

Gustavo Fontes Paz

T 636.089 26

P 348a

2005



**ASSOCIAÇÃO ENTRE SOROLOGIA PARA *Neospora canium* E TAXA DE
PRENHEZ EM VACAS RECEPTORAS DE EMBRIÕES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador : Prof. Maurílio Andrade Rocha

**Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2005**

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA

05/04/06

859006-11

403482

P348a Paz, Gustavo Fontes. 1976-

Associação entre sorologia para *Neospora caninum* e taxa de
prenhez em vacas receptoras de embrião / Gustavo Fontes Paz.
-2005.

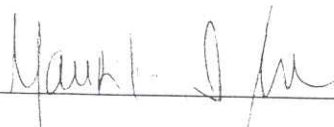
26 p. : il.

Orientador: Maurílio Andrade Rocha
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

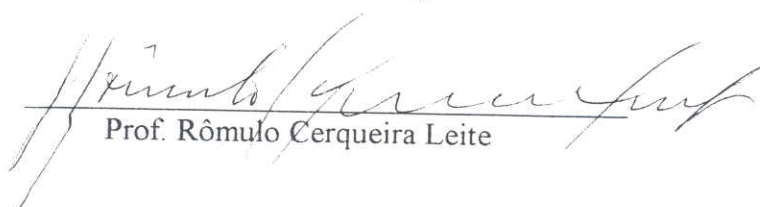
1. Bovino – Reprodução – Teses. 2. Bovino – Doenças – Teses.
3. Transferência de embriões – Teses. 4. Sorologia veterinária -
Teses. 5. Neosporose em bovino – Teses. I. Rocha, Maurílio
Andrade. II. Universidade Federal de Minas
Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.208 926

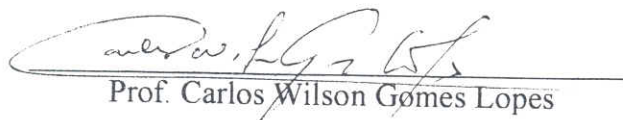
Dissertação defendida e aprovada em 31 de março de 2005 pela comissão
examinadora constituída por:



Prof. Maurilio Andrade Rocha
Orientador



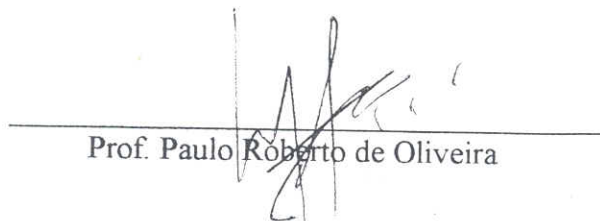
Prof. Rômulo Cerqueira Leite



Prof. Carlos Wilson Gomes Lopes



Prof. Edel Figueiredo Barbosa-Stancioli



Prof. Paulo Roberto de Oliveira



AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença constante.

A Nanda pela paciência e pelo amor, principalmente nos momentos de angústia e insegurança.

Aos professores Rômulo Cerqueira Leite, Maurílio Andrade Rocha e Romário Cerqueira Leite pelas sugestões e contribuições fundamentais para a minha formação.

A meus pais, pelos cuidados e carinho.

Ao Wagner, pelas orientações e conselhos que me ajudaram a descobrir a importância da honestidade e da dedicação na realização profissional.

Ao Marcos César e família pelos momentos de descanso e aconchego em Pará de Minas.

Aos amigos por serem a família que pude escolher.

Aos Médicos Veterinários Bruno Marques Teixeira, Fabiano Fiúza Rangel e Juliano Cezar Minardi pelos vários trabalhos publicados na "Lembrança".

Ao João Carlos pela polêmica.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva em especial a Angela e Nádia, pela colaboração na execução desse trabalho.

Às funcionárias do Colegiado de Pós – Graduação pela atenção.

Ao CENATTE/EMBRIÕES pela estrutura e parceria desenvolvida durante o período experimental.

“Se é certo ou errado só o futuro dirá”

Rubem Alves

SUMÁRIO

		Pág.
	RESUMO.....	09
1.	INTRODUÇÃO	10
2.	BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	11
2.1	O Agente.....	11
2.2	Neosporose Bovina.....	12
2.3	Transmissão	13
2.4	Métodos de Diagnóstico.....	13
2.5	Medidas de Controle.....	14
3.	MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1	Local do Experimento.....	15
3.2	Estudo da Prevalência de Anticorpos anti - <i>N. caninum</i>	15
3.3	Avaliação da Taxa de Prenhez em Receptoras Soropositivas para o <i>N. caninum</i> no Programa de Transferência de Embrião.....	15
3.4	Estudo da Taxa de Soroconversão de <i>N. caninum</i> em Novilhas Soronegativas Mantidas em Sistema Extensivo.....	16
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5.	CONCLUSÕES	20
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
LISTA DE TABELAS		
Tabela 1.	Soroconversão de 6,3% (4 novilhas que soroconverteram em 63 animais acompanhados) com coletas realizadas na triagem, transferência de embrião (TE) e diagnóstico de gestação (DG) baseado na percentagem de inibição ($\geq 30\%$).....	20
LISTA DE FIGURAS		
Figura 1.	Prevalência de anticorpos anti - <i>N. caninum</i> em um rebanho de receptoras de embrião bovino no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil.	19
Figura 2.	Comparação entre a taxa de prenhez de receptoras de embrião soropositivas e soronegativas para o <i>N. caninum</i>	19
ANEXOS		
Anexo1.	Densidade óptica (OD) e percentagem (%) de inibição de novilhas soronegativas detectadas pelo teste de ELISA, onde % de Inibição = $100 - [(OD \text{ da amostra} \times 100) / (\text{média da OD dos controles negativos})]$	24
Anexo 2.	Densidade óptica (OD) e percentagem (%) de inibição de novilhas soropositivas detectadas pelo teste de ELISA, onde % de Inibição = $100 - [(OD \text{ da amostra} \times 100) / (\text{média da OD dos controles negativos})]$	26

RESUMO

Foram realizados estudos para avaliar a possível interferência de *Neospora caninum* em programas de transferência de embrião bovino no que se refere à taxa de prenhez de receptoras transferidas por apenas um serviço. Buscou-se também determinar a prevalência de anticorpos anti - *N. caninum* em um rebanho de receptoras criadas em regime extensivo no estado do Mato Grosso do Sul, assim como a taxa de soroconversão de *N. caninum* nesse mesmo rebanho. Foi estudado um rebanho homogêneo de 275 novilhas de 14 a 20 meses, ½ sangue Nelore e Simental, paridas e criadas em uma mesma propriedade, as quais foram utilizadas como receptoras de embriões provenientes de vacas Nelore puras de origem. Para a detecção de anticorpos anti - *N. caninum* foi utilizado um Kit de ELISA competitivo monoclonal. Foram soropositivos para *N. caninum* 29,5% (81 novilhas) dos animais testados. As novilhas foram então divididas em dois grupos de 33 animais, sendo um grupo soropositivo e o outro soronegativo para o *N. caninum* (grupo controle). Os dois grupos permaneceram juntos durante todo o experimento em uma mesma condição de manejo. As receptoras soronegativas foram acompanhadas por sorologia até o diagnóstico de gestação. O grupo de receptoras soropositivas apresentou uma taxa de prenhez de 72,7% e o grupo soronegativo (grupo controle) de 81,8%. Não houve diferença significativa entre os dois grupos ($\chi^2 = 0,345$, onde $p = 0,5569$). Dos 63 animais soronegativos acompanhados por sorologia, um soroconverteu para *N. caninum* segundo exame realizado em soro coletado no dia da transferência de embrião. Três outros soroconverteram segundo exame realizado em soro coletado no dia do diagnóstico de gestação. Todas as novilhas que soroconverteram tiveram a prenhez confirmada. Esses resultados demonstram a alta prevalência desse agente em um rebanho de novilhas a serem utilizadas como receptoras de embrião bovino. Verificou-se também uma baixa taxa de soroconversão do *N. caninum* para bovinos criados em sistema extensivo (6,3%) e que a taxa de prenhez das receptoras de embrião foi independente da infecção por *N. caninum*.

Palavras-Chave: *Neospora caninum*, transferência de embrião, bovino, eficiência reprodutiva

ABSTRACT

Were made studies to investigate the possible interference of *Neospora Caninum* in programs of bovine embryo transfer in relation at pregnancy tax of receptive transferred for only service. Researched also determine the prevalence of *N. Caninum* antibodies in the herd of receptive created in the extend regime in Mato Grosso do Sul state, as like the tax of serum conversion of *N. Caninum* in this same herd. Was studied a homogenous herd with 275 young cow from 14 to 20 months, ½ Nelore blood and Simental, whelped and created in the same propriety, and they were used as receptive of embryo come from Nelore cow with origin pure. To the detection of *N. caninum* antibodies was used a monoclonal antibody (Mab) – based competitive – inhibition enzyme – linked immunosorbent assay (cELISA). Was positive serum to *N. caninum* 29.5% (81 young cow) from tested animals. The young cow were divided in two groups of 33 animals, which one group was positive serum and the other negative serum to *N. caninum* (control group). The groups stayed together during all experiment in the same condition of management. The negative serum receptive was escorting by serology until the of pregnancy diagnosis. The group of positive receptive showed a tax of pregnancy of 72.7% and the group negative serum (control group) of 81.8%. There was not significant difference between the two groups ($\chi^2 = 0.345$, which $p = 0.5569$). From 63 negative serum animals escorted by serology, one serum converted to *N. caninum* according to exam made collected serum on the day of transference of embryo. Three other serum converted according to exam made in collected serum on the day of pregnancy diagnosis. All young cow that serum converted had the confirmation of pregnancy. These results demonstrate the high prevalence of this agent into the herd of young cow used as receptive of bovine embryo. Was verified also a small tax of serum conversion from *N. caninum* to bovine created in a extend system (6.3%) and that the tax of pregnancy of receptive of embryo was independent from infection by *N. caninum*.

Key words: *Neospora caninum*, embryo transfer, bovine, reproduction efficient.

1- INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira é um dos setores da economia nacional com maior perspectiva de crescimento, devido às características climáticas e geográficas do nosso País. Localizado na região dos trópicos e com grande extensão territorial, o Brasil é contemplado com uma vasta malha de rios e com uma posição geográfica favorável à pecuária extensiva. Estes fatores contribuem para a produção de carne e leite bovino, matérias primas de excelente fonte protéica, de forma competitiva em relação a mercados exteriores.

A fim de se tornarem competitivos no mercado externo, países produtores de bovinos adotam, cada um a seu modo, políticas de subsídios para os produtores e investimentos em biotecnologia.

Dentre essas biotecnologias destaca-se a transferência de embrião (TE) que foi difundida no Brasil a partir da década de 80, com a criação, em 1985, da Sociedade Brasileira de Transferência de Embrião, atualmente denominada de Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE). O objetivo ao se utilizar a TE é o aproveitamento ao máximo da genética de animais superiores que se destacam na produção, aumentando a pressão de seleção e atingindo de forma mais rápida a característica ou o índice desejável na propriedade.

No entanto, as doenças da reprodução que afetam as doadoras e principalmente as receptoras de embrião são problemas que devem ser contornados para que índices favoráveis à rentabilidade do negócio sejam alcançados. Dentre essas doenças, destacam-se as de origem infecciosas causadas por diversos microorganismos como vírus, bactérias e protozoários.

O protozoário denominado *Neospora caninum* amplamente distribuído no mundo, tem sido o motivo de muitas dúvidas e indagações entre pesquisadores e pecuaristas brasileiros em relação aos prejuízos reprodutivos que esse agente

pode vir a causar em sistemas extensivos de criação de bovinos.

O impacto econômico causado pela neosporose, gerado por abortamentos e custos indiretos, está estimado em 35 milhões de dólares por ano no Estado da Califórnia - EUA. Na Austrália, a estimativa encontra-se em torno de 85 milhões para a indústria leiteira e 25 milhões de dólares para a produção de carne, por ano. Em programas de transferência de embrião bovino não se conhece o impacto de *N. caninum* nos índices reprodutivos das receptoras de embrião, principalmente relacionados à reabsorção embrionária e aborto no início da gestação. O uso intensivo de receptoras sem um teste sorológico para *N. caninum* representa um potencial risco biológico para introduzir o agente em rebanhos livres de infecção ou aumentar a prevalência desse agente em rebanhos com baixa prevalência, uma vez que a principal forma de transmissão para os bovinos tem sido a vertical com uma eficiência de até 95%. Não há trabalhos que demonstrem a prevalência de anticorpos anti - *N. caninum* em receptoras de embrião criadas em regime extensivo.

A taxa de soroconversão tem sido demonstrada como baixa em sistemas de criação de bovinos *Bos taurus* em alguns países do mundo, sendo de pouca importância no aumento da incidência da Neosporose bovina e no caso de animais jovens, tem sido utilizada como um parâmetro para estimar a eficiência da transmissão horizontal. Até o momento não se conhece a importância dessa taxa em sistemas de criação de bovinos *Bos indicus* a pasto, encontrados em cerca de 80% das propriedades brasileiras.

A realização desse estudo teve como objetivos: estudar a prevalência de anticorpos anti *N. caninum* em um rebanho de novilhas receptoras de embrião criadas em sistema extensivo no estado do Mato Grosso do Sul; avaliar a taxa de prenhez em receptoras soropositivas para *N. caninum* transferidas por apenas um serviço e avaliar a taxa de soroconversão do *N. caninum* em

um sistema de criação extensivo de gado de corte.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - O Agente

A espécie *N. caninum*, pertence ao Filo Apicomplexa, Família Sarcocystidae. Foi identificada pela primeira vez nos EUA, em cães (*Canis familiares*) com sintomas neurológicos (Dubey et al., 1988). O cão foi considerado o primeiro hospedeiro definitivo deste parasito por Mcallister (1998).

Recentemente observou-se que os coiotes (*Canis latrans*) também eliminam oocistos pelas fezes (Gondim et al., 2004) sendo os primeiros canídeos selvagens confirmados como hospedeiros definitivos do agente.

Os três estágios morfológicos reconhecidos do parasito são representados por taquizoítos, os bradizoítos contidos nos cistos tissulares, ambos encontrados nos hospedeiros intermediários e definitivos e os esporozoítos presentes no interior dos oocistos esporulados eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo.

Os taquizoítos são ovóides, em forma de lua crescente ou globular e medem aproximadamente 3 a 7 por 1 a 5 micrômetros, dependendo do estágio de divisão (Dubey e Lindsay, 1993). Os taquizoítos de *N. caninum* são idênticos aos do *Toxoplasma gondii* quando analisados sob microscopia óptica, mas podem ser distinguidos utilizando-se microscópio de transmissão de elétrons baseado no aspecto das roptrias (Dubey et al., 1988; Lindsay et al., 1993). As roptrias presentes nos taquizoítos de *N. caninum* são eletrondensos, enquanto as encontradas nos taquizoítos de *T. gondii* apresentam um aspecto de favo de mel.

Em animais infectados, os taquizoítos podem ser encontrados em muitas células incluindo as nervosas, macrófagos, fibroblastos, célula endotelial vascular, miócitos, células epiteliais tubulares renais e hepatócitos (Dubey et al., 1988; Dubey e

Lindsay, 1993). Os taquizoítos penetram na célula hospedeira por invasão ativa e podem tornar-se intracelulares após cinco minutos de contato (Hemphill et al., 1996) sendo usualmente localizados no citoplasma da célula no interior de vacúolos parasitóforos. Uma única célula hospedeira infectada pode conter até 100 taquizoítos.

Os cistos tissulares são muitas vezes de formato redondo a oval, acima de 107 micrômetros de comprimento e quase exclusivamente observados em tecidos nervosos como cérebro, medula espinhal, nervos e retina (Dubey et al., 1988; Dubey et al., 1990). A parede do cisto tissular é lisa e mede de 1 a 4 micrômetros de espessura e, provavelmente, essa variação seja dependente do tempo em que a infecção se faz presente. A maior parte dos cistos tissulares apresentam a parede medindo de 1 a 2 micrômetros de espessura (Bjerkas e Dubey, 1991; Jardine, 1996; Speer et al., 1999). Os cistos tissulares contêm os bradizoítos no seu interior, os quais são delgados e se dividem lentamente representando o estágio latente da infecção. Medem de 6 a 8 micrômetros e o núcleo, nestas formas, possui localização de terminal a subterminal (Dubey e Lindsay, 1993).

Cistos tissulares desenvolvidos de *N. caninum* podem ser distinguidos dos de *T. gondii* através de microscopia óptica (Dubey et al., 1988). A grande maioria dos cistos do *N. caninum* ocorre em tecidos nervosos e a parede do cisto tissular mede aproximadamente 4 micrômetros de espessura, enquanto cistos tissulares de *T. gondii* podem ser encontrados em vários órgãos e a parede mede sempre menos que 1 micrômetro de espessura (Dubey e Lindsay, 1996).

Muito pouco se conhece a respeito das estruturas ou localização dos estágios enteroepiteliais endógenos que promovem a produção e excreção dos oocistos de *N. caninum* nas fezes dos hospedeiros definitivos. Sabe-se que o período pré-patente é de 5 a 8 dias após a ingestão de cistos teciduais (Lindsay e Dubey, 2000).

Os oocistos são esféricos e medem 10 a 11 micrômetros de diâmetro sendo excretados na forma não esporulada contendo um esporocisto central. Tornam-se esporulados entre 24 e 72 horas, à temperatura ambiente (Lindsay et al., 1999). Os oocistos esporulados contêm dois esporocistos cada um com quatro esporozoítos, sendo morfológicamente similares aos oocistos de *Hammondia heydorni* encontrados nas fezes de cães e *T. gondii* e *H. hammondi* nas fezes dos gatos (McCallister et al., 1998; Lindsay et al., 1999).

2.2 - Neosporose Bovina

O bovino é um dos principais hospedeiros intermediários podendo apresentar sintomatologia reprodutiva caracterizada principalmente por aborto, natimortos, mortalidade neonatal, morte fetal precoce e reabsorção embrionária (Trees et al., 1999).

As taxas de prevalência de anticorpos anti - *N. caninum* em bovinos variaram de 7,6 a 30,13% nas diferentes regiões brasileiras, sendo de 30% em Pernambuco, entre 10,9 e 14,09% na Bahia, 7,7 a 8% no Mato Grosso do Sul, 7,7% em Minas Gerais, 7,6 a 30,13% em São Paulo, 11,69% no Paraná e 23,8% no Rio de Janeiro (Almeida, 2004). Em um outro levantamento realizado por Ragozo et al. (2003) sobre a ocorrência de anticorpos anti - *N. caninum* em soros bovinos de seis estados brasileiros, documentou - se a soropositividade de 23,6%, com aumento desse índice nos bovinos com idade superior a 24 meses. Dentre os estados estudados, o Rio de Janeiro apresentou a menor percentagem de animais reagentes (14,7%) e Minas Gerais a maior (29,0%). Com relação à aptidão animal, observou - se maior ocorrência em bovinos de leiteiros (26,2%) quando comparados com os de corte (19,1%). Os Estados do Paraná, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul apresentaram os maiores valores de ocorrência nos bovinos de corte e Minas Gerais nos de leite.

Bovinos infectados com o *N. caninum* apresentam três vezes mais chances de abortar do que animais negativos (Moen et

al., 1998). A maioria dos abortos causados por *N. caninum* é notificado por volta dos 4 a 6 meses de gestação. Abortos antes dos 4 meses de gestação assim como a reabsorção embrionária não são percebidos em muitos rebanhos ou são classificados genericamente como problemas reprodutivos/alta incidência de retorno ao cio (Williams et al., 2000). É provável que os fetos que foram infectados antes dos três meses de gestação sejam reabsorvidos e venham a causar problemas de fertilidade para as mães (Trees et al., 1999). Porém, trabalhos ainda não foram desenvolvidos para comprovar o real impacto de infecções naturais em vacas por *N. caninum* no início do período gestacional (Anderson et al., 2000). Em um recente estudo, monitorando a recrudescência espontânea em bovinos persistentemente infectados, observou - se que cinco vacas que tiveram um aumento do título de anticorpos depois do terço médio do período gestacional, pariram bezerros saudáveis, porém infectados com *N. caninum*, e uma vaca que teve um aumento do título no primeiro terço gestacional abortou. Esses achados sugerem que quanto mais no início do período gestacional ocorrer a parasitemia, mais severas podem ser as consequências para o feto (Innes et al., 2002). A recrudescência espontânea da infecção foi detectada durante a gestação em cinco de seis vacas com infecção persistente natural. Nos animais em que a recrudescência ocorreu no início da gestação, os fetos morreram. Quando esta ocorreu no estágio tardio da gestação os fetos nasceram saudáveis e positivos para o *N. caninum* (Williams et al., 2000).

Experimentalmente, com infecção às nove semanas pós concepção, ocorreu morte em cinco de seis fetos detectados por ultra-som, sendo que nenhum aborto foi registrado. A inoculação de taquizoítos em vacas com 10 semanas de gestação induziu morte fetal. Não houve evidência de infecção no feto de vacas infectadas antes da gestação assim como vacas infectadas em gestação avançada pariram bezerros assintomáticos soropositivos (Williams et al., 2000).

A patogenia desses problemas reprodutivos no início do período gestacional causado por *N. caninum*, estaria relacionada à imunidade materna do tipo celular caracterizada principalmente por interferon (IFN - γ), interleucinas (IL - 12, IL - 2) e fator de necrose tumoral (TFN - α) que são efetivos para a limitação da multiplicação de *N. caninum* e estão envolvidos em mecanismos de rejeição materno - fetal (Innes et al., 2002). O momento em que ocorre a parasitemia durante período gestacional, a eficiência do sistema imune materno e a capacidade do feto em desenvolver uma resposta imune efetiva contra a infecção por *N. caninum*, são fatores cruciais na determinação dos efeitos da infecção sobre o feto (Williams, et al., 2000).

2.3 - Transmissão

Os oocistos de *N. caninum* foram infectantes por via oral para bezerros inoculados com aproximadamente 104 a 105 oocistos. Os bezerros desenvolveram uma resposta imunológica entre duas a quatro semanas após a inoculação, demonstrando que a transmissão horizontal pode ocorrer via oocistos (De Marez et al., 1999). A inoculação de 600 oocistos esporulados em três vacas com dez semanas de prenhez induziu uma resposta de anticorpos anti-*N. caninum* três semanas após o desafio, porém não foram observados abortos nem transmissão vertical nos bezerros paridos, sugerindo que a infestação de oocistos necessária para induzir aborto deve exceder a dose de 600 oocistos (Trees et al., 2002).

Estudos sorológicos conduzidos em bovinos *Bos taurus jovers* demonstram uma baixa taxa de incidência de transmissão horizontal de *N. caninum*, variando de 4 a 10% (Thurmond e Hietala, 1997; Davison et al., 1999; Paré et al., 1997). A taxa de transmissão horizontal foi estudada em rebanhos de gado leiteiro da Inglaterra, baseando-se em soroconversão de novilhas monitoradas por ELISA, sendo esta de 3,8 % (Davison et al., 1999).

Poucos estudos sobre a importância da transmissão horizontal têm sido realizados, sendo que no Brasil, nenhum levantamento foi feito para quantificar esta taxa. Alguns autores relataram infecção horizontal pela ingestão de alimentos ou água contaminada com oocistos de *N. caninum* (McAllister et al., 1998; De Marez et al., 1999; Wouda et al., 1999; Dubey, 1999a; Anderson et al., 2000; Bergeron et al., 2000).

A transmissão vertical do *N. caninum* está bem estabelecida em bovinos, contribuindo significativamente para manutenção da infecção após sua introdução no rebanho (Schares et al., 1998). Esta forma de transmissão pode atingir uma eficiência de 81% (Pare et al., 1996) a 95% (Davison et al., 1999) em infecção natural. Os fetos que são infectados pela transmissão vertical nascem na maioria das vezes saudáveis, porém soropositivos. Os anticorpos oriundos dessa infecção persistem por um longo período, sendo o animal infectado por toda a sua vida (Barr et al., 1997).

Recentemente foi detectado DNA de *N. caninum* em sêmen congelado de touros infectados naturalmente, utilizando um ensaio de nested - PCR. Quarenta por cento dos touros investigados apresentaram pelo menos uma amostra de sêmen positiva. Das 180 amostras analisadas, 14 (7,8%) foram positivas. Em todas as amostras positivas foi detectado DNA na fração celular do sêmen e não no plasma seminal. Estes resultados sugerem que existe um potencial risco de transmissão de *N. caninum* pelo sêmen proveniente de touros infectados, principalmente em centrais de inseminação artificial e de transferência de embrião (Caetano da Silva et al., 2004).

2.4 - Métodos de diagnóstico

Os primeiros testes sorológicos e métodos de imunohistoquímica para o diagnóstico da neosporose foram desenvolvidos por Dubey et al. (1988).

Em situações fisiológicas adequadas, decorrentes de um bom manejo do gado, e, de acordo com o período gestacional, o *N.*

caninum atinge o feto por transmissão vertical sem lhe causar maiores danos. Os bezerros nascem saudáveis e soropositivos para *N. caninum* antes de mamarem o colostro. Alguns podem apresentar cistos no sistema nervoso central, os quais podem ser detectados por métodos de diagnóstico como o PCR e a Imunohistoquímica. No entanto, a utilização desses testes no diagnóstico de aborto em suspeitas de infecção pelo *N. caninum*, é inviável do ponto de vista prático (Paré et al., 1996).

O Isolamento de *N. caninum* a partir do feto abortado é um indicativo que o aborto poderia ter sido causado por esse agente. A presença de anticorpos nos líquidos fetais é uma indicação da infecção do feto durante a gestação. No caso da histopatologia, existe a dificuldade de se encontrar fetos abortados em condições adequadas para a identificação dos achados histopatológicos causados pela ação do taquizoíto. Devido à semelhança das lesões com as causadas pelo *Sarcocystis* spp., recomenda-se que essa técnica seja interpretada juntamente com outras ferramentas de diagnóstico para que se chegue a um diagnóstico conclusivo (Jenkins et al., 2002).

Os testes de diagnóstico sorológicos utilizados para detectar e quantificar os anticorpos anti-*N. caninum* são principalmente o Teste de aglutinação (Packham et al., 1998; Romand et al., 1998), ELISA (Pare et al., 1995; Schares et al., 2000; Basler et al., 2001) e a RIF (Dubey et al., 1988; Conrad et al., 1993; Wouda et al., 1997). Estes testes apresentam uma boa sensibilidade, de modo que um resultado negativo de uma vaca que abortou sugere que o *N. caninum* não esteja envolvido na causa do aborto. Porém estes resultados devem ser analisados com cautela, pois a não detecção de anticorpos pode ser devida a uma queda do limiar, decorrente da flutuação do título que acontece depois de abortos tardios ou pela percentagem de falso negativo provavelmente detectada pelo teste. O resultado sorológico positivo de vacas que abortaram, não indica necessariamente que o aborto foi devido ao *N. caninum* visto que, na transmissão vertical, vacas positivas

parem bezerros positivos saudáveis. Deve-se considerar que outros agentes infecciosos ou não infecciosos podem estar envolvidos em problemas reprodutivos de bovinos (Jenkins et al., 2002).

Devido à grande dificuldade de se chegar a um diagnóstico de problemas reprodutivos causados por *N. caninum*, em decorrência das causas multifatoriais infecciosas e não infecciosas, a realização de um estudo epidemiológico é fundamental para um melhor entendimento sobre as possíveis causas que estariam afetando os índices reprodutivos do rebanho. No caso da Neosporose, o acompanhamento sorológico dos animais em reprodução e um estudo da associação desta sorologia com os quadros clínicos, são condutas importantes para se chegar a um possível diagnóstico (Pare et al., 1996; Tursmond e Hietala, 1997; Moen et al., 1998).

2.5 - Medidas de controle

Atualmente, não existe nenhum método de controle efetivo para a Neosporose bovina no Brasil, devido à carência de informações sobre a epidemiologia da doença em rebanhos brasileiros, principalmente de bovinos de corte mantidos em sistema extensivo. Algumas práticas de manejo podem ser adotadas com o intuito de reduzir a infecção de *N. caninum* no rebanho: minimizar a infestação de oocisto na água e alimentos; promover a remoção de fetos abortados, membranas fetais, placentas e bezerros mortos e limitar a entrada de animais positivos no rebanho. Existe uma vacina comercial para a Neosporose bovina, porém a sua eficácia e o esquema de vacinação proposto pelo fabricante são motivos de muitas dúvidas e indagações entre os pesquisadores (Innes et al., 2002).

O uso da transferência de embrião tem sido recomendado para prevenir a transmissão vertical, utilizando receptoras negativas para o *N. caninum* e utilizando as recomendações da IETS (Baillargeon et al., 2001).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Local do experimento

Os experimentos foram realizados em duas fazendas, Fazenda A e Fazenda B, de criação extensiva de bovinos de corte destinados ao programa de Transferência de Embrião (T E), situadas nas regiões leste do Estado do Mato Grosso do Sul e oeste do estado do Paraná, respectivamente.

Os testes sorológicos foram realizados nos Laboratórios do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG. Na Fazenda A ocorreu a cria e a recria das novilhas em regime extensivo. Quando as novilhas atingiram a puberdade e estavam aptas para receberem os embriões, foram transferidas para a Fazenda B, onde permaneceram até o fim do experimento. As fazendas apresentavam ótimas condições de pastagens com um bom manejo, garantindo alimentação de boa qualidade durante todo o ano. As pastagens eram compostas de braquiário (*Brachiaria brizanta*) e humidicola (*B. humidicola*). Chuvas bem distribuídas durante todo o ano, temperatura quente e relevo plano, além da baixa densidade animal, favoreceram a uma criação dos animais de forma saudável e sem estresse.

3.2 - Estudo da prevalência de anticorpos anti - *N. caninum*

Foi feita uma triagem sorológica em 270 novilhas ½ sangue Nelore e Simental, criadas na fazenda A. Os animais foram testados para a pesquisa de anticorpos IgG 1,2 contra *N. caninum* utilizando-se um Kit de ELISA indireto competitivo monoclonal de origem comercial¹. Segundo o fabricante, o teste apresenta uma sensibilidade de 97,6% e especificidade de 98,6%. Foi considerada positiva a amostra que obteve um percentual de inibição maior ou igual a 30%, calculado de acordo com a fórmula a seguir:

$$\% \text{ de Inibição} = 100 - [(\text{OD da amostra} \times 100) / (\text{média da OD dos controles negativos})]$$

onde OD = Densidade Óptica

O teste de validação de cada partida foi determinado da seguinte forma:

A média das OD dos três controles negativos deve ser ≥ 0.300 e < 2.500 .

A média das OD dos dois controles positivos deve causar uma porcentagem de inibição $\geq 30\%$.

O sangue foi coletado diretamente na veia coccígea em tubos de Vacutainer (7ml) estéril sem anticoagulante. O mesmo foi armazenado a 4°C durante 2 a 12 horas, posteriormente centrifugado a 1500 - 2000 RPM durante 10 minutos e o soro congelado a -20°C até ser testado. No momento da coleta as novilhas foram marcadas a ferro quente com quatro números na anca esquerda, para fins de identificação.

3.3 - Avaliação da taxa de prenhez em receptoras soropositivas para o *N. caninum* no programa de transferência de embrião

Após a triagem, as novilhas foram divididas em dois grupos de 33 animais, sendo um grupo soropositivo e o outro soronegativo para o *N. caninum* (grupo controle). Os animais foram selecionados aleatoriamente por sorteio, sendo que o grupo negativo foi selecionado no término do experimento, com a certeza de que os mesmos permaneceram negativos até o diagnóstico de gestação. Os dois grupos permaneceram juntos durante todo o experimento em uma mesma condição de manejo.

Programa sanitário das doadoras e receptoras de Embrião

Os animais foram submetidos ao seguinte programa sanitário:

1. Antibioticoterapia contra leptospirose:

¹ VMRD, Inc. USDA Product Code 5N05.20

Aplicação de estreptomicina: uma aplicação de estreptomicina (50 mg/Kg) intramuscular.

2. Vacinações:

Vacinação contra Leptospirose, IBR e BVD

De 3 a 5 dias após a aplicação de estreptomicina foi feita a 1ª vacinação para *Leptospira* ssp e os vírus IBR/ BVD. Os animais foram revacinados para *Leptospira* ssp e os vírus IBR/BVD 14 a 28 dias após a 1ª vacinação.

3. Controle de Brucelose:

Todos os animais tiveram resultado negativo para Brucelose

Transferência de embrião (T E)

As transferências foram realizadas na Fazenda B. Os embriões utilizados foram oriundos de fêmeas bovinas de raças variadas, tanto zebuínas quanto européias, obtidos a partir de superovulação das doadoras usando hormônios a base de F.S.H. e L.H. (Pluset ou Foltropin), injetados por via intramuscular durante quatro dias, com duas aplicações diárias intervaladas de 12 horas. Junto com a sexta aplicação de F.S.H. e L.H. foi realizada a aplicação de prostaglandina (Ciosin). Após cerca de 14 horas do início do cio iniciaram -se as inseminações que foram em número de 2 a 5, variando em função da qualidade do sêmen utilizado e de forma que a última inseminação ocorresse por volta de 30 horas após o início do cio. As coletas foram realizadas de 7 a 8 dias após o início do cio da doadora, através da infusão e retirada de meio Dulbecco modificado (PBS Embriocare Cultilab), coletando o material em concentrados de embriões. O material foi processado em laboratório segundo as normas do Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embrião (Stringfellow et al., 1998) e os embriões obtidos foram mantidos e envasados em meio Dulbecco modificado acrescido de soro fetal bovino (Soro Fetal Bovino Cultilab). Em seguida foram transferidos a fresco pelo método não cirúrgico para

receptoras em cio pertencentes aos dois grupos (animais soropositivos e animais soronegativos).

Diagnóstico de Gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado por volta de 50 dias após a data do cio da receptora, pelo método de ultra-som, quando foi investigada a presença do batimento cardíaco do feto.

Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o teste χ^2 .

3.4 – Estudo da taxa de soroconversão de *N. caninum* em novilhas soronegativas mantidas em sistema extensivo

Sessenta e três novilhas soronegativas ao ELISA e não incluídas no grupo A foram acompanhadas sorologicamente até o diagnóstico de gestação da seguinte forma:

Coleta 1 : Novilhas que desembarcaram na Fazenda B (Estado do Paraná), após quatro semanas da triagem. Está coleta coincidiu com a data da TE.

Coleta 2 : Foi realizada no dia do diagnóstico de gestação, ou seja 50 dias após a TE.

Esse acompanhamento foi realizado para saber se as receptoras continuaram negativas para o *N. caninum* durante a permanência das mesmas na Fazenda B, até o diagnóstico de gestação. Desta forma pôde ser avaliada a taxa de soroconversão de *N. caninum* nas receptoras .

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 275 novilhas estudadas que foram destinadas ao programa de transferência de embrião, 29,5% (81 novilhas) eram soropositivas para o *N. caninum* (Figura 1). O ponto de corte do teste foi determinado pela percentagem de inibição padronizado para o Kit de ELISA que considerou

negativa uma inibição menor que 30% (Anexo 1) e positiva uma inibição maior ou igual a 30% (Anexo 2). Esse resultado demonstra a alta prevalência desse agente em um rebanho de novilhas cujo destino é sua utilização como receptoras de embrião. O mesmo está de acordo com as taxas de prevalência de anticorpos anti - *N. caninum* em bovinos encontrados em alguns estados brasileiros que variaram de 7,6 a 30,13%, conforme revisão realizada por Almeida (2004). Em um estudo realizado por Ragozo et al. (2003) em 110 bovinos de corte de várias propriedades do estado do Mato Grosso do Sul para avaliar a ocorrência de anticorpos anti *N. caninum*, encontrou-se 28,2% de animais soropositivos, o que se assemelha aos resultados encontrados nesse trabalho.

Apesar da concordância com os resultados descritos na literatura, esse trabalho demonstrou uma prevalência de anticorpos em um rebanho onde 100% dos animais foram estudados. Além disso, os animais formavam um grupo homogêneo pertencentes a uma mesma faixa etária (14 a 20 meses), a um mesmo grau de sangue (½ sangue Nelore e Simental) e mantidos em uma mesma situação de manejo tanto reprodutivo quanto nutricional, o que torna o resultado ainda mais condizente com o grau de infecção dos animais. Desta forma, as receptoras soropositivas representam um potencial risco de transmissão vertical desse agente para os produtos transferidos. Ressalte - se que a eficiência da transmissão vertical de *N. caninum* pode chegar aos 95% (Davison et. al.,1999). A crescente prestação de serviço fornecido por centrais de transferência de embriões, faz com que receptoras soropositivas transferidas sejam comercializadas por todo o país, favorecendo a disseminação de *N. caninum* para rebanhos livres de infecção ou com uma baixa prevalência da doença. Dessa forma, o uso de receptoras negativas é recomendado para a prevenção da transmissão vertical desse agente dentro do programa de transferência de embrião desenvolvido na propriedade em questão, de acordo com as normas da IETS (Baillargeon et al., 2001).

Na comparação da taxa de prenhez entre os dois grupos, o grupo A (animais soropositivos para o *N. caninum*) apresentou uma taxa de prenhez de 72,7% (24 receptoras com prenhez confirmada) e o Grupo B (animais soronegativos para o *N. caninum*) uma taxa de prenhez de 81,8% (30 receptoras com prenhez confirmada). Não houve diferença significativa entre os dois grupos ($\chi^2 = 0,345$, onde $p = 0,5569$) (Figura 2). A ocorrência de problemas reprodutivos devido ao *N. caninum* no início do período gestacional, (reabsorção embrionária e abortos no início da gestação) tem sido alvo de dúvida e preocupação para pesquisadores e produtores que adotam o programa de transferência de embrião. Esse fato se justifica, pois, na maioria das vezes, depois de confirmada a prenhez, as receptoras são encaminhadas para o seu destino, permanecendo nas centrais apenas até o diagnóstico de gestação.

Os resultados do presente trabalho demonstraram que a taxa de prenhez das receptoras de embrião foi independente da infecção por *N. caninum*. Esse trabalho foi um dos primeiros a demonstrar que, nas condições estudadas, a infecção natural de *N. caninum* em bovinos não interferiu na fertilidade do rebanho no período até os 50 dias de gestação. É importante salientar que vários fatores relacionados com o agente, o hospedeiro e o ambiente interagem para a ocorrência ou não das perdas reprodutivas, nesse caso, poderiam ter ocorridas no início do período gestacional dos animais soropositivos. Os animais utilizados foram criados em condições ótimas de manejo nutricional com pastagem de boa qualidade, suplementação mineral adequada e baixa densidade animal. Além disso, o rebanho estava bem adaptado à condição local. Esses fatores devem ter contribuído para os achados do presente trabalho, uma vez que nessas condições os animais estão menos sujeitos a fatores estressantes, evitando assim a recrudescência do *N. caninum*, sua parasitemia e os danos ao feto daí decorrentes conforme os achados de Innes et al. (2002) e Williams et al. (2000).

Nesse trabalho não foi possível avaliar se nos animais soropositivos ocorreu a

recrudescência de *N. caninum* no início do período gestacional, desencadeando a patogenicidade sugerida por Innes et al. (2002).

No caso da suspeita de Neosporose, a pesquisa sorológica dos animais em reprodução e um estudo da associação dessa sorologia com os quadros clínicos reprodutivos, são ferramentas importantes para se chegar a um possível diagnóstico. Essa mesma metodologia de diagnóstico tem sido proposta por vários autores no mundo (Pare et al., 1996; Thurmond e Hietala, 1997; Moen et al., 1998) sendo o presente trabalho, um dos pioneiros na utilização dessa metodologia para o diagnóstico da Neosporose em um rebanho de bovinos mantidos em sistema extensivo de criação no Brasil.

Das 63 novilhas soronegativas acompanhadas por sorologia, uma tornou-se soropositiva após a triagem e três tornaram-se soropositivas após a transferência de embrião (TE) (Tabela 1). A novilha que era negativa na triagem e soroconverteu após três semanas possivelmente foi infectada por oocisto de *N. caninum*, visto que o tempo para a detecção de níveis de anticorpos após a ingestão de oocistos por bovinos varia em torno de quatro semanas (De Marez et al., 1999). Se a mesma fosse infectada pela transmissão vertical ela teria sido detectada como soropositiva na triagem, tendo em vista que os anticorpos oriundos de infecção vertical persistem por um longo período, ficando o animal infectado por toda a sua vida (Barr et al., 1997). Como os animais estudados tinham de 14 a 20 meses de idade esse fato é praticamente viável. As três novilhas que soroconverteram após a transferência de embrião, possivelmente também foram infectadas pela ingestão de oocistos através da transmissão horizontal. Esses resultados sugerem que oocistos de *N. caninum* estavam presentes no ambiente

estudado, contribuindo para uma taxa de transmissão horizontal de 6,3% (4 novilhas que soroconverteram em 63 novilhas estudadas). Esse resultado está de acordo com o encontrado na literatura onde a taxa de transmissão horizontal tem sido descrita como baixa variando entre 4 a 10%, estudos esses também baseados na soroconversão de animais jovens (Thurmond e Hietala, 1997; Davison et al., 1999; Paré et al., 1996). Outro resultado interessante encontrado nesse trabalho foi que as quatro receptoras que soroconverteram, infectadas provavelmente pela ingestão de oocistos, tiveram a prenhez confirmada. Nesse caso a provável infecção horizontal não foi suficiente para acarretar problemas para os fetos no início do período gestacional. Este resultado enfatiza os achados de Trees et al. (2002) que após a infecção horizontal experimental com a inoculação de 600 oocistos esporulados em três vacas com dez semanas de prenhez, não observaram abortos e transmissão vertical nos bezerros paridos. Tais achados sugerem também, que a infecção dos animais por oocistos tem baixa eficiência para a ocorrência dos quadros clínicos reprodutivos.

Devido à baixa taxa de soroconversão encontrada (6,3%) e à alta prevalência de animais soropositivos no rebanho (29,5%) pode-se deduzir que a transmissão vertical foi a forma mais importante de entrada e manutenção do *N. caninum* no rebanho estudado, o que também foi observado por vários autores em outros sistemas de produção (Schares et al., 1998; Pare et al., 1996; Davison et al., 1999).

Como já ressaltado, vários são os fatores que se interagem para determinar a ocorrência ou não da doença, sendo que muitos desses fatores ainda não estão claros na epidemiologia da neosporose bovina.

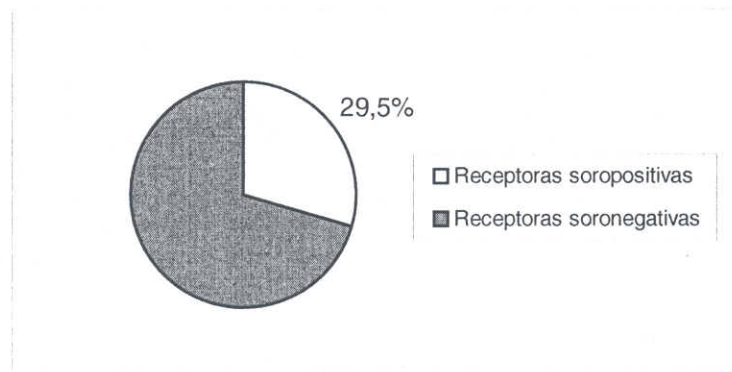


Figura 1- Prevalência de anticorpos anti - *N. caninum* em um rebanho de receptoras de embrião bovino no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil

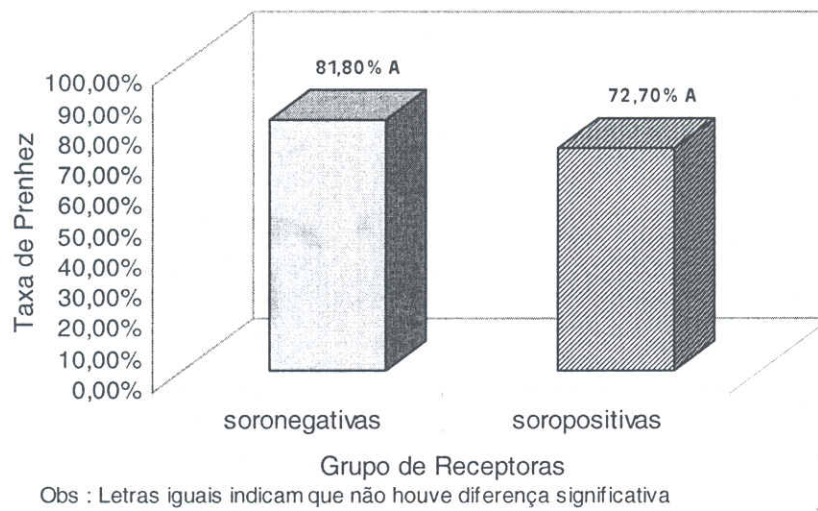


Figura 2 - Comparação entre a taxa de prenhez de receptoras de embrião soropositivas e soronegativas para o *N. caninum*

Tabela 1 - Soroconversão de 6,3% (4 novilhas que soroconverteram em 63 animais acompanhados) com coletas realizadas na triagem, transferência de embrião (TE) e diagnóstico de gestação (Dig.Gest.) baseado na percentagem de inibição ($\geq 30\%$).

Novilhas	Triagem	TE	Dig. Gest.	Novilhas	Triagem	TE	Dig. Gest.
3949	12,585366	5,2277591	9,7116071	4070	14,940239	-18,569201	-30,954443
3950	2,4390244	2,8839295	5,2083333	4072	7,0717131	13,130088	-2,7195566
3959	9,3658537	0,3984064	19,539234	4084	-44,325153	25,68855	-19,435302
3964	9,9512195	6,9807726	-15,797679	4088	-40,184049	-4,9628044	-0,4734848
3969	10,926829	11,363636	4,0719697	4093	-35,276074	8,5906451	-1,2942016
3977	11,804878	1,4572506	7,3863636	4095	10,429448	49,715909	47,064394
3981	6,5420561	-17,962931	-11,813615	4099	6,0756972	1,0416667	2,0833333
3982	18,243902	-1,5936255	-15,018188	4100	-32,97546	9,6097014	9,1856061
3983	2,2908367	-28,789191	32,617357	4105	-47,852761	11,484497	29,326174
3985	13,170732	10,832569	2,0686844	4109	-0,9202454	-7,396501	-10,774294
3986	11,804878	-21,080894	27,420752	4117	-50,613497	10,526852	6,8181818
3991	2,4390244	3,291552	2,1780303	4119	-41,411043	-6,5340909	9,7537879
3993	4,8804781	0,1324773	9,1856061	4125	-42,638037	2,9356061	6,155303
3994	4,9756098	-17,703101	23,869738	4130	-51,687117	22,570587	-8,8688723
4002	5,1792829	0,6420055	-2,9246917	4138	-39,110429	10,221135	-18,821971
4006	6,1463415	4,6163253	6,7563436	4140	-42,944785	-0,4734848	4,4507576
4014	11,02439	0,0305717	-2,5170692	4145	1,0956175	13,176399	6,8181818
4021	27,317073	4,3106084	1,8648731	4146	0,2988048	13,889738	-4,8608988
4025	8,097561	21,780303	12,973485	4147	-16,257669	5,3977273	3,3143939
4028	12,803738	-24,025637	6,8075524	4150	2,3904382	-0,6827678	-1,8037297
4029	7,9439252	6,8582493	2,3674242	4152	7,7689243	10,037879	8,2386364
4034	13,365854	7,1022727	5,9659091	4156	1,8924303	-5,370427	-5,6761439
4035	16,292683	10,628758	1,8648731	4159	13,844622	-12,679716	-2,6329465
4037	4,3902439	3,125	2,0833333	4160	21,95122	1,7045455	9,9431818
4040	5,2682927	5,6353816	4,3560606	4161	4,0836653	-17,616491	-11,120734
4041	2,4390244	-8,0027715	21,704486	4167	-76,840491	6,0606061	-1,8037272
4049	16,135458	-24,891737	-22,466655	4176	-50,153374	-24,285467	-3,9320977
4052	9,6613546	-10,873331	6,9128788	4178	10,557769	17,720423	30,192274
4059	1,2948207	-0,5808621	-0,886579	4205	2,0916335	21,964317	23,696518
4060	22,111554	-2,8927767	28,460073	4213	4,1832669	13,563139	-16,144119
4064	-26,07362	12,361154	5,9410985	4218	-47,08589	27,247532	22,397367
4069	-37,883436	6,2878919	36,16837				

5 - CONCLUSÕES

Não houve interferência da infecção por *N. caninum* sobre a taxa de prenhez das receptoras de embrião, nas condições estudadas. As ótimas condições de manejo a que os animais estavam submetidos parecem ter contribuído para este resultado, sugerindo que o *N. caninum* seja um agente oportunista do trato reprodutivo de bovinos.

N. caninum se encontra em alta prevalência em um rebanho de novilhas utilizadas como receptoras de embrião, criadas extensivamente no estado do Mato Grosso do Sul.

A taxa de soroconversão de *N. caninum* para bovinos de corte criados em sistema extensivo mostrou -se baixa nas condições estudadas.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA., M. A. O. Epidemiologia de *Neospora caninum*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.13, n.1, supl. 1, p.38 – 40, 2004.
- ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. *Animal Reproduction Science.*, v. 60 – 61, n.1, p. 417 – 431,2000.

- BAILLARGEON, P.; FECTEAU, G.; PARÉ, J.; Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.218, n. 11, p. 1803 – 1806,2001.
- BARR, B. C.; BJERKAS, I.; BUXTON, D. Neosporosis: report of the International Neospora Workshop. *Parasitology*, v.19, n.1, p.120 – 144,1997
- BASZLER, T. V.; ADAMS, S.; VANDER – SCHALIE, J. et al. Validation of a commercially available monoclonal antibody – based competitive inhibition enzyme – linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *Journal Clinical Microbiology*, v. 12, n.1, p. 3854 – 3857, 2001.
- BERGERON, N.; FECTEAU, G.; PARÉ, MARTINEAU, R. et al. Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Quebec. *Canada. Veterinary Journal*, v.41, n.1, p.464 – 467,2000.
- BJERKAS, I.; DUBEY, J. P. Evidence that *Neospora caninum* is identical to the Toxoplasma-like parasite of Norwegian dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 32, n. 3, p. 407-410, 1991.
- CONRAD, P. A.; BARR, B. C.; SVERLOW, K. W. et al. A. *In vitro* isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine fetuses. *Parasitology*, v. 106, n. 3, p. 239-249, 1993.
- DAVISON, H.; OTTER, A.; TREES, A. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters as *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *International Journal for Parasitology*, v.29, n.1, p. 1683 – 1689, 1999.
- DE MAREZ, T.; LIDDELL, S.; DUBEY, J. P. et al. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 10, p. 1647-1657, 1999.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and Neosporosis. *Veterinary Parasitology*, v. 67, n. 1, p. 1-59, 1996.
- DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A. et al. A. Newly recognized fatal protozoan diseases of dogs. *Journal of the American. Veterinary Medical Association*, v. 192, n.1, p.1269-1285, 1988.
- DUBEY, J.P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Veterinary. Parasitology.*, v. 84, n.1, p.349-367, 1999a.
- DUBEY, J.P. Neosporosis in cattle, biology and economic impact. *Journal of the American. Veterinary Medical Association*, v. 214, n.1, p. 1160 – 1163,1999b.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis. *Parasitology Today*, v. 9, n. 12, p. 452-458, 1993.
- DUBEY, J. P.; KOESTNER, A.; PIPER, R. C. Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 197, n. 7, p. 857-860, 1990.
- GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F.(Eds.). *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Livraria Varela, 2001.np.200
- GONDIM, L. F .P; MCALLISTER, M.M.; PITTB, W.C. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Journal Parasitology.*,v.34, n.1,p.159-161,2004.
- HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B.; KAUFMANN, H. Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. *Parasitology*, v. 112, n. 2, p. 183-197, 1996.

- INNES, E. A.; ANDRIANARIVO, A. G.; BJORKMAN, C. et al. Immune response to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends in Parasitology*, v. 18, n. 11, p. 497 – 504, 2002.
- JARDINE, J. E. The ultrastructure of bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. *Veterinary Parasitology*, v. 62, n. 3-4, p. 231-240, 1996.
- JENKINS, M.; BASZLER, T.; BJORKMAN, C. et al. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum* – associated bovine abortion. *International Journal for Parasitology*, v. 32, n.1, p. 631 – 636, 2002.
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Canine neosporosis. *Journal of Veterinary Parasitology*, v. 14, n. 1, p. 1-11, 2000.
- LINDSAY, D. S.; UPTON, S. J.; DUBEY, J. P. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 10, p. 1521-1523, 1999.
- LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A.; TOIVIO-KINNUNAN, M. A. et al. Use of infected cultured cells to compare ultrastructural features of *Neospora caninum* from dogs and *Toxoplasma gondii*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 54, n. 1, p. 103-106, 1993.
- MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, 1998.
- MOEN, A. R.; WOUDA, W.; MUL, M. F. et al. Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. *Theriogenology*, v.49, n.1, p.1301 – 1309, 1998.
- MOORE, D. P.; CAMPERO, C. M.; ODEÓN, A. S. et al. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. *Veterinary Parasitology*, v.107, n.1, p. 303 – 316, 2002.
- PACKHAM, A. E.; SVERLOW, K. W.; CONRAD, P. A. et al. A modified agglutination test for *Neospora caninum*: development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 5, n. 4, p. 467-473, 1998.
- PARÉ, J.; HIETALA, S. K.; THURMOND, M. C. An enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora sp.* Infection in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 7, n.1, p. 352-359, 1995.
- PARÉ, J.; THURMOND, M.; HIETALA, S. K. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Canada Journal of Veterinary Research*, v.60, n.1, p.133 – 139, 1996.
- RAGOZO, A. M. A.; PAULA, V. S. O.; SOUZA, S. L. P. et al. 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.
- ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; DUBEY, J. P. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitology Research*, v. 84, n. 1, p.50-53, 1998.
- SCHARES, G.; PETERS, M.; WURM, R. et al. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Veterinary Parasitology*, v. 80, n. 2, p. 87-98, 1998.
- SCHARES, G.; RAUSER, M.; SONDRGEN, P. et al. Use of purified tachyzoite surface antigen p38 in a ELISA to diagnose bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology*, v. 30, n.1, p. 1123 – 1130, 2000.
- SPEER, C.A.; DUBEY, J. P.; MCALLISTER, M. M. et al. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n.1, p. 1509-1519, 1999.

STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M.(Ed.). *Manual da sociedade internacional de transferência de embriões : um guia de procedimento e informações gerais para uso em tecnologia de transferência de embriões enfatizando procedimentos sanitários*. Illinois: Savoy,1998.180 p.

THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Effect of *Neospora caninum* infection in first-lactation dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association.*, v.210, n. 5, p.672-674, 1997.

TREES, A .J.; DAVISON, H. C.; INNES, J. M.et al. Towards evaluating the impact of bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology*, v 29, n.1, p.1195 – 1200, 1999.

TREES, A. J.; MCALLISTER, M. M.; GUY, C.S. *Neospora caninum* : oocyst challenge of pregnant cows. *Veterinary Parasitology*, v. 109,n.1, p. 147 – 154, 2002.

WILLIAMS, D.J.L.; GUY, C. S.; MCGARRY, J. W.et al. *Neospora caninum* – associated abortion in cattle: the time of experimentally – induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology*, v. 121, n.1, p. 347 – 358, 2000.

WOUDA,W.; DIJKSTRA, T.; KRAMER, A. M.et al. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *International Journal. Parasitology* , v. 29, n.1, p. 1677 – 1682,1999.

WOUDA,W.; DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C. Serological diagnosis of bovine foetal neosporosis. *Journal. Parasitology* ,v.83, n.1, p. 545 – 547, 1997.

Anexo 1... - Densidade óptica (OD) e percentagem (%) de inibição de novilhas soronegativas detectadas pelo teste de ELISA, onde % de Inibição = $100 - [(OD \text{ da amostra} \times 100) / (\text{média da OD dos controlos negativos})]$

Soronegativas	OD	% de Inibição	Soronegativas	OD	% de Inibição	Soronegativas	OD	% de Inibição	Soronegativas	OD	% de Inibição
4044	0,942	-44,47852761	3983	0,981	2,290836653	3945	0,895	12,68292683	3957	0,88	17,75700935
4046	0,942	-44,47852761	3993	0,955	4,880478088	3947	0,875	14,63414634	3981	1	6,542056075
4064	0,822	-26,07361963	4002	0,952	5,179282869	3948	0,93	9,268292683	4028	0,933	12,80373832
4066	0,914	-40,18404908	4003	0,762	24,10358566	3949	0,896	12,58536585	4029	0,985	7,943925234
4067	0,943	-44,63190184	4007	0,932	7,171314741	3950	1	2,43902439	Total	4	
4069	0,899	-37,88343558	4015	1,021	-1,693227092	3951	1	2,43902439	Média OD Cont.-	1,07	
4071	0,972	-49,0797546	4016	0,915	8,864541833	3953	0,895	12,68292683			
4073	0,924	-41,71779141	4020	0,979	2,490039841	3956	0,903	11,90243902			
4078	0,926	-42,02453988	4049	0,842	16,13545817	3958	0,887	13,46341463			
4081	0,914	-40,18404908	4050	0,923	8,067729084	3959	0,929	9,365853659			
4084	0,941	-44,32515337	4051	0,931	7,270916335	3962	0,962	6,146341463			
4085	0,997	-52,91411043	4052	0,907	9,661354582	3964	0,923	9,951219512			
4088	0,914	-40,18404908	4053	0,86	14,34262948	3965	0,775	24,3902439			
4089	0,907	-39,11042945	4058	0,955	4,880478088	3968	1	2,43902439			
4091	0,946	-45,09202454	4059	0,991	1,294820717	3969	0,913	10,92682927			
4092	0,739	-13,34355828	4060	0,782	22,11155378	3970	0,843	17,75609756			
4093	0,882	-35,27607362	4062	0,98	2,390438247	3972	0,729	28,87804878			
4094	0,871	-33,58895706	4068	0,954	4,980079681	3973	0,948	7,512195122			
4095	0,584	10,42944785	4070	0,854	14,94023904	3974	0,992	3,219512195			
4096	0,843	-29,29447853	4072	0,933	7,071713147	3975	0,829	19,12195122			
4100	0,867	-32,97546012	4076	0,896	10,75697211	3977	0,904	11,80487805			
4101	0,899	-37,88343558	4079	0,91	9,362549801	3978	0,81	20,97560976			
4102	0,949	-45,55214724	4080	0,865	13,84462151	3979	0,915	10,73170732			
4103	0,932	-42,94478528	4086	0,884	11,95219124	3980	1	2,43902439			
4105	0,964	-47,85276074	4087	0,939	6,474103586	3982	0,838	18,24390244			
4109	0,658	-9,20245399	4090	1,011	-0,697211155	3984	0,908	11,41463415			
4110	0,88	-34,96932515	4097	0,707	29,58167331	3985	0,89	13,17073171			
4111	0,907	-39,11042945	4099	0,943	6,075697211	3986	0,904	11,80487805			
4113	0,936	-43,55828221	4145	0,993	1,09561753	3989	1	2,43902439			
4114	0,906	-38,95705521	4146	1,001	0,298804781	3990	0,842	17,85365854			
4115	0,923	-41,56441718	4148	0,934	6,972111554	3991	1	2,43902439			
4116	0,884	-35,58282209	4149	1,042	-3,784860558	3994	0,974	4,975609756			
4117	0,982	-50,61349693	4150	0,98	2,390438247	3995	0,928	9,463414634			
4118	0,769	-17,94478528	4152	0,926	7,768924303	3996	0,898	12,3902439			
4119	0,922	-41,41104294	4153	1,027	-2,290836653	3997	0,85	17,07317073			
4122	0,955	-46,47239264	4156	0,985	1,892430279	3998	0,993	3,12195122			
4123	0,908	-39,26380368	4157	1,111	-10,65737052	4000	1,042	-1,658536585			

Continuação

Anexo 1... - Densidade óptica (OD) e percentagem (%) de inibição de novilhas soronegativas detectadas pelo teste de ELISA, onde % de Inibição = $100 - [(OD \text{ da amostra} \times 100) / (\text{média da OD dos controles negativos})]$

Soronegativas	OD	% de Inibição	Soronegativas	OD	% de Inibição	Soronegativas	OD	% de Inibição	Soronegativas	OD	% de Inibição
4124	0,933	-43,09815951	4159	0,865	13,84462151	4005	0,968	5,56097561			
4125	0,93	-42,63803681	4161	0,963	4,083665339	4006	0,962	6,146341463			
4130	0,989	-51,68711656	4163	1,042	-3,784860558	4008	0,881	14,04878049			
4132	0,912	-39,87730061	4164	0,933	7,071713147	4009	0,94	8,292682927			
4133	0,923	-41,56441718	4169	0,848	15,53784861	4010	0,939	8,390243902			
4135	0,93	-42,63803681	4170	0,976	2,788844622	4013	0,916	10,63414634			
4137	0,93	-42,63803681	4172	0,975	2,888446215	4014	0,912	11,02439024			
4138	0,907	-39,11042945	4173	0,905	9,860557769	4021	0,745	27,31707317			
4139	0,903	-38,49693252	4174	0,965	3,884462151	4025	0,942	8,097560976			
4140	0,932	-42,94478528	4177	0,992	1,195219124	4026	0,898	12,3902439			
4142	0,915	-40,33742331	4178	0,898	10,55776892	4030	0,991	3,317073171			
4147	0,758	-16,25766871	4182	0,965	3,884462151	4031	0,905	11,70731707			
4166	0,852	-30,67484663	4183	0,985	1,892430279	4032	1,029	-0,390243902			
4167	1,153	-76,8404908	4186	0,984	1,992031873	4033	0,806	21,36585366			
4175	0,957	-46,7791411	4189	1,021	-1,693227092	4034	0,888	13,36585366			
4176	0,979	-50,15337423	4192	0,935	6,87250996	4035	0,858	16,29268293			
4179	0,821	-25,9202454	4196	0,9	10,35856574	4036	0,915	10,73170732			
4184	0,961	-47,39263804	4201	0,862	14,14342629	4037	0,98	4,390243902			
4188	0,89	-36,50306748	4202	1,027	-2,290836653	4038	0,944	7,902439024			
4190	0,916	-40,49079755	4203	0,936	6,772908367	4040	0,971	5,268292683			
4206	0,917	-40,64417178	4204	0,87	13,34661355	4041	1	2,43902439			
4215	0,941	-44,32515337	4205	0,983	2,091633466	4154	0,967	5,658536585			
4217	0,99	-51,8404908	4207	0,922	8,167330677	4158	0,809	21,07317073			
4218	0,959	-47,08588957	4208	0,951	5,278884462	4160	0,8	21,95121951			
Total	61		4211	0,954	4,980079681	4168	0,814	20,58536585			
Média OD	0,652		4213	0,962	4,183266932	4171	0,927	9,56097561			
Contr.-			Total	63		4181	0,915	10,73170732			
			Média OD	1,004		4198	0,998	2,634146341			
			Contr.-			4209	0,889	13,26829268			
						Total	66				
						Média OD	1,025				
						Contr.-					

Anexo 2 - Densidade óptica (OD) e percentagem (%) de inibição de novilhas soropositivas detectadas pelo teste de ELISA, onde % de Inibição = $100 - [(OD \text{ da amostra} \times 100) / (\text{média da OD dos controlos negativos})]$

Soropositivas	OD	% de Inibição	Soropositivas	OD	% de Inibição	Soropositivas	OD	% de Inibição	Soropositivas	OD	% de Inibição
4001	0,181	72,2392638	3961	0,222	77,8844622	3944	0,101	90,14634146	4017	0,23	78,5046729
4045	0,028	95,70552147	3967	0,217	78,38645418	3946	0,093	90,92682927	Total	1	
4047	0,385	40,95092025	4004	0,135	86,55378486	3952	0,201	80,3902439	Média OD Cont.-	1,07	
4057	0,394	39,57055215	4011	0,163	83,76494024	3954	0,29	71,70731707			
4063	0,204	68,71165644	4012	0,191	80,97609562	3955	0,12	88,29268293			
4065	0,032	95,09202454	4019	0,661	34,16334661	3960	0,171	83,31707317			
4074	0,124	80,98159509	4048	0,166	83,46613546	3963	0,179	82,53658537			
4075	0,199	69,47852761	4054	0,17	83,06772908	3966	0,14	86,34146341			
4082	0,2	69,32515337	4055	0,212	78,88446215	3971	0,073	92,87804878			
4083	0,029	95,55214724	4056	0,217	78,38645418	3976	0,204	80,09756098			
4104	0,345	47,08588957	4061	0,138	86,25498008	3987	0,102	90,04878049			
4106	0,046	92,94478528	4077	0,094	90,6374502	3988	0,321	68,68292683			
4107	0,119	81,74846626	4098	0,227	77,39043825	3992	0,085	91,70731707			
4108	0,3	53,98773006	4144	0,133	86,75298805	3999	0,08	92,19512195			
4112	0,286	56,13496933	4151	0,161	83,96414343	4018	0,153	85,07317073			
4120	0,079	87,88343558	4162	0,139	86,15537849	4022	0,121	88,19512195			
4121	0,264	59,50920245	4165	0,123	87,74900398	4023	0,214	79,12195122			
4126	0,091	86,04294479	4180	0,518	48,4063745	4024	0,106	89,65853659			
4127	0,382	41,41104294	4185	0,117	88,34661355	4027	0,157	84,68292683			
4128	0,147	77,45398773	4187	0,133	86,75298805	4039	0,202	80,29268293			
4129	0,189	71,01226994	4191	0,204	79,6812749	4042	0,162	84,19512195			
4131	0,173	73,46625767	4193	0,094	90,6374502	4043	0,089	91,31707317			
4134	0,167	74,386650307	4194	0,105	89,54183267	4155	0,129	87,41463415			
4136	0,041	93,71165644	4195	0,644	35,85657371	4199	0,07	93,17073171			
4141	0,442	32,20858896	4197	0,058	94,22310757	Total	24				
4143	0,294	54,90797546	4210	0,255	74,60159363	Média OD Cont.-	1,025				
4200	0,241	63,03680982	4214	0,082	91,83266932						
4212	0,117	82,05521472	Total	27							
4216	0,082	87,42331288	Média OD Cont.-	1,004							
Total	29										
Média OD Cont.-	0,652										