacas (identificadas de 1 a 12), totalizando 132 amostras de sangue e 132 amostras de leite, durante seis meses para monitoramento de anticorpos anti- *N.caninum* e anti-*T.gondii*. Durante o monitoramento, foram realizadas três coletas de amostras de leite das 12 vacas com intervalos de 2 meses, totalizando 36 amostras para posterior inoculação no cultivo *in vitro* e isolamento e diagnóstico molecular das amostras de leite cru. Amostras de sangue foram coletadas por punção da veia coccígea e acondicionadas em tubos vacutainer sem anticoagulante. As amostras foram centrifugadas durante cinco minutos, a 5000 rpm para a obtenção do soro. As amostras de leite foram coletadas dos quatro tetos obtendo-se o *pool* de leite por vaca. Realizou-se a desinfecção prévia dos tetos com álcool 70% e o leite foi acondicionado em tubos estéreis. Os tubos foram centrifugados a 3.500 rpm por 10 minutos para a extração da camada de gordura com pipetas estéreis. As amostras de soro e de leite desnatado foram armazenadas a -20 °C até a análise sorológica.

As amostras de leite foram coletadas em tubos estéreis dos quatro tetos, obtendo-se o *pool* de leite por vaca com a desinfecção prévia dos tetos com álcool 70%. As amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm durante dez minutos e divididas em duas alíquotas: sedimento do leite para a realização da PCR, na qual as amostras foram congeladas a -20°C até a análise. Nas outras alíquotas foram adicionados 0,5 mL de penicilina G (100 U/mL) e 0,5 mL de anfotericina B (1,25µg/mL) e mantidas em refrigeração para a inoculação em cultivo celular no período máximo de 12 horas.

## 2.3 SOROLOGIA

O diagnóstico sorológico foi realizado nas amostras de soro e leite das 12 vacas, totalizando 264 amostras, pela técnica de Imunofluorescência

Indireta (RIFI) (Anexo 1), para avaliar a presença de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii*. Amostras de soropositivas foram diluídas em solução salina tamponada (PBS pH 7,2) e as amostras positivas foram submetidas à titulação (1:50 a 1:400).

O leite foi utilizado puro seguindo a técnica padronizada da imunofluorescência indireta (Dubey, 2003). O conjugado anti-IgG bovino (SIGMA®) foi diluído a 1:100 em PBS pH 7,2.

Os soros e as amostras do *pool* do leite cru das vacas foram avaliados em lâminas de RIFI contendo taquizoítas da cepa NC-1 de *N. caninum* e a cepa RH de *T. gondii*, produzidos *in vitro* no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio equipado com fonte de luz ultravioleta. Os soros-controle negativo e positivo foram utilizados em cada lâmina analisada. A presença de fluorescência em todo o taquizoíta foi considerada como resultado positivo. A fluorescência na porção apical do taquizoíta foi considerada negativa.

## 2.4. ISOLAMENTO *IN VITRO*

Este item foi subdividido e está descrito nos tópicos 2.4.1 a 2.4.2.

### 2.4.1. CULTIVO DE CÉLULAS VERO

O cultivo celular foi realizado com uma linhagem de células estabelecidas, denominadas célula Vero, de rim de macaco africano e com a identificação CCL-81, no catálogo da “American Type Culture Collection” (ATCC). As células Vero apresentaram características similares às células epiteliais, como a forma poligonal e o modo de crescimento do tipo aderente formando uma camada contínua no frasco de cultivo, a monocamada ou tapete celular.

As células Vero foram cultivadas em meio de crescimento Eagle (Meio Essencial Mínimo de Eagle – MEM) (Anexo 2) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina G potássica, 100µg/mL de sulfato de estreptomicina e 1,25µg/mL de anfotericina B. O meio Eagle foi utilizado com

pH de 7,4 (cor vermelha) para o cultivo celular, sendo ajustado com bicarbonato de sódio a 7,5%. Após o preparo, uma amostra do meio Eagle era inoculado no meio de enriquecimento para crescimento bacteriano, o caldo de cérebro-coração, ("Brain Heart Infusion) – BHI por 72 horas à 37° C para detectar eventual contaminação bacteriana.

Os frascos de cultivo celular eram observados no microscópio invertido para avaliação do crescimento celular, como a adesão das células e formação da monocamada, e para avaliações das etapas do cultivo e do subcultivo.

Após o estabelecimento da monocamada realizou-se o subcultivo ou passagem, com a transferência de células de um frasco de cultivo para outros. A tripsina foi utilizada para remover as células aderentes dos frascos e as passagens foram identificadas com números sequenciais relativos ao número de vezes que o cultivo foi transferido para outro frasco.

O meio Eagle era removido dos frascos e em seguida realizou-se a lavagem da monocamada com PBS (pH 7,2). Adicionava-se uma solução de tripsina a 0,25% na quantidade suficiente para cobrir a monocamada. Os frascos eram observados no microscópio invertido para um controle da ação da tripsina no tapete celular e visualização da separação das células. Após a individualização do tapete celular, removia-se a tripsina observando as células redondas em suspensão. Nesta suspensão era acrescentado meio Eagle e as células eram aspiradas suavemente e inoculadas em novos frascos, na proporção de 1:3. Na manutenção dos cultivos o meio Eagle foi substituído duas vezes por semana.

Os frascos de cultivo com monocamadas de células Vero de 24 horas foram utilizados para inocular as amostras de leite. As células Vero utilizadas para o isolamento e manutenção dos parasitos apresentavam números de passagens variáveis entre 190 e 210, de acordo com a disponibilidade do banco de células.

#### 2.4.2. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE LEITE PARA ISOLAMENTO

Foram processadas 36 amostras de leite de vacas com o objetivo de isolar o *N. caninum* e *T. gondii* em cultivo celular, considerando o desenvolvimento intracelular do parasita.

Após a inoculação de aproximadamente 1,0 mL de leite em frascos de Roux de 40mL contendo uma monocamada estabelecida de célula Vero e 5,0 mL de meio Eagle, os frascos de cultivo foram incubados em estufa de CO<sub>2</sub>, na temperatura de 37° C e após três horas da inoculação a suspensão foi removida dos frascos e o meio foi trocado. Para cada amostra foram mantidas três garrafas de Vero inoculadas. O meio Eagle foi substituído duas vezes por semana. Os frascos foram examinados diariamente em microscópio invertido, para monitorar o isolamento. Na leitura dos frascos a monocamada de células era observada quanto a sua integridade, a presença de efeitos citopáticos e o aparecimento dos parasitos dentro das células ou livres no meio de cultivo. Durante cada isolamento foi mantido um frasco de Roux de 40 ml contendo célula Vero como controle negativo.

O cultivo celular foi mantido em período variável de isolamento (Anexo 3), com mínimo de sessenta dias. Após o aparecimento dos parasitos, o cultivo foi mantido por sessenta dias para multiplicação e produção de sedimento parasitário.

As etapas referentes ao processamento das amostras para isolamento dos parasitos, o cultivo celular e a inoculação e manipulação dos frascos de cultivo foram realizadas de maneira asséptica em fluxo laminar linear vertical.

#### 2.5 CRIOPRESERVAÇÃO DOS PROTOZOÁRIOS

Os isolados, a cepa de referência de *N. caninum* (NC-1) e de *T. gondii* (RH) foram congeladas para conservação e manutenção nos botijões de nitrogênio líquido. As monocamadas com grupos de protozoários nas células foram removidas dos frascos de cultivo com o auxílio de uma haste de borracha. A suspensão obtida de cada frasco foi centrifugada (centrífuga Sigma® modelo

3K30) a 380 g por 10 minutos a 6°C. No sedimento contendo os protozoários foi acrescentado 2 ml de meio de congelamento, lentamente. O meio de congelamento foi preparado com 50% de meio Eagle, 40% de soro fetal bovino e 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) como crioprotetor.

## 2.6. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *NEOSPORA CANINUM* E *TOXOPLASMA GONDII*

A técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR) foi realizada nas amostras de leite de 12 vacas, incluindo três coletas, totalizando 36 amostras.

A caracterização molecular foi realizada utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR), técnica da biologia molecular desenvolvida por Mullis (1987) (Anexo 4). Os cultivos dos parasitos isolados, da cepa NC-1 de *N. caninum* e da cepa RH de *T. gondii* foram realizados *in vitro* em células Vero para obtenção do sedimento parasitário ((Anexo 5), extração de DNA e realização da PCR. O controle negativo da PCR foi DNA das células Vero cultivadas no laboratório e processadas para extração de DNA. A água Milli Q foi incluída como controle durante a realização da PCR para verificar possíveis contaminações por aerossóis. A caracterização dos protozoários compreendeu o preparo dos sedimentos de parasitos, extração do DNA, técnica da PCR com eletroforese 36 dos produtos amplificados e visualização das bandas no transiluminador com fotografias dos géis de agarose. As etapas da PCR foram realizadas em ambientes separados: área de extração do DNA, área de pré-PCR, área de PCR e análise por eletroforese. Na área de pré-PCR foram preparados e adicionados os componentes da solução de amplificação da PCR. A mistura dos componentes foi transportada em gelo para outra sala onde foi adicionado o DNA. Além da separação física entre as etapas da PCR foram adotadas outras medidas para evitar a contaminação dos reagentes e das amostras a serem analisadas.

### 2.6.1. EXTRAÇÃO DE DNA

Os sedimentos das amostras de leite e do isolado foram armazenados em microtubos a -20°C para extração do DNA e realização da PCR.

A extração de DNA dos sedimentos das amostras de leite íntegro foi realizada com o Kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®) conforme (Anexo 6). Depois da extração, o DNA obtido foi mantido a -20°C. A quantificação de DNA foi realizada no aparelho NanoDrop 1000 (Thermo Scientific®) do Departamento de Bioquímica da UFPR. As concentrações de DNA foram determinadas nas absorvâncias de 260 nm e 280 nm.

### 2.6.2. REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA – PCR

A reação da polimerase em cadeia (PCR) foi utilizada para a amplificação das sequências de DNA genômico dos isolados com primers específicos para *N. caninum* e *T. gondii*, que foram desenvolvidos respectivamente por Yamage M. *et al.* (1996) e Homan W.L. *et al.* (2000), respectivamente (Tabela 1). Na realização da PCR as amostras de DNA de cada isolado foram adicionadas em uma solução de amplificação, contendo os reagentes e os primers, em seguida sendo incubadas no termociclador “Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler®” para ocorrer a síntese da sequência específica de DNA. Os produtos de amplificação foram detectados por eletroforese em gel de agarose.

TABELA 1 – ESPECIFICAÇÕES DOS PRIMERS UTILIZADOS NA REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA PARA IDENTIFICAÇÃO DE *N.caninum* e *T. gondii*.

<b>Primer</b>	<b>Sequência (5' - 3')</b>	<b>Sentido</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>Posição*</b>
<b>Np6</b>	CAGTCAACCTACGTCTTCT	Antisenso	328	758-776
<b>Np21</b>	GTGCGTCCAATCCTGTAAC	Senso		449-467
<b>TOX4</b>	CGCTGCAGGGAGG AAGACGAAAGTTG	Senso		Repetido de 200 a 300 vezes
<b>TOX5</b>	CGCTGCAGACACA GTGCATCTGGATT	Antisenso	529	

C – citosina; T – timina; A – adenina; G – guanina. \*Posição do primer na sequência do DNA. Fonte: Np6/Np21 de YAMAGE et al. (1996) e TOX4/TOX5 de HOMAN et al. (2000).

### 2.6.3. SOLUÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DA PCR

As amostras de leite íntegro (sedimento), o DNA dos sedimentos parasitários, o DNA das células Vero, DNA da cepa de *N. caninum* de referência (NC-1) e DNA da cepa RH de *T. gondii* foram submetidos à amplificação utilizando-se duas combinações de primers: Np6 e Np21, TOX4 e TOX5. O alvo da PCR 62 foram as sequências Nc5 do genoma do *N. caninum* e a região não-codificante de 529 pb repetida de 200 a 300 vezes no genoma do *T. gondii*. Na PCR foi utilizada uma solução de amplificação contendo água Mili Q, um tampão, dois primers específicos, uma mistura de nucleotídeos, dNTPs, íons de magnésio, enzima Taq polimerase e o DNA previamente extraído. Os componentes da reação de amplificação do DNA de *N. caninum* com as respectivas concentrações utilizadas na reação de PCR estão na Tabela 2 e os componentes da reação de amplificação do DNA de *T. gondii* estão na Tabela 3.

As soluções de amplificação da PCR foram preparadas em fluxo laminar na área de pré-PCR. Antes do preparo da solução de amplificação o fluxo laminar foi previamente higienizado com hipoclorito de sódio e a lâmpada UV foi mantida ligada por 15 minutos. A solução de amplificação contendo a mistura dos componentes foi distribuída em alíquotas nos tubos de PCR, sendo transportados em gelo para a sala onde foi adicionado o DNA. A solução foi homogeneizada rapidamente em vortex e centrifugada.

TABELA 2 – COMPONENTES DA REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA PARA AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE *N. caninum* E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES NA REAÇÃO COM OS PRIMERS Np6/Np21.

Componentes	Concentração da solução de uso	Volume da reação (µl)	Concentração final
Água Mili-Q	-----	18,4	qsp
Tampão	10x	2,5	1x
Primer Np6	25 mM	0,5	0,5 pmol
Primer Np21	25 mM	0,5	0,5 pmol
MgCL2	50 mM	0,75	1,5 mM
DNTPs	25 mM	0,2	0,2 mM
Taq polimerase	50 mM	0,2	1 U/µL
DNA	----	1,5	60 ng
Total	----	25	----

TABELA 3 – COMPONENTES DA REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA PARA AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE *T.gondii* E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES NA REAÇÃO COM OS PRIMERS TOX4/TOX5

Componentes	Concentração da solução de uso	Volume da reação (µl)	Concentração final
Água Mili-Q	-----	18,4	qsp
Tampão	10x	2,5	1x
Primer Np6	25 mM	0,5	0,5 pmol
Primer Np21	25 mM	0,5	0,5 pmol
MgCL2	50 mM	0,75	1,5 mM
DNTPs	25 mM	0,2	0,2 mM
Taq polimerase	50 mM	0,2	1 U/µL
DNA	----	1,5	60 ng
Total	----	25	----

#### 2.6.4. AMPLIFICAÇÃO DO DNA

Na reação de amplificação das amostras com os primers Np6 e Np21 o termociclador (Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler®) foi programado para realizar uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94<sup>o</sup> C, 32 ciclos de 35 segundos a 94<sup>o</sup>C para a desnaturação do DNA, 30 segundos a 54<sup>o</sup> C para anelamento dos *primers* ao DNA, 30 segundos a 74<sup>o</sup> C para extensão do DNA

a partir dos *primers*, pela Taq polimerase. No final foi programado 1 ciclo de 5 minutos a 72° C para extensão final e posterior manutenção a 4°C até a retirada das amostras.

Para a amplificação das amostras com os primers TOX4 e TOX5, o termociclador foi programado para realizar uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, 32 ciclos de 35 segundos a 94°C para desnaturação do DNA, 30 segundos a 65°C para anelamento dos primers ao DNA, 30 segundos a 74°C para extensão do DNA a partir dos primers, pela Taq polimerase. No final foi programado 1 ciclo de 5 minutos a 72°C para a extensão final e posterior manutenção a 4°C até a retirada das amostras.

## 2.7. IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DA PCR

Após o processo de amplificação os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,4%, utilizando fonte Thermo Scientific® a 95 volts. Na eletroforese foi utilizado o marcador 1Kb Plus DNA Ladder - Invitrogen® 250µg (1,0 µg/µ), um padrão contendo fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos, de 10 a 10.000 pares de bases. A eletroforese dos produtos da PCR forneceu os resultados da amplificação e a sua especificidade conforme a presença dos fragmentos de DNA de tamanho esperado sob a forma de bandas. Os géis foram observados no transiluminador de ultravioleta (Loccus Biotecnologia® LTB-20X20ST) e fotografados com máquina SONY® Cyber-shot DSC-W200.

## 2.8. PCR da região ITS 1

Para a região ITS1, foi realizada a PCR com os primers ITS5 5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3' e ITS2 5'GCTGCGTTCTTCATCGATGC3' (WHITE *et al.*, 1990). Os diferentes organismos pertencentes à sub-família Toxoplasmatinae possuem sequências de nucleotídeos diferentes na região codificadora do ITS1, de forma que a análise deste locus permite distinguir estes organismos. Os componentes da solução de amplificação utilizada para a região ITS1 foram os mesmos das reações utilizando os primers Np6/Np21 e TOX4/TOX5. A reação de

amplificação com os primers ITS5/ITS2 foi realizada no termociclador Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler® programado conforme descrito no Anexo 6. Para o sequenciamento foi realizado a PCR de quatro amostras (leite cru e isolados de leite de duas vacas soropositivas para *T.gondii*) com os primers ITS5/ITS2 para obter a região ITS (“internal transcribed spacer”) que está localizada entre os genes 18S rDNA e 28S rDNA e pode ser amplificada por oligonucleotídeos iniciadores específicos (HILLIS & DIXON, 1991). A análise da sequência de nucleotídeos da região ITS1 constitui uma importante ferramenta para definição de isolados de um determinado organismo e diferenciação entre parasitos estreitamente relacionados (MARSH *et al.*, 1998; DUBEY *et al.*, 2001; GONDIM *et al.*, 2004).

#### 2.9 Produtos amplificados obtidos da região ITS1 submetidos ao sequenciamento para confirmar a identidade de *T. gondii* e/ou *N. caninum*

Os produtos obtidos da região ITS1 foram submetidos à purificação para remoção de dNTPs, primers não incorporados na reação e o DNA da amostra que não foi amplificado, através de acetato de amônio, etanol absoluto e etanol 70%. Foi realizada eletroforese em gel de agarose (Anexo 7) após a purificação dos produtos amplificados para confirmar a existência de apenas um fragmento amplificado em cada amostra. Os produtos obtidos foram enviados para a empresa de sequenciamento ACTGene Ludwig Biotec, localizada em Alvorada/RS. As sequências nucleotídicas obtidas pela amplificação e sequenciamento foram alinhadas e comparadas aos dados presentes no “GeneBank”. Para comparações das sequências obtidas foi utilizado o programa “BLAST” disponível no site da NCBI (National Center for Biotechnology Information).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. PESQUISA DE ANTICORPOS NO SORO E LEITE

Das 12 vacas, dez foram soropositivas para *Neospora caninum* durante todo o monitoramento e a titulação variou de 1:50 a 1:400. As vacas (11 e 12) foram soronegativas para *N. caninum* e soropositivas para *T. gondii*. A vaca 11 foi soropositiva em quatro coletas e a vaca 12 em três coletas, todas com título 1:50.

Do total das coletas de leite de vacas soropositivas para *N. caninum*, 4,5% (6/132) foram negativas para pesquisa de anticorpos anti-*N.caninum* no leite, e estas apresentavam titulação 1:50. Nas 22 amostras de leite, das duas vacas soropositivas para *T.gondii*, a vaca 11 foi positiva em quatro amostras e a vaca 12 em duas amostras de leite.

#### 3.2. ISOLAMENTO *IN VITRO*

Nos frascos de cultivo inoculados de amostras de leite da vaca 11, foram observados pequenos protozoários no tapete de células e efeito citopático.

A presença dos parasitos foi verificada inicialmente em áreas de rompimento do tapete celular, aparecendo pequenos espaços na monocamada e restos celulares no meio de cultivo. Os protozoários também foram observados soltos no meio extracelular, em pequena quantidade e de forma esférica. A multiplicação dos parasitos nas células Vero ocorreu de maneira lenta produzindo efeitos citopáticos de destruição gradativa na monocamada (Figura 1).

Cistos e oocistos não foram identificados durante o cultivo dos protozoários. Foram observados os estágios de taquizoítas em forma esférica e de multiplicação lenta e com motilidade. Os protozoários foram observados isolados e em duplas, mas durante a manutenção verificou-se número pequeno de protozoários. Uma amostra foi observada crescimento de protozoários de maior tamanho e em maior quantidade, em formato de meia lua.

O critério para a realização das passagens dos parasitos para novos frascos Roux contendo tapete de célula Vero íntegro foi a infecção e destruição

de aproximadamente 70% do tapete celular. O período de estabelecimento do cultivo dos isolados foi variável, compreendeu desde a primeira observação das estruturas compatíveis com protozoários até a transferência periódica para novos frascos, devido ao crescimento lento dos protozoários.

Nos frascos de controle negativo contendo a monocamada de células Vero não foram observados protozoários durante o período de isolamento.

Os parasitas foram obtidos das garrafas de cultivo para posterior extração do DNA.

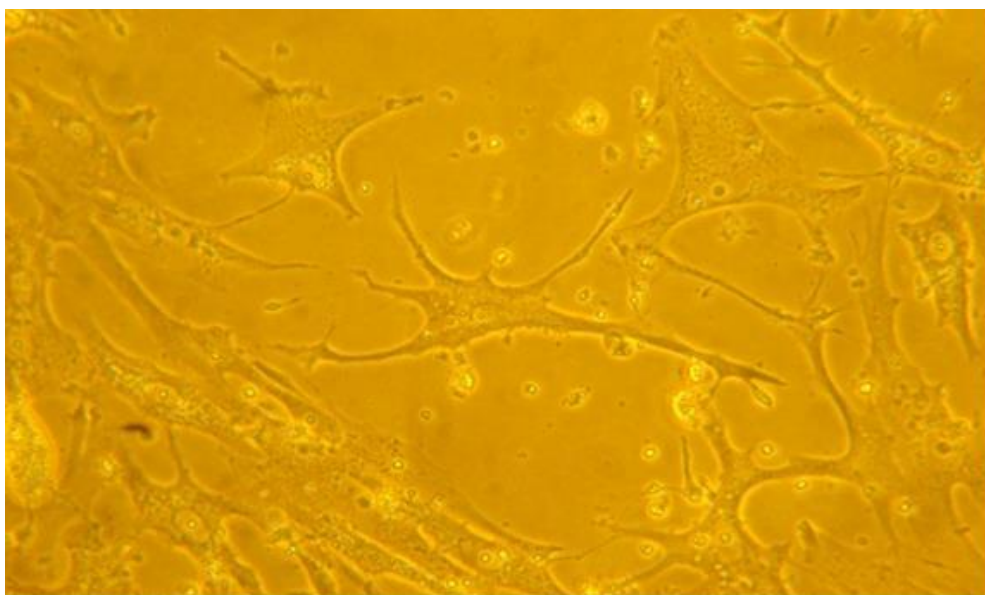


FIGURA 1 – Monocamada de célula vero infectada com o isolado de *T.gondii* (RH). presença de efeito citopático com áreas de rompimento celular. Microscópio invertido (200x).

### 3.3 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA – PCR

A PCR foi realizada do leite cru e do isolado das 12 vacas, em três coletas de leite para pesquisa de *N.caninum* (em dez vacas soropositivas para *N. caninum*) e para *T. gondii* (duas vacas soropositivas para *T.gondii*), totalizando 36 amostras. As concentrações de DNA extraídas estão na tabela 4. Os produtos de amplificação não foram obtidos com as amostras de DNA das células Vero e da água como controle negativo.

Nas amostras de leite íntegro e no isolado de todas as vacas soropositivas para *Neospora caninum*, foram negativas na PCR. A amostra de leite da vaca 11, soropositiva para *T. gondii*, foi positiva (Figura 2) para detecção do DNA

para *T. gondii* (tabela 5). O isolado obtido dessa amostra foi confirmado como *T.gondii*, na PCR.

Tabela 4 – Quantidade de DNA obtido de amostras de leite íntegro de 12 vacas

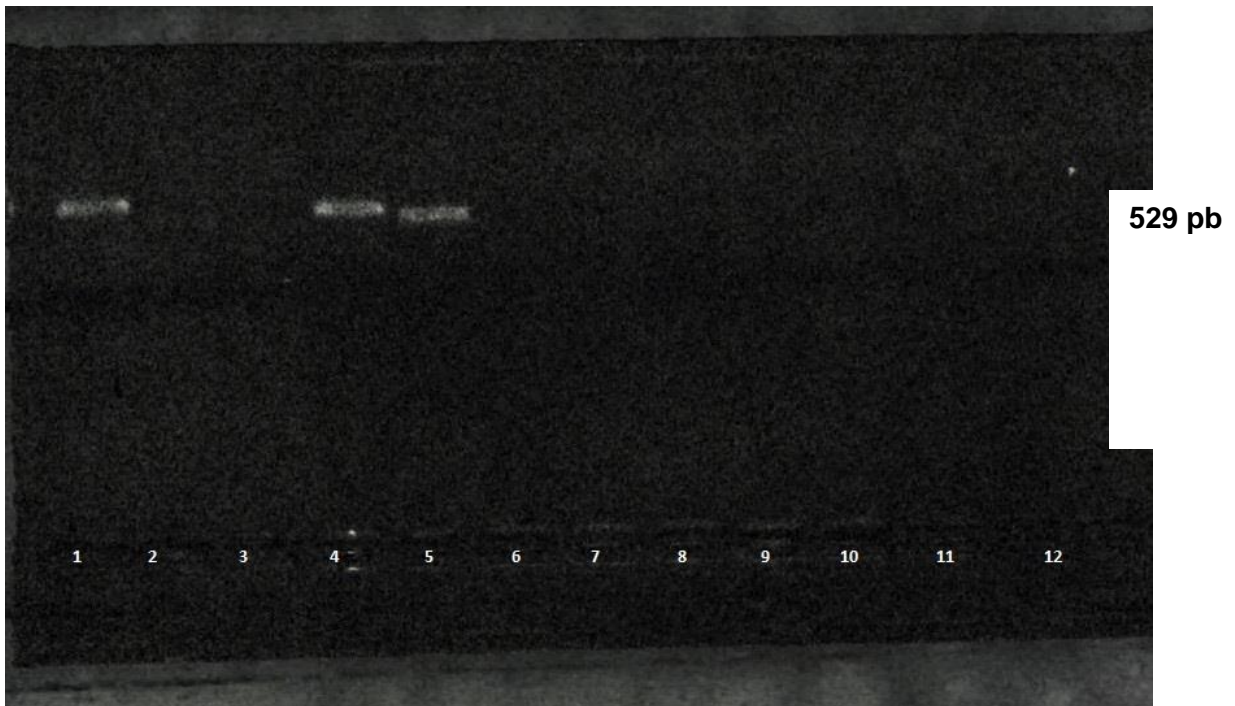
<b>AMOSTRAS</b>	<b>DNA (ng/µl)</b>	<b>AMOSTRAS</b>	<b>DNA (ng/µl)</b>
LEITE 1	9,4	LEITE 19	3,9
LEITE 2	5,7	LEITE 20	9,6
LEITE 3	3,1	LEITE 21	3,1
LEITE 4	5	LEITE 22	2,5
LEITE 5	4,9	LEITE 23	5
LEITE 6	2,9	LEITE 24	2
LEITE 7	5,9	LEITE 25	8,7
LEITE 8	8,3	LEITE 26	5,7
LEITE 9	2,4	LEITE 27	5,5
LEITE 10	2,9	LEITE 28	6,3
LEITE 11	2,6	LEITE 29	2,9
LEITE 12	2,2	LEITE 30	4,2
LEITE 13	4,2	LEITE 31	3,9
LEITE 14	4,5	LEITE 32	2
LEITE 15	2,8	LEITE 33	6,4
LEITE 16	53,9	LEITE 34	7,1
LEITE 17	3,5	LEITE 35	3,3
LEITE 18	7,6	LEITE 36	4,1

Tabela 5 – Resultados sorológicos para *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* (título na RIFI) e da PCR em amostras de leite íntegro de vacas e sedimento dos isolados obtidos em cultivo de célula Vero.

VACAS	SOROLOGIA <i>N.caninum</i>	SOROLOGIA <i>T.gondii</i>	PCR leite íntegro	PCR isolado
1	Positivo (1:100)	Negativo	Negativo	Negativo
2	Positivo (1:50)	Negativo	Negativo	Negativo
3	Positivo (1:400)	Negativo	Negativo	Negativo
4	Positivo (1:400)	Negativo	Negativo	Negativo
5	Positivo (1:400)	Negativo	Negativo	Negativo
6	Positivo (1:50)	Negativo	Negativo	Negativo
7	Positivo (1:100)	Negativo	Negativo	Negativo
8	Positivo (1:100)	Negativo	Negativo	Negativo
9	Positivo (1:100)	Negativo	Negativo	Negativo
10	Positivo (1:50)	Negativo	Negativo	Negativo
11	Negativo	Positivo (1:50)	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
12	Negativo	Positivo (1:50)	Negativo	Negativo

Figura 2 – Figura representativa dos produtos de PCR separados em gel de agarose e corado com safer®, indicando a presença do DNA de *T. gondii* (primers TOX4/TOX5) amplificado de amostras e de isolados do leite cru de vacas





1 – cepa referência RH de *T. gondii*; 2 – H<sub>2</sub>O (controle negativo); 3 – leite íntegro (vaca 1); 4- *T. gondii* (leite íntegro vaca 11) 5 – *T.gondii* (isolado leite vaca 11) ; 6 – leite íntegro vaca 2; 7 –isolado leite vaca 2; 8 – leite íntegro vaca 3; 9 – leite isolado vaca 3; 10 – leite íntegro vaca 4; 11 – isolado leite vaca 4; 12 – leite íntegro vaca 5;

### 3.4 Análise das sequências nucleotídicas da região ITS1

Foi obtido duas sequências do produto de amplificação da região ITS1 da amostra do protozoário isolado do leite íntegro e do isolado de uma vaca, demonstrando 99% de identidade com *Toxoplasma gondii*

Sequência obtida do produto de amplificação da região ITS1 com o primer ITS2:

```
GGGCAGTCATGGCTGGAATTTAAATAACATTATAGTTTAGGAAGCAATCTG
AAAGCACATCGAGAGAGATGCAGAAAGATACAATCTTTCCTCTCTCTCAA
ATGTTCCCTCAGATTTGTTGTTTCAAATAACGGTGTGGGAAAAAGAATGCA
CACTGAAGAACTCCTGGAAATCAGTATCCCAACAGAGACACGAATTTCCA
GAAATTGAGCCCCTTCGCTGTGCACCCCCGGATACCTGCACTGGCTTCCA
ATATTGGAAGCAGCGCAGGATATCCAACATGAAGAAGGCAATAATACCTTT
CGATACTATCACGCTTCTTGAATGCAAATCTCTCCAATGGAGAGAGATGCA
AACTCATGTTTTGCTTGGGATTCAAAGGTTGATGGTTAATAAAGAATAAGGA
CGTGTGAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGACTT
TTTACTTCCCAA
```

Sequência obtida do produto de amplificação da região ITS1 com o primer ITS5:

TTTGGAAGGACCTGCGGAGGATCATTACACGTCCTTATTCTTTATTAACC  
 ATCAACCTTTGAATCCCAAGCAAACATGAGTTTGCATCTCTCTCCATTGGA  
 GAGATTTGCATTCAAGAAGCGTGATAGTATCGAAAGGTATTATTGCCTTCTT  
 CATGTTGGATATCCTGCGCTGCTTCCAATATTGGAAGCCAGTGCAGGTATC  
 CGGGGGTGCACAGCGAAGGGGCTCAATTTCTGGAAATTCGTGTCTCTGTT  
 GGGATACTGATTTCCAGGAGTTTCTTCAGTGTGCATTCTTTTTTCCCACACC  
 GTTATTTCAAACAACAAATCTGAGGAACATTTGAGAGAGAGTGAAAGATTG  
 TATCTTTCTGCATCTCTCTCGATGTGCTTTCAGATTGCTTCCTAAACTATAA  
 TGTTATTTTAAATTTTCAGCAATGGATGTCTTGGCTCGCGCATCGATGAAGA  
 AACGCAACAA

#### 4. DISCUSSÃO

A soroprevalência de anticorpos anti-*T.gondii* no presente estudo utilizando a RIFI foi baixa (16,6%) comparando com estudos realizados no Paraná, que obtiveram 26% (OGAWA *et al*, 2005) e 41,4% (DAGUER *et al*, 2004), provavelmente devido a menor quantidade de bovinos. A concordância nos resultados entre a detecção de anticorpos nas amostras de leite e de soro sanguíneo na RIFI foram similares com aqueles obtidos por CAMILLO *et al* (2011) em que amostras de soro sanguíneo com titulação igual ou acima de 1:100 obtiveram 100% de concordância entre as amostras simultâneas.

O estágio dos parasitos visualizados pelo microscópio invertido durante o isolamento em cultivo de células Vero demonstram ser taquizoítas devido às formas (esféricas e em arco) observadas. O tempo de isolamento do *T.gondii* no presente estudo foi de 10 dias, mas outros trabalhos que isolaram o protozoário de outros tecidos relataram que o aparecimento de estruturas no cultivo variou de 2 a 32 dias (WAAP *et al*, 2006; MILLER *et al*, 2000). O isolamento de *T.gondii* em cultivo de células Vero demonstrou a viabilidade dos protozoários. Pode haver uma grande variação no número de parasitas presentes no leite, tanto entre vacas como em diferentes fases de lactação (MOSKWA *et al*, 2007).

O DNA do *N. caninum* foi detectado no leite de vacas soropositivas (MOSKWA., *et al* 2003) e em oito amostras de colostro de vacas soropositivas (MOSKWA., *et al* 2007), porém no presente estudo nenhuma amostra de leite foi passível de detecção na PCR. Isto demonstra que a eliminação do parasita é

esporádica e, neste caso, a quantidade de DNA extraída das amostras de leite foram pequenas.

PITUCO *et al.* (2005) analisaram 1.124 partidas de sêmen de touros soropositivos para *N. caninum* e nenhuma amostra demonstrou a presença de DNA do parasita com a PCR convencional, somente com a nested-PCR. Esta técnica demonstra maior sensibilidade, de 1 a 10 parasitos/mL de sêmen. Porém, SHARIFZADEH *et al.* (2012) detectaram a presença de DNA de *N. caninum* em 30 das 175 amostras de sêmen bovinos no Irã, analisadas através da técnica de PCR convencional. ORTEGA-MORA *et al.* (2003) comprovaram que *N. caninum* pode ser eliminado esporadicamente no sêmen fresco e industrializado de touros sororeagentes pela técnica de nested-PCR. A eliminação do protozoário ocorre no leite devido a resposta imune baixa, uma vez que vacas com titulação alta o protozoário encista-se, como uma forma de defesa do organismo (DUBEY *et al.*, 2011). Outra questão é que a quantidade de DNA extraída em amostras de leite foi baixa na PCR convencional, e técnicas que demonstram maior sensibilidade devem ser testadas. Também não deve ser descartada a possibilidade da presença do parasito, assim como cita ORTEGA-MOURA *et al* (2003), quando o estudo é com o sêmen, de ser ter a maior incidência de DNA de *N. caninum* no material de isolamento em cultivo celular quando há baixa quantidade do parasito no leite.

O *Toxoplasma gondii* já foi encontrado em diferentes espécies animais, incluindo os humanos (RIEMANN H.P *et al*, 1975; SKINNER *et al*, 1990). Isso faz com que a presença dos taquizoítas no leite não pasteurizado possa ser uma fonte de infecção, levantando a possibilidade da transmissão lactogênica da doença. A ocorrência dos sintomas clínicos que o parasita provoca já foi associada ao consumo de leite não pasteurizado, em humanos (SACKS *et al*, 1982; SKINNET *et al*, 1990). Porém, os taquizoítas não são considerados uma real fonte de infecção pois eles são sensíveis quando estão fora do leite (RIEMANN H.P ,*et al*, 1975), e são destruídos rapidamente pelo suco gástrico (DUBEY *et al*, 1998).

A presença de taquizoítas de *T.gondii* foi relatada no leite de ovelhas (BAHRIENI M *et al*, 2008, TAVASSOLI *et al*, 2013) cabras (RAGOZO *et al*, 2010), vacas (MACEDO *et al*, 2012) e camundongos (BEZERRA *et al*, 2013).

No presente estudo, a prevalência foi baixa na detecção do *T.gondii* na PCR, devido à baixa quantidade de vacas soropositivas para *T.gondii* e também devido à baixa quantidade de DNA extraído, podendo ser testadas técnicas mais sensíveis.

Mancianti *et al.* (2013), na Itália, detectaram DNA de *T. gondii* (nested PCR) em 13% (10/77) das amostras de leite de cabras soropositivas, naturalmente infectadas, de uma população total estudada de 127 animais dos quais 60,6% foram positivas (MAT,  $\geq 1:20$ ). No Cairo, Egito, em animais utilizados para trabalho, Haridy *et al.* (2010) revelaram *T. gondii* (metodologia não descrita) no leite de sete (46,3%) de 15 jumentas prenhas. Mancianti *et al.* (2014), detectaram DNA do parasito em leite de três jumentas (*Equus asinus*), saudáveis, naturalmente infectadas, na região da Toscana, Itália. Os autores concluíram que a presença de DNA do *T. gondii* no leite sugere que a ingestão de leite cru de animais soropositivos pode ser uma potencial via de transmissão para o ser humano quando o consumo de leite “in natura” de jumenta é indicado, por razões nutricionais e terapêuticas. No Irã, Dehkordi *et al.* (2013) isolaram e/ou detectaram *T. gondii* do leite de cabras, ovelhas, búfalas, vacas e camelas, pelos métodos de cultivo celular, bioensaio em gatos e técnicas de PCR e relataram que 51 de 889 amostras de leite (5,73%) continham o parasito (tanto no cultivo celular quanto no bioensaio em gatos). Pela PCR, os resultados revelaram índice ligeiramente inferior: 46 amostras positivas (5,17%). A espécie caprina foi a que apresentou maior taxa de contaminação (10%). OSSANI (2014) encontraram o DNA de *T. gondii* em amostras de leite de 13 ovelhas somente em uma das três coletas de leite avaliadas ao longo do período (45, 90 e 120 dias de lactação) não caracterizando intermitência. Há escassez de informações sobre a detecção do DNA do *T.gondii* no leite de vacas naturalmente infectadas.

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que *T. gondii* pode ser eliminado no leite de vacas naturalmente infectadas (com título baixo de anticorpos), representando uma possível fonte de infecção para o ser humano, por meio do consumo do leite “in natura” e/ou derivados, além da possibilidade de transmissão via lactogênica para bezerros.

## 5. CONCLUSÃO

Não foi detectado o DNA de *N. caninum* de amostras de leite íntegro e no isolado das amostras de leite, de vacas positivas na RIFI.

*T. gondii* pode ser eliminado no leite de vacas naturalmente infectadas e com título baixo de anticorpos; o parasita foi isolado *in vitro* e o DNA do protozoário foi detectado no leite.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANTES, T.P.; LOPES, W.D.Z.; FERREIRA, R.M.; PIERONI, J.S.P.; PINTO, V.M.R.; SAKAMOTO, C.A.; COSTA, A.J. *Toxoplasma gondii*: Evidence for the transmission by semen in dogs. **Experimental Parasitology**, v. 123, p. 190–194, 2009.

BEZERRA, M.J. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of naturally infected goats in the Northeast of Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, p. 2, 2013.

BLEWETT D.A., TEALE A.J., MILLER J.K., SCOTT G.R. & BUXTON D. 1982. Toxoplasmosis in rams: Possible significance of venereal transmission. **Vet. Rec.** 24:73-75.

BONAMETTI, A.M.; PASSOS, J.N.; SILVA, E.M.K. et al. Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.30, p.21-25, 1997.

CAMILLO, G.; CEZAR, A.S.; ANTONELLO, A.M.; SANGIONI, A.; FLORES, E.F.; PEREIRA, G.R.; GONÇALVES, P.B.D.; VOGEL, F.S.F. Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras individuais e coletivas de leite de bovinos pela reação de imunofluorescência indireta. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 482-486, 2011.

CAMOSSI, L.G. Diferenciação entre os estágios agudo e crônico na infecção toxoplásmica pelo Método de Aglutinação Direta Modificado e pesquisa do agente no leite de ovelhas naturalmente infectadas por *Toxoplasma gondii*. 2010. 131p. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.**

CHANLUN, A., NASLUND, K., AIUMLAMAI, S., BJORKMAN, C. Use of bulk milk for detection of *Neospora caninum* infection in dairy herds in Thailand. **Veterinary Parasitology**, v.110, p.35-44, 2002.

CHIARI C.A. & NEVES D.P. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. Mem. **Inst. Oswaldo Cruz** 79:337-340, 1984.

DALIMI A, ABDOLI A. *Toxoplasma gondii* and Male Reproduction Impairment: A new aspect of Toxoplasmosis Research, Jundishapur **Journal Microbiology**. 6(8):e7184, 2013.

DAVISON, H. C; GUY, J. W; McGARRY, F; GUY, F; WILLIAMS, D. J. L; KELLY, D. F; TREES, A. J; Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. **Research Veterinary Science**, v. 70, p. 163-168. 2001.

DEHKORDI, F.S. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in raw caprine, ovine, buffalo, bovine and camel milk using cell cultivation, cat bioassay, capture ELISA, and PCR 65 methods in Iran. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, p. 120-125, 2013.

DUBEY J.P. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in caprine livers and public health significance of toxoplasmosis in goats. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 177:1203-1207 , 1980.

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

DUBEY, J. P. *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis* and other cystforming coccidia of humans and animals In: KREIER, J. P. **Parasitic protozoa. New York: Academic Press**, p-1-158, 1993.

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

DUBEY, J.P. Advances in the cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.267-299, 1998.

DUBEY, J.P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Veterinary Parasitology**, v. 64, p.65-70, 1996.

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

DUBEY, J.P.; SHARMA, S.P. Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 5, p.794–795, 1980.

FIGUEIREDO J.F., SILVA D.A.O., CABRAL D.D. & MINEO J.R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in goats by the indirect haemagglutination, immunofluorescence and immunoenzymatic tests in the region of Uberlândia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 96:687-692, 2001.

FILHO, J.R.E.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R.; MYASAKA, D.; CASTAGNOLLI, K.; COSTA, A.J. Toxoplasmose experimental em coelhas gestantes. **Seminário: Ciências Agrárias**, v. 22, n.1, p. 3-10, 2001.

GUY, C.S; WILLIAMS, D.J.L; KELLY, D.F; MCGARRY, J; GUY, W; BJORKMAN, C; SMITH, R.F; TREES, A.J. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase an maternal antibody. **Veterinary Records**, v.149, p.443-453, 2001.

HARIDY, F.M. et al. Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in working donkeys and donkey's milk in Greater Cairo, **Egypt. Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v.40, p.459-464, 2010.

HURKOVA L., MODRY D. PCR detection of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in brains of wild carnivores. **Veterinary Parasitology**;137:150–154, 2006.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; McALLISTER, M.M. *Neospora caninum* and the potential for parasite transmission. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.21, n.4, p.317-321, 1999.

LOBATO, J.; SILVA, D.A.O.; MINEO, W.P. et al. Detection of Immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients

who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. **Clin. Vaccine Immunol.**, v.13, p.84-89, 2006.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; VINNE, R.V.D.; PINCKNEY, R.D. Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 3, p. 103-109, 2004.

LOPES, W.D.Z.; COSTA, A.J.; SANTANA, L.F.; SANTOS, R.S.; ROSSANESE, W.M.; LOPES, W.C.Z.; COSTA, G.H.N.; SAKAMOTO, C.A.; SANTOS, T.R. Aspects of Toxoplasma Infection on the Reproductive System of Experimentally Infected Rams (*Ovis Aries*). **Journal of Parasitology Research**, article ID 602803, 2009.

LUFT, B.J.; REMINGTON, J.S. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. **Clinical Infection Disease**, 15, 211-22, 1992.

MACEDO M.F.S.B, MACEDO C.A.B, EWALD M.P.C, MARTINS G.F, ZULPO D.L, CUNHA I.A.L,. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from pregnant dairy cows (*Bos taurus*) slaughtered. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária** , 21(1): 74-77, 2012.

MALEY, S.W; BUXTON, D; THOMPSON, K; SCHRIEFER, CH, INNES, E.A. Serological analysis of calves experimentally infected with *Neospora caninum*: a 1 year study. **Veterinary Parasitology**, v.96, p.1-9, 2001.

MANCIANTI, F. et al. Seroprevalence, Detection of DNA in Blood and Milk, and Genotyping of *Toxoplasma gondii* in a Goat Population in Italy. **BioMed Research International**, v.1, p.1- 6, 2013.

MANCIANTI, F.; NARDONI S, PAPINI R, MUGNAINI L, MARTINI M, ALTOMONTE I, SALARI F, D'ASCENZI C, DUBEY JP. Detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* DNA in the blood and milk of naturally infected donkeys (*Equus asinus*). **Parasit Vectors**. 4 3;7:165, 2014.

MORAES E.P.B.X., BATISTA A.M., FARIA E.B., FREIRE R.L., FREITAS A.C., SILVA M.A.R., BRAGA V.A. & MOTA R.A. Experimental infection by *Toxoplasma gondii* using contaminated semen containing different doses of tachyzoites in sheep. **Veterinary Parasitology**. 170:318-322, 2010.

MOSKWA, B.; PASTUSIAK, K.; BIEN, J.; CABAJ, W. The first detection of *Neospora caninum* DNA in colostrum of infected cows. **Research Parasitology**, v. 100, p. 633-636, 2007.

MOSKWA, B; CABAJ, W; PASTUSIAK, K; BIÉN, J. The suitability of milk in detection of *Neospora caninum* infection in cows. **Acta Parasitology**, v.48, p.138-141, 2003.

MOURA, A.B. et al. *Toxoplasma gondii* no sêmen de suínos experimentalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, p.430-434, 2007.

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.**;155:335–350, 1987.

OGAWA, L. et al. Ocorrência de anticorpos anti *Toxoplasma gondii* em ovinos da região de Londrina no Estado do Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*. v. 24, p.57-62, 2003. Ver se não é 2005

ORTEGA-MORA, L.M; FERRE, I.; DEL-POZO, I.; CAETANO-DA-SILVA, A.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ADURIZ, G. Detection of *Neospora caninum* in sêmen of bulls. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 301-308, 2003.

OSSANI, R.U. Frequency of antibodies against *Toxoplasma gondii* in sheep herds with milk aptitude and detection of the agent in milk samples from west mesoregion of Santa Catarina. 2014. 90 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade do Estado de Santa Catarina**, Lages, 2014.

PETER, M; LUTKEFELS, E; HECKEROTH, A.R; SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue

cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **International Journal Parasitology**, v.31, p.1144-1148, 2001.

PETERSEN, E; LEBECH, M; JENSEN, L; LIND, P; RASK, M; BAGGER, P; BJORKMAN, C; UGGLA, A. *Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans. **Emergency Infective Disease**, v.5, p.278-281, 1999.

PITUCO, E.M; OKUDA, L.H; FAVA, C.D; STEFANO, E; SHIMOZONO, O.S; CAMARGO, N.T.C; GALETTI, M.C.T; OLIVEIRA, L.H. Pesquisa de *Neospora caninum* em sêmen de touros de Centrais de Inseminação Artificial do Brasil. Anais – I Fórum Brasileiro de estudos sobre *Neospora caninum*, **Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, USP, 2005.

RAGAZO, A.M.A. et al. Isolation of *Toxoplasma gondii* from goats from brazil. **Journal Parasitology**, v.95, p. 323-326, 2009.

REMYINGTON, J.S. et al. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.941-945, 2001.

RIEMANN, H.P., MEYER, M.E., THEIS, J.H, KELSO, G. BEHYMER, D.E. Toxoplasmosis in na infant fed unpasteurized goat milk. **Journal of Pediatrics**, 87, 573-6.

SACKS J.J., Roberto R.R. & Brooks N.F. 1982. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. **J. Am. Med. Assoc.** 248:1728-1732

SAGER, H., GLOOR, M., BJORKMAN, C., KRITZNER, S., GOTTSTEIN, B. Assessment of antibody avidity in aborting cattle by a somatic *Neospora caninum* tachyzoite antigen IgG avidity ELISA. **Veterinary Parasitology**, v. 112, p. 1–10, 2003.

SAWADA, M.; KONDO, H.; TOMIOKA, Y.; PARK, C. H.; MORITA, T.; SHIMADA, A.; UMEMURA, T. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.90, n.3, p.247-252, 2000.

SCARPELLI, L.C.; LOPES, W.D.Z.; MIGANI, M.; BRESCIANI, K.D.S.; COSTA, A.J. *Toxoplasma gondii* in experimentally infected *Bos taurus* and *Bos indicus* semen and tissues. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 59–64, 2009.

SCHARES, G; BARWALD, A; STAUBACH, C; WURM, R; RAUSER, M; CONRATHS, F.J; SCHOEDER, C. Adaptation of a comercial ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. **Veterinary Parasitology**, v.120, p.55-63, 2004.

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

SHARIFZADEH, A.; DOOSTI, A.; DEHKORDI, P.G.; PCR Assay for Detection of *Neospora Caninum* in Fresh and Frozen Semen Specimens of Iranian Bulls. **World Applied Sciences Journal**, v. 17, n. 6, p. 742-749, 2012.

SKINNER, L.J. et al. Simultaneous diagnosis of toxoplasmosis in goats and goatowner's family. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, p.359-361, 1990.

SPENCE, J.B.; BEATTIE, J.; FAULKNER, L.; WATSON, W.A. *Toxoplasma gondii* in the semen of rams. **Veterinary Record**, v. 102, p. 38-39, 1978.

SUÁREZ-HERNÁNDEZ, M. et al. Infección y enfermedad por *Toxoplasma gondii* en animales y humanos en 23 años de observación en la provincia de Ciego de Ávila, Cuba. **Revista Biomédica**,v. 16, p. 21- 27, 2005.

TAVASSOLI, M. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in Sheep and Goat Milk in Northwest of Iran by PCR-RFLP. **Jundishapur Journal Microbiology**,v. 6,p. 1-4, 2013.

TEALE, A.J.; BLEWETT, D.A.; MILLER, J.K.; BUXTON, D. Experimentally induced toxoplasmosis in young rams: The clinical syndrome and semen secretion of toxoplasma. **Veterinary Record**, v. 17, p. 53-55, 1982.

TREES, A. J.; DAVIDSON, H. C.; INNES, E. A.; WADTLING, J. M. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International Journal Parasitology**, v. 29, p. 1195-1200. 1999.

UGGLA, A; STENLUND, O. J. M; HOLMDAHL, E. B; JAKUBEK, P; THEBO, H. KINDAHL; BJORKAN, C. Oral *Neospora Caninum* inoculation of neonatal calves. **Interest Journal Parasitology**, v.28, p. 1467-1472. 1998.

VARCASIA A, LIGHTOWLERS MW, CATTOLI G, CANCEDDA GM, CANU S, GARIPPA G,. Genetic variation within *Taenia multiceps* in Sardinia, Western Mediterranean (Italy). **Reseach Parasitology**; 99(5): 622-626, 2006.

VITOR, R.W.A. et al. Eliminação de *Toxoplasma gondii* através de urina, saliva e leite de caprinos experimentalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.43, p.147-154, 1991.

WAAP, H.; ANGELO, H.; VILARES, A.; CORTES, H.; MEIRELES, J.; LEITÃO, A. Isolamento de *Toxoplasma gondii* a partir de cérebro e músculo de gatos sorologicamente positivos utilizando culturas celulares. **V Congresso Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias**, pôster 98, p. 217, 2011.

## ANEXOS

### ANEXO 1

Reação da Imunofluorescência Indireta para pesquisa de anticorpos contra *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*.

Material: lâminas para imunofluorescência com 10 orifícios cada, sensibilizadas com taquizoítas de *N. caninum* e *T. gondii*. Conservação: - 20°C.

Em cada lâmina além dos soros testes foram incluídos os soros controles positivo e negativo.

Técnica: Identificar as lâminas na parte polida e anotar as amostras em protocolo controle; Diluir as amostras de soro com PBS pH 7,2; Retirar as lâminas do congelador e secar sob ventilação por 10 minutos; Colocar 25 µl de cada amostra de soro diluído nos orifícios (poços) da lâmina; Incubar as lâminas por 30 minutos a 37°C em câmara úmida; Lavar com PBS por 10 minutos nas cubas; Lavar com água destilada; Secar; Colocar o conjugado específico (25µl/poço) – utilizado conjugado anti-IgG Sigma™;

Incubar as lâminas por 30 minutos a 37°C em câmara úmida;

Lavar com PBS por 10 minutos nas cubas;

Lavar com água destilada por 5 minutos; Secar;

Colocar a glicerina 90% (tamponada com PBS) entre as duas fileiras de orifícios e colocar uma lamínula;

Examinar as lâminas no microscópio de imunofluorescência.

### Anexo 2

\*Meio de manutenção Eagle:

Meio Eagle (Meio Essencial Mínimo de Eagle – MEM) suplementado com 2% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina G potássica, 100µg/ml de sulfato de estreptomicina e 1,25µg/ml de anfotericina B. O meio Eagle em pó mantido na geladeira foi preparado periodicamente na quantidade de 2 litros sendo esterilizado em seguida (filtro 0,22µm). A suplementação do meio foi realizada adicionando os suplementos assepticamente em 250 a 500 ml de meio estéril.

### Anexo 3

Isolamento de *Neospora caninum* e *T.gondii* de amostras de leite bovino.

1. Coleta de leite cru (*pool*) em tubos estéreis;
2. Colocar aproximadamente 1 mL de leite em garrafa de cultivo celular com monocamada de células Vero de 24 horas;
3. Incubar na estufa de CO<sub>2</sub> na temperatura de 37° C por 3 horas;
4. Remover a suspensão e fazer a troca do meio, acrescentando 5 ml de meio de manutenção Eagle 2% SFB;
5. Examinar o cultivo diariamente no microscópio invertido para observar os efeitos citopáticos na monocamada e os parasitos;

### Anexo 4

Reação da Polimerase em Cadeia – (PCR)

Na PCR foi preparado um mix de acordo com a Tabela 2 e 3. O volume da reação foi de 25µl.

Técnica da PCR:

1. Prepara o mix em fluxo laminar de acordo com o número de amostras de DNA, considerando o tubo branco;
2. Adicionar os componentes da reação em microtubos na sequência apresentada até a Taq polimerase. Manter os reagentes do mix no gelo e adicionar por último a enzima Taq polimerase. Preparar um tubo branco;
3. Homogeneizar o mix no microtubo em vórtex (30 segundos);
4. Distribuir as alíquotas determinadas do mix nos microtubos para PCR;
5. Acrescentar as amostras de DNA
6. Homogeneizar cada tubo em vórtex (2 segundos) após colocar a amostras;
7. Incubar as amostras no termociclador;

A amplificação no termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler® foi realizada com o seguinte programa:

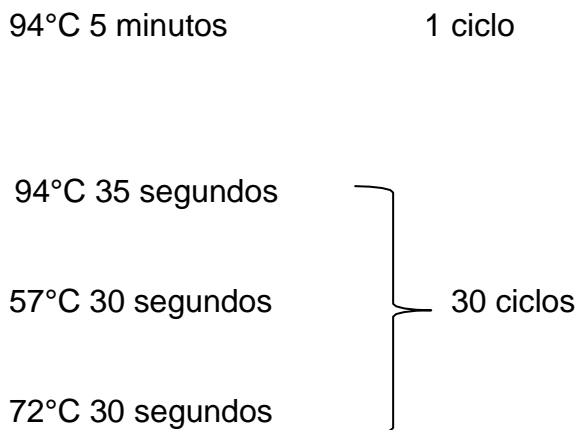
*Primers Np6/Np21*

94 °C 5 minutos		1 ciclo
94 °C 35 segundos		
54 °C 30 segundos		32 ciclos
72 °C 30 segundos	—	
72 °C 5 minutos		1 ciclo
	4 C ∞	

*Primers TOX4/TOX5*

94°C 5 minutos		1 ciclo
94°C 35 segundos		
		32 ciclos
65°C 30 segundos		
72°C 30 segundos	—	
72°C 5 minutos		1 ciclo
4°C ∞		

*Primers ITS5/ITS2*



72°C 5 minutos                      1 ciclo  
4°C ∞

Após a amplificação os produtos foram analisados por eletroforese (**Anexo 7**).

#### **Anexo 5**

Técnica para obtenção de parasitos para extração de DNA, visando a reação da polimerase em cadeia (PCR), do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFPR.

1. Após a infecção de 90 a 100% da monocamada de células Vero, retirar os parasitos com haste e/ou tripsina;
2. Transferir a suspensão para tubos de Falcon estéreis de 50 ml;
3. Centrifugar a 1.100 g por 10 minutos a 4°C;
4. Retirar o sobrenadante e lavar o sedimento com solução de cloreto de sódio a 0,9%;
5. Centrifugar novamente a 1.100 g por 10 minutos a 4°C;
6. Desprezar o sobrenadante e recuperar o sedimento transferido para microtubos estéreis;
7. Armazenar no freezer a -20°C.

#### **Anexo 6**

Extração com PureLink® Genomic DNA Kit da Invitrogen™

1. Adicionar 200µl de PBS, ressuspendendo as células;
2. Adicionar 20µl de proteinase K;
3. Adicionar 20µl de RNase A, misturar rapidamente utilizando o vórtex e incubar em temperatura ambiente por 2 minutos;
4. Adicionar 200µl de PureLink® Genomic Lysis e misturar em vórtex para obter uma solução homogênea;
5. Incubar a 55° C durante 10 minutos para promover a digestão das proteínas;
6. Adicionar 200µl de etanol 96-100% e misturar bem com vórtex durante 5 segundos para obter uma solução homogênea;
7. Colocar o material (aproximadamente 640µl) na coluna de rotação (Purelink® Spin Column);
8. Centrifugar a coluna a 9.800 g por 1 minuto;
9. Descartar o tubo coletor contendo o líquido filtrado pela coluna e rotação e colocar a coluna em novo tubo de coleta para as próximas 2 lavagens;
10. Adicionar 500µl de tampão de lavagem 1 previamente preparado com etanol;
11. Centrifugar a coluna à temperatura ambiente a 9.800 g por 1 minuto;
12. Descartar o tubo de coleta novamente e colocar a coluna de rotação em um tubo de coleta novo;
13. Adicionar 500µl tampão de lavagem n. 2 previamente preparado com etanol;
14. Centrifugar a coluna à temperatura ambiente a 9.800 g por 3 minutos;
15. Descartar o tubo de coleta novamente;
16. Colocar a coluna de rotação em microtubo estéril e identificado;
17. Adicionar 25-200µl de tampão de eluição genômica PureLink® na coluna de rotação; (utilizado 100µl)
18. Incubar à temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar a coluna a 9.800 g por 1 minuto à temperatura ambiente; (neste tubo contém DNA genômico purificado)
19. Para recuperar mais DNA pode realizar um segundo passo do item 17, fazendo nova centrifugação com o tampão de eluição genômica PureLink®;

## Anexo 7

### Eletroforese em gel de agarose 1,4%

1. Preparar o gel de agarose (UltraPure™ Agarose - Invitrogen®) a 1,4% em tampão TAE 1X;
2. Colocar a agarose na cuba com o pente. Após solidificar, retirar o pente com cuidado;
3. Acrescentar o tampão TAE 1X (800ml) na cuba com o gel solidificado;
4. Distribuir alíquotas de 1,5 µl do corante Safer Dye Kasvi® sobre um parafilme em número igual ao das amostras;
5. Misturar 5µl de cada amostra ao Safer Dye Kasvi® e depositar nos poços do gel, iniciando com o marcador de pares de bases (1Kb Plus DNA Ladder – Invitrogen 250µg) ( 1,0µ g/µl)
6. Conectar os cabos da fonte de eletroforese na cuba DIGEL® JY-SPCT, proceder a eletroforese a 95V utilizando a fonte Thermo Scientific® EC300XL, migrando do polo negativo (preto) para o positivo (vermelho);
7. Desligar após migração de 2/3 da cuba;
8. Retirar o gel da cuba e fazer leitura em transiluminador de ultravioleta (Loccus biotecnologia® LTB – 20x20ST).

\*Tampão TAE – Tris acetato na solução concentrada 50X

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA 0,5 M (Ph 8,0)	100ml
q.s.p	1.000 ml

Manter na geladeira e no momento do uso diluir para 1X com água destilada. A solução de uso apresenta as concentrações 0,04 M de Tris acetato e 0,001 M de EDTA.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMERÍA, S; FERRER, D.; PAVÓN, M.; CASTELLÀ, J; MANAS, S.; Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediated host of *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, n.107, p. 287-294. 2002.

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

ANDERSON, M.L.; REYNOLDS, J.P.; ROWE, J.D.; SVERLOW, K.W.; PACKHAM A.E.; BARR, B.C.; CONRAD, P.A. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. Infection in dairy cattle. **Journal American Veterinary Association**, v. 210, p. 1169-1172, 1997.

ANDREOTTI, R.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; PAIVA, F. Neosporose em bovinos. UFMS. **Série Qualificação Rural**, v.3, p.71-103, 2005.

ANDREOTTI, R.; OLIVEIRA, J.M.; ARAÚJO E SILVA, E.; OSHIRO, L.M.; MATOS, M.F.C. Occurrence of *Neospora caninum* in dogs and its correlation with visceral leishmaniasis in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 375-379, 2006.

ANTONY, A.; WILLIAMSON, N.B. Recent advances in understanding the epidemiology of *Neospora caninum* in cattle. **New Zealand Veterinary Journal**, v.49, p.42-47, 2001.

ARANTES, T.P.; LOPES, W.D.Z.; FERREIRA, R.M.; PIERONI, J.S.P.; PINTO, V.M.R.; SAKAMOTO, C.A.; COSTA, A.J. *Toxoplasma gondii*: Evidence for the transmission by semen in dogs. **Experimental Parasitology**, v. 123, p. 190–194, 2009.

ATKINSON, R.A.; COOK, R.W.; REDDACLIFF, L.A.; ROTHWELL, J.; BROADY, K.W.; HARPER, P.A.W., ELLIS, J.T. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in a dairy cattle herd. **Australian Veterinary Journal**, v. 78, p. 262-266, 2000.

BEZERRA, M.J. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of naturally infected goats in the Northeast of Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, p. 2, 2013.

BJERKAS, J; MOHN, S. F; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Z. Parasitenkd** v. 70, p. 271-274. 1984.

BJORKMAN, C., ALVAREZ-GARCIA, G.; CONRATHS, F.J.; MATTSSON, J.G.; ORTEGA-MORA, L.M., SAGER, H.; SCHARES, G. *Neospora caninum* IgG avidity tests: an interlaboratory comparison. *Veterinary Parasitology*, v. 140, p. 273-280, 2006.

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

BJORKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, v.29, P. 1497-1507, 1999.

BLEWETT D.A., TEALE A.J., MILLER J.K., SCOTT G.R. & BUXTON D. 1982. Toxoplasmosis in rams: Possible significance of venereal transmission. **Vet. Rec.** 24:73-75.

BONAMETTI, A.M.; PASSOS, J.N.; SILVA, E.M.K. et al. Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.30, p.21-25, 1997.

BYREM, T.M; BARTLETT, P.C; DONOHUE, H; VOISINET, B.D; HOUSEMAN, J.T. Performance of a commercial serum ELISA for the detection of antibodies to *Neospora caninum* in whole and skim milk samples. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p.249-253, 2012.

CAETANO-DA-SILVA, A.; FERRE, I.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; NAVARRO, V.; ADURIZ, G.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L.M. Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended sêmen from naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 62, p. 1329-1336, 2004.

CAMILLO, G., ANTONELLO, M.A e colaboradores. Reação de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras coletivas de leite. **Ciência Rural.**, v.41, n.9, p.1600-1604, 2011.

CAMILLO, G.; CEZAR, A.S.; ANTONELLO, A.M.; SANGIONI, A.; FLORES, E.F.; PEREIRA, G.R.; GONÇALVES, P.B.D.; VOGEL, F.S.F. Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras individuais e coletivas de leite de bovinos pela reação de imunofluorescência indireta. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 482-486, 2011.

CAMOSSI, L.G. Diferenciação entre os estágios agudo e crônico na infecção toxoplásmica pelo Método de Aglutinação Direta Modificado e pesquisa do agente no leite de ovelhas naturalmente infectadas por *Toxoplasma gondii*. 2010. 131p. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu**, 2010.

CHANLUN, A., NASLUND, K., AIUMLAMAI, S., BJORKMAN, C. Use of bulk milk for detection of *Neospora caninum* infection in dairy herds in Thailand. **Veterinary Parasitology.**, v.110, p.35-44, 2002.

CHANLUN, A.; EMANUELSON, U; AIUMLAMAI, S; BJORKMAN, C. Variations of *Neospora caninum* antibody levels in milk during lactation in dairy cows. **Veterinary Parasitology**, v. 141, p. 349-355, 2006.

CHARLIER, J; DUCHATEAU, L; VANGROENWEGHE, F; CLAEREBOUT, E; BURVENICH, C; VERCRUYSSSE, J. The effect of an experimentally induced acute mastitis on the results of an *Ostertagia ostertagi* milk ELISA. **Veterinary Parasitology**, v.135, p.161-165, 2006.

CHIARI C.A. & NEVES D.P. Toxoplasmosse humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. Mem. **Inst. Oswaldo Cruz** 79:337-340, 1984.

CHRISTENSEN, J.; GARDNER, I.A. Herd-level interpretation of test results for epidemiologic studies of animal diseases. **Preventive Veterinary Medicine**, v.45, p.83-106, 2000.

COBERLLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.F.E.; GONDIM, L.F.P.; WALD, V. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.103, n.3, p.195-201, 2002.

COLE, R.A.; LINDSAY, D.S.; BLAGBUM, B.L.; DUBEY, J.P. Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. **American Society of Parasitologists**, v.816. p. 730-732, 1995.

DALIMI A, ABDOLI A. *Toxoplasma gondii* and Male Reproduction Impairment: A new aspect of Toxoplasmosis Research, Jundishapur **Journal Microbiology**. 6(8):e7184, 2013.

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

DAVISON, H. C; GUY, J. W; MCGARRY, F; GUY, F; WILLIAMS, D. J. L; KELLY, D. F; TREES, A. J; Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. **Research Veterinary Science**, v. 70, p. 163-168. 2001.

DEHKORDI, F.S. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in raw caprine, ovine, buffalo, bovine and camel milk using cell cultivation, cat bioassay, capture ELISA, and PCR 65 methods in Iran. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, p. 120-125, 2013.

DIAS, F.C; SAMARA, S.I. Detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina no soro sanguíneo, no leite individual e no leite de conjunto em tanque de expansão de rebanhos não vacinados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.**, v.40, p.161-168, 2003.

DIJKSTRA, T.; EYSKER, M.; SCHARES, G.; CONRATHS, F.J.; WOUDA, W.; BARKEMA, H.W. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v.8, p.747-752, 2001.

DUBEY J.P. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in caprine livers and public health significance of toxoplasmosis in goats. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 177:1203-1207 , 1980.

DUBEY J.P.; BARR B.C; BARTA J.R., BJERKAS I.; BJORKMAN C.; BLAGBURN B.L.; BOWMAN D.D.; BUXTON D.; ELLIS J.T.; GOTTSTEIN B.; HEMPHILL A.; HILL D.E.; HOWE D.J.; JENKINS M.C.; KOBAYASHI Y.; KOUDELA B.; MARSH A.E.; MATTSSON J.G.; MCALLISTER M.M.; MODRY D.; OMATA Y.; SIBLEY L.D.; SPEER C.A.; TREES A.J.; UGGLA A.; UPTON S.J.; WILLIAMS D.J.; LINDSAY D.S.; Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 929-946, 2002.

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

DUBEY, J. P. *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis* and other cystforming coccidia of humans and animals In: KREIER, J. P. **Parasitic protozoa. New York: Academic Press**, p-1-158, 1993.

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

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

DUBEY, J.P. Advances in the cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.267-299, 1998.

DUBEY, J.P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Veterinary Parasitology**, v. 64, p.65-70, 1996.

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

DUBEY, J.P.; SHARMA, S.P. Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 5, p.794–795, 1980.

FERRE, I.; ADURIZ, G.; DEL-POZO, I.; REGIDOR-CERRILHO, J.; ATXAERANDIO, R.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; HURTADO, A.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L.M. Detection of *Neospora caninum* in the sêmen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, v.63, p. 1504-1518, 2005.

FIGUEIREDO J.F., SILVA D.A.O., CABRAL D.D. & MINEO J.R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in goats by the indirect haemagglutination, immunofluorescence and immunoenzymatic tests in the region of Uberlândia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 96:687-692, 2001.

FILHO, J.R.E.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R.; MYASAKA, D.; CASTAGNOLLI, K.; COSTA, A.J. Toxoplasmose experimental em coelhas gestantes. **Seminário: Ciências Agrárias**, v. 22, n.1, p. 3-10, 2001.

GONDIM, L. F. P.; McALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (*Canis Latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n.02; p. 159-16. 2004.

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

GONZÁLEZ-WARLETA, M; CASTR-HERMIDA, J.A; CARRO-CORRAL, C; MEZO, M. Anti-*Neospora caninum* antibodies in milk in relation to production losses in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v.101, p.58-64, 2011.

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

GUY, C.S; WILLIAMS, D.J.L; KELLY, D.F; MCGARRY, J; GUY, W; BJORKMAN, C; SMITH, R.F; TREES, A.J. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. **Veterinary Records**, v.149, p.443-453, 2001.

HARIDY, F.M. et al. Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in working donkeys and donkey's milk in Greater Cairo, **Egypt**. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v.40, p.459-464, 2010.

HORNOK, S.; EDELHOFER, R.; FOK, É.; BERTA, K.; FEJES, P.; RÉPÁSI, A.; FARKAS, R. Canine neosporosis in Hungary: Screening for seroconversion of household, herding and stray dogs. **Veterinary Parasitology**, v.137, P. 197-201, 2006.

HUANG, C. C.; YANG, C .H.; WATANABE, Y.; LIAO, Y. K.; OOI, H. K. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). **Veterinary Research**, v.35, p. 283-290. 2004.

HUMPHRY, R.W; BRULISAUER, F; MCKENDRICK, I.J; NETTETON, P.F; GUNN, G.J. Prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and associated risk factors in Scottish dairy herds. **Veterinary Record**, v.3, 2012.

HURKOVA L., MODRY D. PCR detection of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in brains of wild carnivores. **Veterinary Parasitology**;137:150–154, 2006.

JENKINS, M; BASZLER, T; BJORKMAN, C.; CHARES, G; WILLIAMS, D. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **International Journal Parasitology**, v.32, p.631-636, 2002.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). **Journal Parasitology**, v.76, p.410-413, 1990.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; McALLISTER, M.M. *Neospora caninum* and the potential for parasite transmission. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.21, n.4, p.317-321, 1999.

LOBATO, J.; SILVA, D.A.O.; MINEO, W.P. et al. Detection of Immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. **Clin. Vaccine Immunol.**, v.13, p.84-89, 2006.

LOCATELLI-DITTRICH, R. **Diagnóstico sorológico, isolamento, cultivo e caracterização molecular de *Neospora caninum* em bovinos leiteiros e em equinos no estado do Paraná, Brasil.** 184 p. Tese Doutorado em Processos Biotecnológicos, Agroindústria, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

LOCATELLI-DITTRICH, R., RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; PINCKNEY, R.D.; SOUSA, R.S.; LEITE, L.C.; THOMAZ-SOCCOL, V. Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Paraná, southern Brazil. **The Veterinary Record**, v.153, n. 12, p.366-367, 2003.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V.T.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; VINNE, R.; PINCKNEY, R.D. Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in Southern Brazil. **The Journal of Parasitology**, v. 87, n. 6, p. 1493-1494, 2001.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; VINNE, R.V.D.; PINCKNEY, R.D. Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 3, p. 103-109, 2004.

LOCATELLI-DITTRICH, R; DITTRICH, J.R; TICHARTZ, R.R.T.B; GASINO-JOINEAU, M.E; ANTUNES, J; PINCKNEY, R.D; DECONTO, I; HOFFMANN, D.C.S; THOMAZ-SOCCOL, V. Investigation of *Neospora sp.* and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Parana State, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.135, p.215-221, 2006.

LOPES, W.D.Z.; COSTA, A.J.; SANTANA, L.F.; SANTOS, R.S.; ROSSANESE, W.M.; LOPES, W.C.Z.; COSTA, G.H.N.; SAKAMOTO, C.A.; SANTOS, T.R. Aspects of *Toxoplasma* Infection on the Reproductive System of Experimentally Infected Rams (*Ovis Aries*). **Journal of Parasitology Research**, article ID 602803, 2009.

LUFT, B.J.; REMINGTON, J.S. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. **Clinical Infection Disease**, 15, 211-22, 1992.

MACEDO M.F.S.B, MACEDO C.A.B, EWALD M.P.C, MARTINS G.F, ZULPO D.L, CUNHA I.A.L,. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from pregnant dairy cows (*Bos taurus*) slaughtered. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária** , 21(1): 74-77, 2012.

MALEY, S.W; BUXTON, D; THOMPSON, K; SCHRIEFER, CH, INNES, E.A. Serological analysis of calves experimentally infected with *Neospora caninum*: a 1 year study. **Veterinary Parasitology**, v.96, p.1-9, 2001.

MANCIANTI, F. et al. Seroprevalence, Detection of DNA in Blood and Milk, and Genotyping of *Toxoplasma gondii* in a Goat Population in Italy. **BioMed Research International**, v.1, p.1- 6, 2013.

MANCIANTI, F.; NARDONI S, PAPINI R, MUGNAINI L, MARTINI M, ALTOMONTE I, SALARI F, D'ASCENZI C, DUBEY JP. Detection and

genotyping of *Toxoplasma gondii* DNA in the blood and milk of naturally infected donkeys (*Equus asinus*). **Parasit Vectors**. 4 3;7:165, 2014.

MARSH, A. E.; BARR, B. C.; PACKHAM, A. E.; CONRAD, P. A. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **The Journal of Parasitology**, v. 84, p. 530-535. 1998.

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

MCALLISTER, M.M.;BJORKMAN, C.; ANDERSON-SPRECHER, R.; ROGERS, D.G. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 217, p. 881-887, 2000.

MILNE, E; CRAWSHAW, M; BROCKLEHURSTS, S; WRIGHT, S; MALEY, S; INNES, E. Associations between *Neospora caninum* specific antibodies in serum and milk in two dairy herds in Scotland. **Preventive Veterinary Medicine**, v.77, p.31-47, 2006.

MORAES E.P.B.X., BATISTA A.M., FARIA E.B., FREIRE R.L., FREITAS A.C., SILVA M.A.R., BRAGA V.A. & MOTA R.A. Experimental infection by *Toxoplasma gondii* using contaminated semen containing different doses of tachyzoites in sheep. **Veterinary Parasitology**. 170:318-322, 2010.

MOSKWA, B.; PASTUSIAK, K.; BIEN, J.; CABAJ, W. The first detection of *Neospora caninum* DNA in colostrum of infected cows. **Research Parasitology**, v. 100, p. 633-636, 2007.

MOSKWA, B.; PASTUSIAK, K.; BIEN, J.; CABAJ, W. The first detection of *Neospora caninum* DNA in colostrum of infected cows. **Research Parasitology**, v. 100, p. 633-636, 2007.

MOSKWA, B; CABAJ, W; PASTUSIAK, K; BIÉN, J. The suitability of milk in detection of *Neospora caninum* infection in cows. **Acta Parasitology**, v.48, p.138-141, 2003.

MOURA, A.B. et al. *Toxoplasma gondii* no sêmen de suínos experimentalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, p.430-434, 2007.

MULLIS KB, FALOONA FA. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.**;155:335–350, 1987.

NIELSEN, S.S. et al. Bulk tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v.44, p.1-7, 2000.

OGAWA, L. et al. Ocorrência de anticorpos anti *Toxoplasma gondii* em ovinos da região de Londrina no Estado do Paraná. **Seminário: Ciências Agrárias**. v. 24, p.57-62, 2003.

OGAWA, L.; NAVARRO, I.T.; VIDOTO, O.; FREIRE, R.L.; GONDIM, L.F.P.; MARANA, E.R.M.; SILVA, E.H.; SEDEMAKA, T.M.; DAMAS, A.C.; MATTOS, M.R.; PRUDENCIO, L.B.; TSUTSUI, V.S.; SANTOS, A.P.M. Avaliação sorológica do *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em bovinos de leite da região do norte do Paraná. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11, 1999, Salvador, Anais...Salvador: **Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, 1999. P.225.

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

ORTEGA-MORA, L.M; FERRE, I.; DEL-POZO, I.; CAETANO-DA-SILVA, A.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ADURIZ, G. Detection of *Neospora caninum* in sêmen of bulls. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 301-308, 2003.

OSSANI, R.U. Frequency of antibodies against *Toxoplasma gondii* in sheep herds with milk aptitude and detection of the agent in milk samples from west

mesoregion of Santa catarina. 2014. 90 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade do Estado de Santa Catarina**, Lages, 2014.

PETERS, M., LUTKEFELS, E.; HECKEROTH, A. R.; SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **International Journal Parasitology**, v. 31; p. 1144-1148. 2001.

PETERSEN, E; LEBECH, M; JENSEN, L; LIND, P; RASK, M; BAGGER, P; BJORKMAN, C; UGGLA, A. *Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans. **Emergency Infective Disease**, v.5, p.278-281, 1999.

PITUCO, E.M; OKUDA, L.H; FAVA, C.D; STEFANO, E; SHIMOZONO, O.S; CAMARGO, N.T.C; GALETTI, M.C.T; OLIVEIRA, L.H. Pesquisa de *Neospora caninum* em sêmen de touros de Centrais de Inseminação Artificial do Brasil. Anais – I Fórum Brasileiro de estudos sobre *Neospora caninum*, **Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, USP, 2005.

PRITCHARD, G. Milk antibody testing in cattle. **In practice**, v.23, p.542-549, 2001.

RAGAZO, A.M.A. et al. Isolation of *Toxoplasma gondii* from goats from brazil. **Journal Parasitology**, v.95, p. 323-326, 2009.

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

REMYNTOON, J.S. et al. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.941-945, 2001.

RIEMANN, H.P., MEYER, M.E., THEIS, J.H, KELSO, G. BEHYMER, D.E. Toxoplasmosis in na infant fed unpasteurized goat milk. **Journal of Pediatrics**, 87, 573-6.

RODRIGUES, A. A. R., GENNARI, S. M., AGUIAR, D. M., SREEKUMAR, C., HILL, D. E., MISKA, K. B., VIANNA, M. C. B., DUBEY, J. P. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 124; p. 139-150. 2004.

SACKS J.J., Roberto R.R. & Brooks N.F. 1982. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. **J. Am. Med. Assoc.** 248:1728-1732.

SAGER, H., GLOOR, M., BJORKMAN, C., KRITZNER, S., GOTTSTEIN, B. Assessment of antibody avidity in aborting cattle by a somatic *Neospora caninum* tachyzoite antigen IgG avidity ELISA. **Veterinary Parasitology**, v. 112, p. 1–10, 2003.

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

SAWADA, M.; KONDO, H.; TOMIOKA, Y.; PARK, C. H.; MORITA, T.; SHIMADA, A.; UMEMURA, T. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.90, n.3, p.247-252, 2000.

SCARPELLI, L.C.; LOPES, W.D.Z.; MIGANI, M.; BRESCIANI, K.D.S.; COSTA, A.J. *Toxoplasma gondii* in experimentally infected *Bos taurus* and *Bos indicus* semen and tissues. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 59–64, 2009.

SCHARES, G; BARWALD, A; STAUBACH, C; WURM, R; RAUSER, M; CONRATHS, F.J; SCHOEDER, C. Adaptation of a commercial ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. **Veterinary Parasitology**, v.120, p.55-63, 2004.

SERRANO-MARTINEZ, E; FERRE, I; OSORO, K; ADURIZ, G; MOTA, R.A; MARTINEZ, A; DEL-POZO, I; HIDALGO, C.O; ORTEGA-MORA, L.M.

Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated sêmen with different numbers of tachyzoites. **Theriogenology**, v.67, p.729-737, 2007.

SHARES, G.; BARWALD, A.; STAUBACH, C.; SONDGEN, P.; RAUSER, M.; SCHRODER, M.; PETERS, M.; WURM, R.; SELHORST, T.; CONRATHS, F.J. p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **Veterinary Parasitology**, v.106, p.293-305, 2002.

SHARIFZADEH, A.; DOOSTI, A.; DEHKORDI, P.G.; PCR Assay for Detection of *Neospora Caninum* in Fresh and Frozen Semen Specimens of Iranian Bulls. **World Applied Sciences Journal**, v. 17, n. 6, p. 742-749, 2012.

SILVA, C.A. Diagnóstico da neosporose bovina. In: **XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e I Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses**, Ouro Preto, MG, 2004.

SILVA, D.A.O.; VITALIANO, S.N.; MINEO, T.W.P.; FERREIRA, R.A.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J.R. Evaluation of homologous, heterologous, and affinity conjugates from the serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). **Journal Parasitology**, v. 91, p. 1212-1216, 2005.

SKINNER, L.J. et al. Simultaneous diagnosis of toxoplasmosis in goats and goatowner's family. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, p.359-361, 1990.

SPENCE, J.B.; BEATTIE, J.; FAULKNER, L.; WATSON, W.A. *Toxoplasma gondii* in the semen of rams. **Veterinary Record**, v. 102, p. 38-39, 1978.

STENLUND,S; KINDAHL, H; MAGNUSSON, U. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 85, p.227-234, 1999.

SUÁREZ-HERNÁNDEZ, M. et al. Infección y enfermedad por *Toxoplasma gondii* en animales y humanos en 23 años de observación en la provincia de Ciego de Ávila, Cuba. **Revista Biomédica**, v. 16, p. 21- 27, 2005.

TABATABAEIZADEH, E; TABAR, G.H; FARZANEH, N. Prevalence of *Lepstospira hardjo* antibody in bulk tank milk in some dairy herds in Mashhad Suburb. **African Journal Microbiology**, v.33, 2011.

TAVASSOLI, M. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in Sheep and Goat Milk in Northwest of Iran by PCR-RFLP. **Jundishapur Journal Microbiology**, v. 6, p. 1-4, 2013.

TEALE, A.J.; BLEWETT, D.A.; MILLER, J.K.; BUXTON, D. Experimentally induced toxoplasmosis in young rams: The clinical syndrome and semen secretion of toxoplasma. **Veterinary Record**, v. 17, p. 53-55, 1982.

THURMOND, M.; HIETALA, S.K. Strategies to control *Neospora* infection in cattle. **Bovine Practice**, v.29, p.60-63, 1995.

THURMOND, M.C.; and HIETALA, S.K. Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first lactation dairy cows. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.210, p. 672-674, 1997.

TIWARI, A; VANLEEUEWENN, J.A; DOHOO, I.R; KEEFE, G.P, HADDAD; J.P; TREMBLAY, R. Production effects of pathogens causing bovine leucosis, bovine viral diarrhoea, paratuberculosis and neosporosis. **Journal Dairy Science**, v. 90, p.659-669, 2007.

TREES, A. J.; DAVIDSON, H. C.; INNES, E. A.; WADTLING, J. M. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International Journal Parasitology**, v. 29, p. 1195-1200. 1999.

TREES, A.J.; MCALLISTER, M.M.; GUY, C.S.; MCGARRY, J.W.; SMITH, R.F.; WILLIAMS, D.J.L. *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 147-154, 2002.

UGGLA, A; STENLUND, O. J. M; HOLMDAHL, E. B; JAKUBEK, P; THEBO, H. KINDAHL; BJORKAN, C. Oral *Neospora Caninum* inoculation of neonatal calves. **Interest Journal Parasitology**, v.28, p. 1467-1472. 1998.

VARCASIA A, LIGHTOWLERS MW, CATTOLI G, CANCEDDA GM, CANU S, GARIPPA G,. Genetic variation within *Taenia multiceps* in Sardinia, Western Mediterranean (Italy). **Research Parasitology**; 99(5): 622-626, 2006.

VITOR, R.W.A. et al. Eliminação de *Toxoplasma gondii* através de urina, saliva e leite de caprinos experimentalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.43, p.147-154, 1991.

WAAP, H.; ANGELO, H.; VILARES, A.; CORTES, H.; MEIRELES, J.; LEITÃO, A. Isolamento de *Toxoplasma gondii* a partir de cérebro e músculo de gatos sorologicamente positivos utilizando culturas celulares. **V Congresso Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias**, pôster 98, p. 217, 2011.

WANHA, K.; EDELHOFER, R.; GABLER-EDUARDO, C.; PROSL, H. Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs and foxes in Austria. **Veterinary Parasitology**, v.128, p. 189-193, 2005.

WOUDA, W.; DIJKSTRA, Th.; KRAMER, A.M.H.; VAN MAANEN, C.; BRINKHOF, J.M.A. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1677-1682, 1999.