



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

BRENDA VALERIO SOUZA

**WESTERN BLOTTING COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO PARA
NEOSPOROSE: REVISÃO DE LITERATURA**

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

2019

BRENDA VALERIO SOUZA

**WESTERN BLOTTING COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO PARA
NEOSPOROSE: REVISÃO DE LITERATURA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido ao Colegiado de Graduação de
Medicina Veterinária do Centro de
Ciências Agrárias, Ambientais e
Biológicas da Universidade Federal do
Recôncavo da Bahia como requisito
parcial para obtenção do título de Médica
Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Moraes Pinheiro

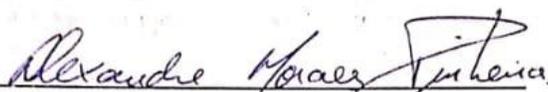
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
2019

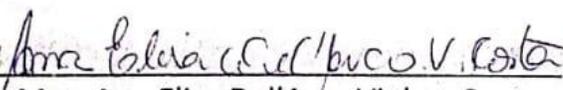
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
COLEGIADO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CCA106 – TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

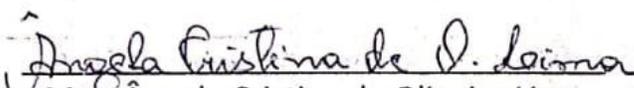
COMISSÃO EXAMINADORA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

BRENDA VALERIO SOUZA

WESTERN BLOTTING COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO PARA NEOSPOROSE:
REVISÃO DE LITERATURA


Prof. Dr. Alexandre Moraes Pinheiro
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia


Msc. Ana Elisa Del'Arco Vinhas Costa
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia


Msc. Ângela Cristina de Oliveira Lima
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Cruz das Almas, BA, 2 de dezembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, *Ednaldo e Eldilana*, pelo amor e apoio incondicional durante a minha caminhada, obrigada pelo cuidado e carinho dedicados a mim.

À minha irmã *Kelly*, pelo exemplo, conselhos de vida e momentos de diversão.

A minha família pelos momentos de felicidade que pudemos compartilhar. À minha filha do coração, *Rafaela*, se hoje sou melhor, é porque quero ser um exemplo para você.

Aos meus maravilhosos amigos, com os quais confio minhas alegrias e tristezas: *Danyelle, Jonathas, Jordan, Sarah, Mariana e Lorena*. Às amigas da imuno: *Juliana, Julia e Carol Pacini*, foi incrível conhecer vocês.

Aos colegas da graduação, com os quais passei bons e maus momentos, compartilhamos risadas, conhecimento, cervejas e noites mal dormidas.

Ao meu orientador *Alexandre Pinheiro* pela paciência, ensinamentos e puxões de orelha para que eu pudesse melhorar.

Aos colegas do Laboratório N5: *Kêu, Tati, Clara, Dedel, Keila, Ângela, Luciana, Sarah*, pelo conhecimento que compartilhamos durante esses anos de iniciação científica.

Ao grupo Despertar, principalmente *Ana Elisa*, a qual tem minha eterna gratidão por ter sido a primeira professora a acreditar em mim como orientada e por ser uma grande amiga.

Aos integrantes do Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular da UFBA, que me acolheram durante o estágio supervisionado, minha grande admiração pelo professor *Victor Diógenes* e professora *Silvia Costa*, que foram excelentes supervisores; aos colegas que me fizeram sentir em casa, partilhamos conhecimento e dias maravilhosos juntos.

Aos grandes amigos que fiz em Cruz das Almas.

Aos colegas de república em Salvador pelo companheirismo: *Daira e Rafa*.

À *Hiago Evangelista Freitas (in memoriam)*, meu amado primo e amigo que sempre vibrou minhas conquistas. Dedico esta a você.

EPÍGRAFE

*Vim, tanta areia andei
Da lua cheia eu sei
Uma saudade imensa*

*Vagando em verso eu vim
Vestido de cetim
Na mão direita, rosas
Vou levar*

*Olha a lua mansa se derramar
Ao luar descansa meu caminhar
Meu olhar em festa se fez feliz
Lembrando a seresta que um dia eu fiz
Por onde for, quero ser seu par*

*Já me fiz a guerra por não saber
Que esta terra encerra, meu bem-querer
E jamais termina meu caminhar
Só o amor me ensina onde vou chegar
Por onde for, quero ser seu par.*

Andança - Danilo Caymmi, Paulinho Tapajós e

Edmundo Souto

RESUMO

A neosporose é uma enfermidade parasitária que gera grandes perdas econômicas na pecuária mundial, causando abortamento principalmente em bovinos. É causada pelo agente *Neospora spp.*, um protozoário intracelular obrigatório que, desde a sua identificação, sendo estudado em larga escala. A transmissão deste parasito pode ser tanto por via vertical quanto horizontal, e pode infectar uma diversidade de animais de sangue quente, sendo os canídeos os hospedeiros definitivos. Muitas são as técnicas para diagnóstico da neosporose, por análise direta ou indireta. O Western Blotting é um método de detecção proteica que proporcionou grande avanço no estudo de diversas enfermidades por se tratar de um exame de alta especificidade e sensibilidade, aliado a rápida execução, precisão e custo acessível para confirmação de diagnóstico na medicina veterinária. Diante disso, esta revisão de literatura abordará acerca da neosporose, os principais métodos de diagnóstico, com ênfase no Western immunoblotting.

Palavras-chave: imunodeteção; proteínas; sorologia;

ABSTRACT

Neosporosis is a parasitic disease that generates major economic losses in cattle industry worldwide, causing abortions. It has been caused by the agent *Neospora spp.*, a protozoan parasite that, since its identification, has been studied on a large scale. The transmission of this parasite can be either vertically or horizontally, and can infect a variety of warm-blooded animals, with canids being the definitive hosts. There are many techniques for the diagnosis of neosporosis by direct or indirect analysis. Western Blotting is a protein detection method that has made great progress in the study of several diseases because it is a high specificity and sensitivity examination, coupled with fast execution, accuracy and affordable cost for diagnostic confirmation in veterinary medicine. Given this, this literature review will address neosporosis, the main diagnostic methods, with emphasis on Western immunoblotting.

Key words: immunodetection; proteins; serology

SUMÁRIO

RESUMO.....	05
ABSTRACT.....	05
1.0 INTRODUÇÃO.....	07
2.0 OBJETIVO.....	08
3.0 REVISÃO DE LITERATURA.....	09
3.1 Breve histórico de <i>Neospora spp</i>	09
3.2 Biologia e ciclo de vida.....	10
3.3 Hospedeiros e vias de transmissão.....	13
3.4 Importância epidemiológica e econômica.....	14
3.5 Sinais clínicos.....	15
3.6 Resposta imunológica.....	16
3.7 Diagnóstico de <i>Neospora spp</i>	17
3.7.1 Métodos diretos de detecção.....	18
3.7.2 Métodos indiretos de detecção.....	21
3.8 Controle e prevenção.....	28
4.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	29
5.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

1.0 INTRODUÇÃO

A neosporose é uma enfermidade causada pelo protozoário *Neospora caninum*. Amplamente distribuído no mundo, é capaz de infectar uma grande variedade de espécies animais, podendo

causar doença clínica em cães e grande perda econômica na bovinocultura (DONAHOE *et al.*, 2015). *N. caninum* é uma das principais causas de abortamento na bovinocultura leiteira e de corte no mundo (DUBEY, 2003a)

Os prejuízos econômicos relacionados à neosporose estão associados a injúrias reprodutivas, má formação fetal, diminuição na produção de leite, custos diretos e indiretos com diagnóstico e tratamentos (DUBEY e SCHARES, 2011).

Depois do relato inicial em cães da Noruega (BJERKAS *et al.*, 1984), *N. caninum* tem sido descrito em várias espécies de animais (DUBEY e LINDSAY, 1996; GONDIM, 2006), sendo o parasito comumente transmitido para os herbívoros por via vertical ou ingestão de oocistos dos hospedeiros definitivos (MCALLISTER *et al.*, 1998).

Desde a descoberta e isolamento de *N. caninum*, várias técnicas para diagnóstico da infecção pelo protozoário vêm sendo descritas e aprimoradas. A confirmação da infecção inicialmente era feita na presença do parasito nos tecidos *post-mortem*, o que se tornava difícil pelo pequeno número encontrado nos tecidos de animais cronicamente infectados (JENKINS *et al.*, 2002). Os testes sorológicos tornaram-se, portanto, uma ferramenta bastante utilizada na detecção de anticorpos específicos em bovinos adultos (BJÖRKMAN e UGGLA, 1999).

O western immunoblotting é um dos métodos sorológicos utilizados para diagnóstico da infecção, sendo considerado uma técnica confirmatória de outras provas sorológicas (ATKINSON *et al.*, 2000a,b; SÖNDGEN *et al.*, 2001), possui alta sensibilidade e especificidade, sendo muito utilizado no diagnóstico de diversas doenças de interesse médico veterinário (COOLEY *et al.*, 2001).

2.0 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é discutir acerca dos principais métodos diagnósticos utilizados para detecção do *Neospora caninum*, com enfoque no Western immunoblotting.

3.0 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Breve histórico de *Neospora spp*

Bjerkas *et al.* em 1984 observaram um protozoário semelhante ao *Toxoplasma gondii* em tecidos de cães com quadro clínico de meningoencefalomielite, miosite e encefalomielite (DUBEY *et al.*, 1988a). Porém, estes sinais clínicos eram incomuns aos relatados em quadros de toxoplasmose, bem como estes animais não apresentaram anticorpos anti-*T. gondii* no resultado por teste de corante Sabin Feldman. Tratava-se de um protozoário desconhecido, com cistos localizados no tecido nervoso incompatíveis morfológicamente com cistos de *T. gondii*.

O protozoário foi isolado e diferenciado como um novo gênero, com parentesco em comum com o *T. gondii*, porém de estrutura e antigenicidade diferentes, e em 1988 foi denominado *Neospora caninum*, agente etiológico responsável por grandes perdas na produção bovina (DUBEY *et al.*, 2002; DUBEY *et al.*, 1988).

Nos anos seguintes, *N. caninum* foi identificado em placenta de bovinos, bezerros com paralisia neonatal, bezerros natimortos e fetos bovinos (SHIVAPRASAD *et al.*, 2001; ANDERSON *et al.*, 2000). Diferentemente do *T. gondii*, *N. caninum* não é, até o momento, considerado zoonótico. (CERQUEIRA-CÉZAR, 2017).

N. caninum foi reconhecido pela primeira vez no Brasil por Gondim *et al.* (1999a) a partir de um feto bovino abortado. O primeiro isolamento viável foi em cérebro de cães adultos naturalmente infectados que apresentavam incoordenação e paresia. (GONDIM *et al.* 1999b), depois isolado em bezerro com cegueira congênita (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2003; 2004).

Neospora spp possui duas espécies, *N. caninum* e *N. hughesi*, sendo apenas os cavalos descritos como hospedeiros intermediários de *N. hughesi* (CERQUEIRA-CÉZAR, 2017). Esta nova

classificação foi baseada em diferenças moleculares, antigênicas e estruturais do *N. caninum*, sendo que os cavalos podem ser afetados por ambas as espécies como hospedeiro intermediário.

N. hughesi foi descrito por Marsh *et al.* (1998), os quais isolaram o protozoário de um equino que apresentava sinais compatíveis com a mieloencefalite protozoária (EPM). Esta descoberta estabeleceu *N. hughesi* como mais um potencial agente etiológico da EPM, aumentando a importância do diagnóstico de *Neospora spp.* em equinos. Além de causar distúrbios neurológicos, *N. hughesi* também pode levar ao abortamento em cavalos (MARSH *et al.*, 1998).

3.2 Biologia e ciclo de vida de *Neospora spp.*

O *Neospora spp* é um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao filo *Apicomplexa*, classe *Sporozoa*, ordem *Eucoccidiida*, família *Sarcocystidae* e subfamília *Toxoplasmatinae* (CERQUEIRA-CÉZAR 2017). O ciclo de vida, formas de infecção e hospedeiros definitivos e intermediários de *N. hughesi* ainda são pouco conhecidos (HOANE *et al.*, 2006). Já o ciclo de vida do *N. caninum* é heteroxeno subdividido em reprodução sexuada e assexuada. A fase sexuada ocorre nos hospedeiros definitivos, em canídeos domésticos e silvestres. Já a fase assexuada ocorre nos hospedeiros intermediários, como bovinos, búfalos, ovinos, equinos, raposas, gatos e galinhas. Possui três estágios distintos: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos (dentro dos oocistos) (Figura 1).

Os taquizoítos medem aproximadamente $3 - 7 \times 5 \mu\text{m}$, são encontrados em diferentes tipos celulares de animais infectados, incluindo células neurais, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais vasculares, miócitos, células epiteliais tubulares renais e hepatócitos. Os bradizoítos estão presentes no interior dos cistos, podendo medir $7-8 \times 2 \mu\text{m}$ (DUBEY e LINDSAY, 1996). Os cistos teciduais apresentam forma redonda ou oval e possuem até $107 \mu\text{m}$ de diâmetro, sendo encontrados principalmente no sistema nervoso central (DUBEY, 2005).

A fase de taquizoíto é caracterizada como de rápida multiplicação por endodiogenia, invasão ativa da célula hospedeira, tornando-se intracelular, e ficam localizados no citoplasma ou dentro do vacúolo parasitóforo (DUBEY *et al.*, 1988). Esta rápida multiplicação parasitária ocasiona

extensa lesão tecidual, induz o recrutamento de células do sistema imune, causando forte reação inflamatória. O recrutamento das células de defesa imune gera no taquizoíto a necessidade de evadir dessa resposta transformando-o em bradizoítos, fase de resistência do parasito, em que forma cistos teciduais (INNES, 2007) predominantemente em tecidos neurais e musculares, persistindo por toda a vida do hospedeiro (DUBEY, SCHARES e ORTEGA-MORA, 2007) podendo não causar sinais clínicos no hospedeiro (DUBEY e LINDSAY, 1996).

O contato dos hospedeiros definitivos com o cisto tecidual contendo os bradizoítos se dá através da ingestão destes nos tecidos infectados de hospedeiros intermediários. Após ingeridos, a parede do cisto tecidual é degradada por enzimas proteolíticas, liberando o bradizoíto no epitélio intestinal, que irão invadir as células intestinais e iniciar a fase assexuada com formação de esquizontes e liberação de merozoítos. Estes merozoítos iniciam a fase sexuada que culminará na produção dos oocistos não esporulados que são eliminados nas fezes (DUBEY, SCHARES e ORTEGA-MORA, 2007).

Esses oocistos eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo estão na forma não esporulada, portanto não infectiva. Eles irão, no meio ambiente, sob condições adequadas, esporular com a formação de dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos (Figura 2). O oocisto esporulado, pode permanecer infectivos no solo por longos períodos de tempo até serem ingeridos por outros hospedeiros, e assim perpetuando o ciclo de vida do parasito (ELLIS *et al.*, 2010; GOODSWEN, KENNEDY e ELLIS, 2013; MONNEY e HEMPHILL, 2014; PETERS *et al.*, 2001).

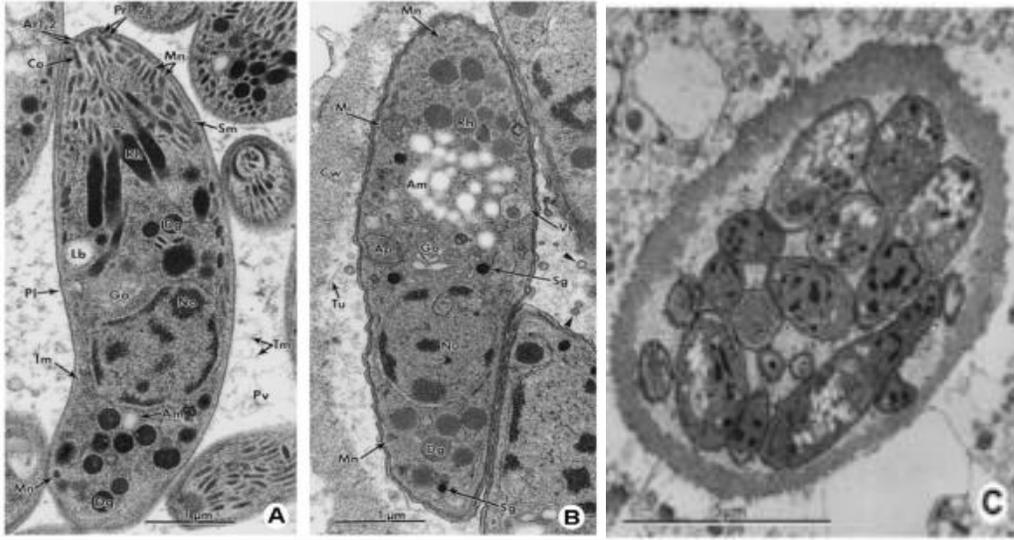


Figura 1: Estrutura dos estágios evolutivos do *N. caninum*. A) taquizoíto, B) bradizoíto, C) cisto tecidual

Fonte: Adaptado de Goodswen, Kennedy e Ellis (2013)

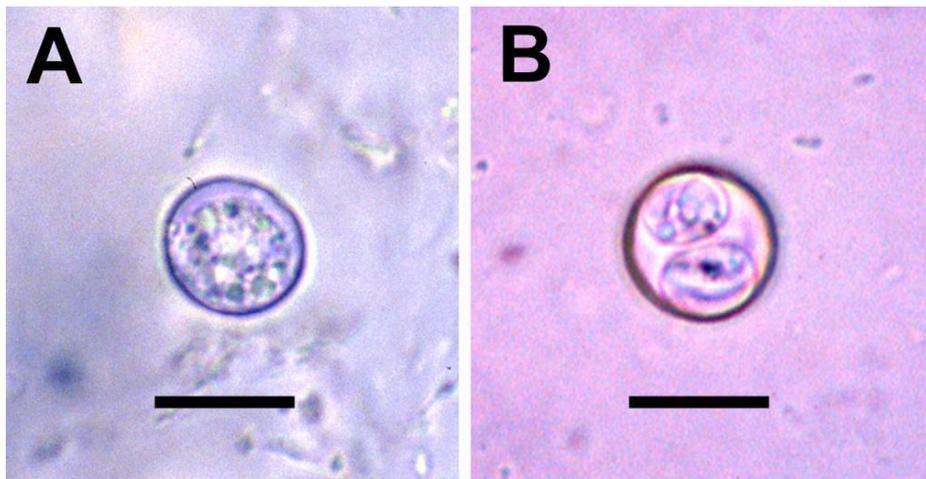


Figura 2: Oocistos de *N. caninum*. A) Oocisto não esporulado e B) Oocisto esporulado contendo dois esporocistos.

Fonte: (Cortesia: Dr. Luís F. P. Gondim). Barra: 10 μ m.

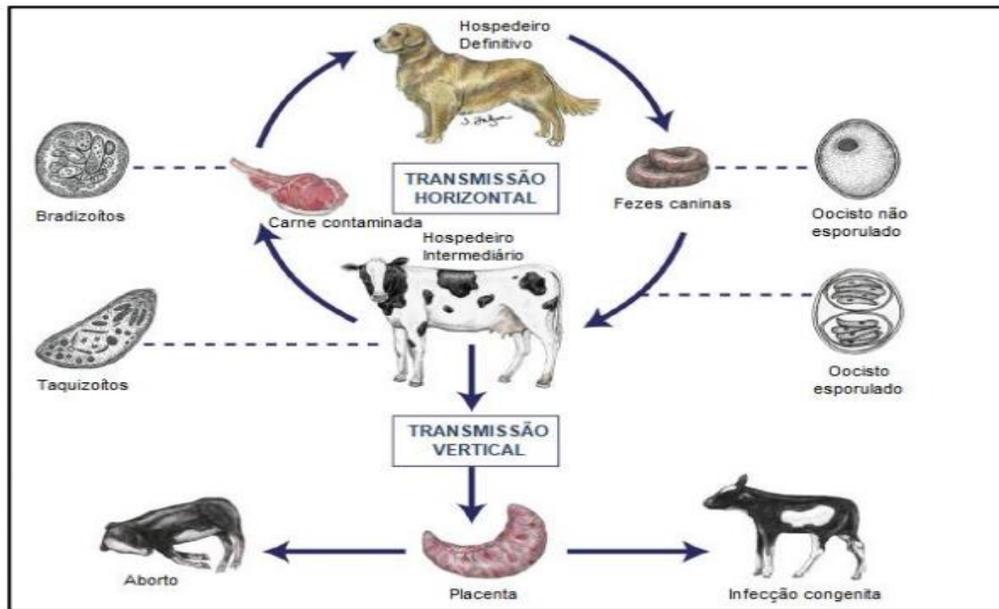


Figura 3: Ciclo de vida de *Neospora caninum*. Nele se observa as formas de transmissão vertical e horizontal do parasito e formas infectivas.

Fonte: Adaptado de Goodswen, Kennedy e Ellis (2013).

3.3 Hospedeiros e vias de transmissão

Os hospedeiros definitivos de *N. caninum* são os canídeos, como cães, lobos, raposas e os coiotes (McALLISTER *et al.*, 1998; GONDIM *et al.*, 2004). Já os hospedeiros intermediários são os bovinos, ovinos, caprinos, equinos, búfalos, cervos, ratos silvestres, raposas e os cães, que podem também figurar como intermediários (ANDERSON *et al.*, 2000; ALMERIA *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2004). Estudos experimentais apontaram que oocistos viáveis foram encontrados apenas em fezes de cães naturalmente infectados (BASSOET *et al.*, 2009a,b), e lobos cinzentos (*canis lupus*) (DUBEY *et al.*, 2003). No entanto, não foram observados oocistos viáveis em fezes de raposas (CONSTANTIN *et al.*, 2011).

A transmissão de *N. caninum* pode ser pela via vertical/endógena, através da infecção congênita ou via transplacentária, e por via horizontal pela ingestão de oocistos esporulados no meio ambiente ou cistos teciduais, por infecção exógena (McALLISTER *et al.*, 1998; DIJKSTRA *et*

al., 2001; WILLIAMS *et al.*, 2009), esta sendo a única forma natural de infecção em bovinos após o nascimento (McCANN *et al.*, 2007).

Segundo Anderson *et al* 2000, a infecção transplacentária é a principal forma de transmissão em bovinos, sendo responsável pela manutenção do ciclo de vida também relatada em equinos, ovinos, caprinos, suínos, felinos, camundongos e primatas não humano, não existindo transmissão de animal para animal.

A transmissão horizontal é mais compreendida em bovinos e cães. Os cães se infectam após ingerirem tecido bovino contendo bradizoítos encistados, sendo esta a principal rota de infecção para os hospedeiros definitivos, que culmina com a formação de oocistos no epitélio intestinal. (LEVINE e IVENS, 1981). Estes oocistos eliminados nas fezes dos cães esporulam no meio ambiente e podem infectar bovinos e outros animais que venham a ingeri-los em água ou alimentos contaminados. Ao serem ingeridos, os oocistos liberam os esporozoítos, podendo causar uma forte resposta inflamatória e destruição tecidual, caracterizando a resposta aguda. Há uma multiplicação rápida dos taquizoítos que se disseminam pelo organismo, estabelecendo, portanto, a infecção (GOODSWEN, KENNEDY e ELLIS, 2013).

3.4 Importância epidemiológica e econômica

A neosporose tem emergido como uma enfermidade grave em bovinos e cães em todo o mundo (DUBEY, 2003). Nos últimos anos os estudos acerca de *N. caninum* têm aumentado, por se tratar de uma enfermidade que afeta rebanhos e estar associado com desordens reprodutivas, principalmente em bovinos, com consideráveis perdas econômicas (INNES *et al.*, 2002; DUBEY, SCHARES e ORTEGA-MORA, 2007).

Segundo Dubey, Schares e Ortega-Mora (2007), para compreender a epidemiologia de *N. caninum*, é importante conhecer sua distribuição geográfica e abrangência do agente na região a ser estudada. Bartels *et al.* (2006) constataram que a soroprevalência de *N. caninum* em bovinos

pode variar entre 16 a 94% entre rebanhos e 0,5 a 30% entre animais, dependendo do país e da região, sendo que esta variação pode ocorrer em função da diferente exposição aos fatores de risco existentes em cada região.

De acordo com Reichel *et al.* (2013), os prejuízos econômicos causados por abortamentos induzidos por *N. caninum* é de 1 bilhão de dólares, podendo chegar a 2-4 bilhões de dólares por ano nos 10 países que representam as maiores potências produtoras de gado no mundo. Os gastos estão relacionados tanto às perdas dos fetos abortados, quanto aos gastos indiretos, como mão de obra profissional, redução da vida reprodutiva e gastos com diagnósticos. No Brasil, as perdas são de aproximadamente 51,3 milhões de dólares na indústria de laticínios e 101,0 milhões de dólares por ano na indústria de carne.

Gondim *et al.*, (1999b) estudaram a soroprevalência da infecção por *N. caninum* em rebanhos leiteiros da Bahia, e observaram positividade de 14,09% nos animais, concluindo que o agente poderia ser uma importante causa de abortos naquela região.

As infecções subclínicas em cães possuem grande importância epidemiológica por serem os hospedeiros definitivos e, portanto, capazes de eliminar oocistos nas fezes. Destaca-se que há uma maior soroprevalência em cães de área rural (20% a 97%) que de área urbana (7% a 26%), sugerindo que cães que vivem em ambientes rurais sofrem maior exposição ao parasito e ressaltando a associação epidemiológica entre bovinos e cães, já que eles podem ter contato com placentas e fetos abortados de bovinos (PATITUCCI *et al.*, 2001; ANTONY e WILLIAMSON, 2003; FERNANDES *et al.*, 2004; LASRI *et al.*, 2004; KING *et al.*, 2012).

Além disso, um importante fator nos dados soroprevalências é a maior prevalência em cães errantes, constituindo 11 a 25% do total analisado, se comparado aos cães domiciliados com 2 a 10%, sugerindo que cães com livre acesso à rua podem apresentar maior chance de exposição ao parasito devido a hábitos de caça (GENNARI *et al.*, 2002; CAÑÓN-FRANCO *et al.*, 2003; AZEVEDO *et al.*, 2005).

3.5 Sinais clínicos

As infecções por *N. caninum* em bovinos comumente são subclínicas, porém o aborto é o principal agravo da enfermidade, sendo geralmente o único sinal clínico observado, podendo ser esporádico, endêmico ou epidêmico (DUBEY, 2003; DONAHOE *et al.*, 2015; McALLISTER, 2016). Vacas com soropositividade para anticorpos anti-*N. caninum* abortam com mais frequência que as soronegativas (DUBEY, 2003). O abortamento causado por *N. caninum* ocorre a partir do terceiro mês de gestação, sendo mais comum entre o quinto e sexto mês (DUBEY e LINDSAY, 2006), podendo os fetos morrerem no útero ou nascerem natimortos. Os bezerros que nascem vivos podem estar clinicamente saudáveis, porém, persistentemente infectados (GHANEM *et al.*, 2009).

A neosporose em cães ocorre geralmente como uma infecção subclínica que pode sofrer reativação durante a gestação, transmitindo a infecção do parasito para o feto por via transplacentária (BUXTON, McALLISTER e DUBEY, 2002). Os casos mais graves da neosporose canina geralmente evoluem para uma doença neuromuscular em cães jovens, que apresentam um quadro de paresia inicial de membros posteriores que progride para a paralisia (DONAHOE *et al.*, 2015).

Já em equinos, a soroprevalência de *Neospora spp.* podem exceder 10%, porém apenas alguns casos de neosporose clínica foram reportados e não se sabe ao certo se o responsável foi *N. caninum*, *N. hughesi* ou ambos (CHEADLE *et al.* 1999). Nos cavalos a neosporose vem associada a mieloencefalite protozoária equina (MEP), doença neurológica debilitante, cegueira, perda de peso, paralisia dos membros posteriores, comportamento bizarro, dificuldade de mastigação, incoordenação, ataxia e aborto (DAFT *et al.*, 1996; MARSH *et al.*, 1996; WALSH *et al.*, 2000; LINDSAY, 2001; PITEL *et al.*, 2003).

3.6 Resposta imunológica

A resposta inata é o primeiro mecanismo de defesa ativado pelo hospedeiro ao detectar a infecção por *N. caninum*, promovendo a liberação de quimiocinas, ativação de leucócitos e citocinas pró inflamatórias (KHAN *et al.*, 1997).

A imunidade é similar à de outros parasitos intracelulares obrigatórios, fundamentalmente mediada por células T, principalmente NK e T CD8⁺, desempenhando um papel crucial no hospedeiro por meio da redução da replicação de *N. caninum* (INNES *et al.*, 2002; MARTINEZ 2017). A resposta imune humoral participa diretamente na neutralização e destruição de taquizoítos extracelulares, controlando a disseminação da infecção (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; INNES *et al.*, 2002).

Dessa forma, em concordância com o observado para outros patógenos intracelulares, os dados indicam que a imunidade protetora do hospedeiro induzida pela infecção por *N. caninum* é tipicamente mediada por um padrão de resposta imune do tipo Th1, que envolve a produção de IFN- γ , IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF), juntamente com a produção de óxido nítrico (NO) (DONAHOE *et al.*, 2015; HECKER *et al.*, 2015).

A resposta pró inflamatória desencadeada pelas citocinas derivadas de Th1 é essencial para controlar a proliferação do parasito e consequente colonização tecidual, porém, esta mesma resposta pode atuar de forma deletéria atingindo a placenta de vacas prenhes, afetando a sua integridade, e, portanto, podendo vir a causar o abortamento ou má-formação fetal (MINEO *et al.*, 2009; MUNOZ, LIESENFELD e HEIMESAAT, 2011; MONNEY e HEMPHILL, 2014; HECKER *et al.*, 2015).

Já as citocinas derivadas de um perfil Th2 medeiam a ativação e manutenção da resposta humoral através da secreção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 e IL-25, e produção de anticorpos (MELLOR 2000; INNES 1995; DARWICH 2016).

Os métodos diagnósticos por sorologia fazem detecção indireta da infecção pelo parasito, através da presença, principalmente, de anticorpos com isotipo IgG. São os mais comumente utilizados para diagnóstico *ante-mortem* da infecção por *N. caninum*, porém, a detecção de anticorpos

circulantes no soro indica apenas que o animal teve contato prévio com o parasito, e não necessariamente apresentou a evolução para a doença clínica (DUBEY, 1987).

3.7 Diagnóstico de *Neospora spp.*

O diagnóstico da neosporose pode ser realizado por detecção de anticorpos específicos (BJÖRKMAN e UGGLA, 1999), visualização de lesões características no cérebro, coração e fígado de fetos abortados, além de combinado com exames de imunohistoquímica (IHQ) de tecidos contendo lesões (ANDERSON, *et al.*, 1991; BARR *et al.*, 1990; GONZÁLES *et al.*, 1999) e sorologia fetal (BUXTON *et al.*, 1998).

Métodos diretos e indiretos podem ser utilizados no diagnóstico da infecção por *Neospora spp.* Entre os métodos diretos estão os exames histopatológico, imunohistoquímico, o isolamento *in vitro* e *in vivo* e PCR (HEMPHILL *et al.*, 2000; HOANE *et al.*, 2006). Dentre os testes indiretos temos a imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), soroaglutinação direta e Western immunoblotting (WB). Os exames sorológicos se tornaram uma ferramenta útil na detecção de anticorpos específicos para neosporose frente a infecção nos bovinos adultos, visto a dificuldade no isolamento do agente (BJÖRKMAN e UGGLA, 1999).

Segundo Moré *et al.* (2008), Reichel, Ross e McAllister (2008) e Wapenaar *et al.* (2007) métodos sorológicos, como IFI e ELISA, são recomendados para o diagnóstico de doenças causadas por protozoários de interesse veterinário, como o *N. caninum*, pois avaliam o contato do agente com o hospedeiro de forma específica por meio da detecção de IgG.

Para se considerar uma infecção ativa por meio da análise sorológica, é preciso ter títulos moderados a altos de anticorpos IgG e IgM específicos para o parasito. Portanto, a sorologia possui limitações para detecção de soros com títulos baixos de anticorpos (ANDREOTTI *et al.*, 2013). Os avanços no desenvolvimento de testes sorológicos específicos, sensíveis e de baixo

custo para *N. caninum* tem sido fundamental para a compreensão da epidemiologia deste parasito. (BJORKMAN e UGGLA, 1999).

Portanto, para determinar um quadro sugestivo de neosporose, deve-se analisar também a presença de sinais clínicos, como os neurológicos. Porém por se tratar de grande parte dos casos a infecção ser assintomática ou apresentar sinais inespecíficos, há dificuldade em estabelecer um diagnóstico clínico da doença. Portanto, diagnósticos laboratoriais devem ser realizados para confirmar a infecção por *Neospora spp* (PACKHAM *et al*, 2002).

De acordo com Dubey, Schares e Ortega-Mora (2007), é importante apontar que, apesar de muito importante, o diagnóstico sorológico ou molecular de tecidos fetais não pode ser usado como único determinante para se confirmar a neosporose como causa do aborto, em função da alta taxa de bezerros saudáveis, mas persistentemente infectados, que nascem com a enfermidade.

3.7.1 Métodos diretos de detecção do agente

3.7.1.1 Reação em cadeia de polimerase - PCR

De acordo com Yao *et al.* (2009), o PCR é um método molecular altamente específico e sensível para o diagnóstico de *N. caninum*. A sensibilidade e especificidade diagnósticas da PCR são influenciadas por alguns fatores importantes como o DNA alvo apropriado, pares de primers específicos, protocolos adequados, métodos de extração, purificação e armazenamento de DNA molde, e uso de reagentes e equipamentos apropriados (DUBEY e SCHARES, 2006).

Os protocolos de PCR envolvem o uso de enzimas como a DNA polimerase, responsável pela adição de desoxirribonucleotídeos durante a replicação, regiões específicas do ácido nucléico pesquisado (primers), desoxirribonucleotídeos (dNTPs), além de outros reagentes. A reação é realizada em termociclador que tem por função realizar ciclos, em diferentes temperaturas, que atuarão no processo de replicação *in vitro* (STEPHENS *et al.*, 2009). Contudo, segundo Jenkins

et al. (2002), o elevado custo para realização do método inviabiliza sua utilização na rotina diagnóstica.

Em um estudo comparativo entre as técnicas de PCR e imuno-histoquímica, Van Maanen *et al.* (2004) observaram que a PCR possui uma maior sensibilidade e especificidade na detecção de *N. caninum* em tecidos fetais bovinos. Dubey e Shares (2006) afirmam que, apesar de sua sensibilidade, apenas os resultados da PCR não são suficientes para determinar a neosporose no animal, sendo necessário também a identificação de lesões características e detecção do parasito associado às lesões.

3.7.1.2 Exame histopatológico

O exame histopatológico pode ser utilizado na detecção direta ao agente, porém, de acordo com Andreotti *et al.* (2003), na maioria dos casos os protozoários estão em número muito pequeno no cérebro, e raramente são observados nos cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (HE). Portanto, torna-se necessário associar a realização da técnica de imuno-histoquímica em tecidos que apresentam lesões, utilizando-se anticorpos anti-*N. caninum* (DUBEY, 2003).

As lesões consideradas diagnósticas estão no cérebro e consistem em focos de infiltrados celulares mononucleares (não supurativos), com ocasionais focos de necrose, estas podendo estar associadas à presença de cistos ou grupos de protozoários nos focos necróticos distribuídos nos tecidos. As outras lesões presentes em coração e fígado, são epicardite e/ou miocardite não supurativas, miosite focal não supurativa e hepatite portal não supurativa, frequentemente com necrose hepática focal e pneumonia intersticial não supurativa focal. (THILSTED e DUBEY, 1989; DUBEY e PORTERFIELD, 1990; DUBEY *et al.*, 1992a; SAWADA *et al.*, 1997; PETERS *et al.*, 2001a; DUBEY 2003; SOLDATI *et al.*, 2004; LEMBERGER *et al.*, 2005; DUBEY *et al.*, 2006).

3.7.1.3 Exame Imunohistoquímico - IHQ

No Brasil a primeira detecção do *N. caninum* foi feita por Gondim *et al.* (1999) pela técnica de imunohistoquímica realizada em tecidos de um feto abortado. Ortega-Mora *et al* (2006) afirmam que o método imunohistoquímico apresenta alta especificidade, porém em fetos autolisados a sensibilidade da técnica é considerada baixa.

O método imuno-histoquímico faz identificação de cistos e taquizoítos do parasito em tecidos fetais e fetos mumificados. Utiliza-se anticorpos específicos anti-*Neospora spp.* empregados em fragmentos teciduais que serão testados, principalmente cortes de cérebro, pulmão, rins e músculo esquelético. Após isso, um anticorpo secundário ligado a uma enzima é adicionado de forma que quando em contato com o substrato há formação de uma coloração identificando a reação antígeno-anticorpo (ANDREOTTI *et al.*, 2003; VAN MAANEN *et. al.*, 2004).

O diagnóstico por meio da imunohistoquímica é considerado mais confiável que apenas a avaliação por coloração com HE (LINDSAY e DUBEY, 1989; SOLDATI *et al.*, 2004; LEMBERGER *et al.*, 2005; CORBELLINI *et al.*, 2006a).

3.7.1.4 Isolamento *in vitro* e *in vivo*

O primeiro cultivo de *N. caninum* foi realizado *in vitro* em monócitos e células endoteliais de bovinos, e, desde então, vem sendo cultivado em rim bovino, fibroblasto humano, encéfalo de ratos neonatos, células VERO (rim de macaco verde africano) e em muitas outras linhagens celulares. O isolamento e cultivo de *N. caninum* permite identificação do parasito, desenvolvimento de pesquisas e estudos sobre a biologia do agente, manipulação genética, bem como produção e manutenção de taquizoítos para testes sorológicos e outras ferramentas diagnósticas (ANDREOTTI *et al.*, 2003). Hemphill *et al* (1999) afirmam que não somente taquizoítos podem ser cultivados *in vitro*, mas também a fase de bradizoíto.

Yamane *et al.* (1998) relataram que isolar *N. caninum* é difícil e pouco bem sucedido, visto que os fetos bovinos abortados por neosporose geralmente encontram-se autolisados e com relativamente pouca quantidade de parasito no cisto tecidual (CONRAD *et al.*, 1993).

Dubey *et al.* (1998) afirmam que as técnicas mais comumente utilizadas para isolar *N. caninum* era inoculação de tecidos infectados em cultura celular ou em camundongos imunossuprimidos ou imunodeficientes. Dubey e Lindsay (2000) concluíram que gerbils (*Meriones unguiculatus*) são susceptíveis à infecção por *N. caninum* mesmo sem induzir imunossupressão, diferentemente dos camundongos (*Mus musculus*), que demonstraram resistência à infecção. Os bioensaios geralmente utilizam camundongos alogênicos, isogênicos, ou deficientes em IFN- γ para *N. caninum* (SCHARES *et al.*, 2005).

3.7.2 Métodos indiretos de detecção do agente

3.7.2.1 Imunofluorescência indireta - IFI

A imunofluorescência indireta foi o primeiro teste sorológico desenvolvido para a detecção de anticorpos IgG anti-*N. caninum* (DUBEY *et al.*, 1988), e foi utilizado por Björkman e Ugglå (1999) como referência para o desenvolvimento de outros testes sorológicos.

O método consiste na fixação de taquizoítos de *N. caninum* em lâminas de microscopia, que são incubadas inicialmente com soros diluídos e em uma segunda etapa, com anticorpos ligados a um conjugado (fluoresceína). Esses anticorpos são direcionados contra as imunoglobulinas da espécie animal sob investigação. A reação é avaliada pela observação da reação em microscopia de epifluorescência (BJORKMAN e UGGLA, 1999).

Esta técnica detecta, fundamentalmente, anticorpos que se unem a antígenos localizados na superfície celular de *N. caninum* (COLLANTES-FERNÁNDEZ *et al.*, 2002). Pela utilização de taquizoítos intactos, assim como a pequena possibilidade de reações cruzadas, fazem da IFI a técnica de eleição para detecção de anticorpos anti-*N. caninum* (BJORKMAN e UGGLA, 1999).

No entanto, segundo Dubey *et al.* (1996) e Björkman *et al.* (1996), existem várias limitações no uso da técnica, como resultados subjetivos, equipamentos específicos, como microscópio de imunofluorescência, além de mão-de-obra capacitada.

3.7.2.2 Ensaio imunoenzimático - ELISA

A facilidade para se processar um grande número de amostras aliado à uma sensibilidade e especificidade acima das encontradas quando se utiliza a IFI, e a subjetividade apresentada pelo referido teste, faz do ELISA o principal método sorológico utilizado na avaliação diagnóstica de rebanhos bovinos (PEREIRA-BUENO *et al.*, 2003), além de ser muito utilizado em estudos epidemiológicos de rebanhos (HEMPHILL *et al.*, 2000).

Bjorkman *et al.* (1997) afirmam que o ELISA possui uma maior especificidade e sensibilidade no diagnóstico sorológico de vacas infectadas com *N. caninum* quando comparado com a IFI.

No entanto, Nishikawa *et al.* (2002) observaram que há reação cruzada com *T. gondii* em soros policlonais de camundongos e gatos testados por ELISA para *N. caninum* usando antígeno bruto. Assim como Björkman *et al.* (1994) em testes de ELISA com antígeno solúvel bruto haviam apresentaram níveis mais altos de reatividade cruzada sorológica para *T. gondii* quando comparados com a IFI (SILVA *et al.* 2007).

Gondim *et al.* (2017) também relataram reatividade cruzada entre *T. gondii* e *N. caninum* quando utilizados ELISA com antígenos brutos. Porém, ao utilizar o ELISA de antígenos recombinantes específicos, não foi observada a reação cruzada entre *T. gondii* e *N. caninum*. Portanto, os autores concluem que o uso do ELISA para anticorpos de *N. caninum* baseados em peptídeos quiméricos específicos para o parasito parece ser promissor.

O princípio do teste consiste em preparar o antígeno adsorvido a uma superfície de plástico, é feita a incubação com o soro diluído, e depois uma enzima é ligada a um conjugado espécie-específico. Ao final, um substrato é adicionado, e havendo a presença do antígeno, há liberação de um produto colorido (BJORKMAN e UGGLA, 1999). Então, tendo presença de produto

colorido, indica que há ligação com o antígeno. Trata-se de um método eficiente pois permite detectar quantidades de proteína da ordem de nanogramas (10^{-9} g) (GOLDSBY, 2002).

No entanto, segundo Hasler *et al.* (2006), é necessária cautela na utilização do ELISA para classificar animais em negativos e positivos para o agente, pois o teste pode apresentar resultados falso-negativos ou falso-positivos.

3.7.2.3 Dot-ELISA

O dot-ELISA tem sido descrito como um método diagnóstico eficiente para doenças infecciosas parasitárias, como por exemplo, a toxoplasmose (PAPPAS *et al.* 1986). Segundo Pinheiro (2001), o Dot-ELISA pode ser utilizado como método diagnóstico quantitativo quando se deseja verificar a concentração do antígeno, ou ainda qualitativo para separar amostras em grupos de positivos ou negativos.

A técnica apresenta boa sensibilidade, rapidez, baixo custo, além de fácil execução, permitindo a detecção de anticorpos mesmo em pequenas quantidades de amostra sem uso de aparelhagem sofisticada. A metodologia baseia-se na sensibilização de membranas de nitrocelulose com antígeno, e posterior adição de um anticorpo marcado com peroxidase, para ocorrência de reação e revelação com formação de cor. Portanto, quando há formação de cor, significa que a amostra é sororreativa (PINHEIRO, 2001; PINHEIRO *et al.* 2006).

3.7.2.4 Soroaglutinação direta

Anticorpos possuem características bivalentes, podendo se ligar de forma cruzada com antígenos não próprios, como por exemplo, os protozoários, resultando em sua aglutinação. As diferentes classes de anticorpos diferem em sua habilidade para aglutinar o mesmo antígeno (TIZARD, 2009). Reações de aglutinação são empregadas para o diagnóstico laboratorial de doenças causadas por vírus, bactérias, protozoários e fungos (FERREIRA e ÁVILA, 1996).

O teste de aglutinação direta modificado para *N. caninum* foi desenvolvido a partir do teste de aglutinação direta para toxoplasmose por Packham *et al.* (1998) e demonstrou-se um teste de execução rápida, de fácil utilização e com sensibilidade (100%) e especificidade (97%) elevada quando comparado com o ELISA. Como não se faz uso de anticorpo secundário marcado, é considerado um teste diagnóstico de simples execução (CANADA *et al.*, 2004).

3.7.2.5 Western immunoblotting

As primeiras versões desse teste moderno foram descritas em 1979 por Harry Towbin e George Stark do Instituto Friedrich Miescher na Suíça e da Universidade de Stanford nos EUA, respectivamente. O nome “Western immunoblotting” foi dado em 1981 por W. Neal Burnette por causa da localização do Centro de Pesquisa do Câncer Fred Hutchinson nos EUA por se localizar na costa oeste do país, sendo uma versão mais aprimorada para detecção de proteína em membrana, dos anteriormente descritos, métodos Southern Blotting, para detecção de DNA em membrana (1975), e Northern Blotting, para detecção de RNA em membrana (1977) (NAJAFOV, 2017). Desde 1979, os protocolos para transferência de proteínas de um gel de eletroforese para membrana têm grandes evoluções em suas técnicas (KURIEN e SCOFIELD, 2006).

A técnica de western immunoblotting, de acordo com alguns autores, iniciou uma nova era no imunodiagnóstico, o qual reduziu significativamente as reações cruzadas que eventualmente ocorriam em outras técnicas moleculares de diagnóstico. O método foi inicialmente utilizado como teste diagnóstico para infecções virais e bacterianas, sendo mais tarde empregado no campo da parasitologia (SARIMEHMETOÚLU, 2002).

As técnicas eletroforéticas, como o Western imunoblotting, tiveram importante papel na evolução da biologia celular moderna. Estas técnicas e suas aplicações contribuíram significativamente para a compreensão das bases moleculares da estrutura e funções celulares. A versatilidade das técnicas eletroforéticas, juntamente com facilidade de uso, baixo custo, velocidade e alta resolução é incomparável com qualquer outro método utilizado para separação de proteínas.

Mesmo após mais de 30 anos após a primeira publicação, a técnica continua a ser amplamente utilizada e referenciada (BONIFACINO, 2011).

Também conhecido como immunoblotting, é um método diagnóstico utilizado para detecção proteica, utilizando anticorpos específicos para obter informações acerca da proteína alvo da amostra a ser analisada. O método pode mensurar quantidade, peso molecular e modificações pós-traducionais das proteínas. Devido ao anticorpo ter alta afinidade em relação aos seus epítomos, faz deste um método muito sensível mesmo em picogramas das proteínas alvo podem ser detectadas (NAJAFOV, 2017). É usado como método confirmatório no diagnóstico de infecção por *N. caninum*, devido a suas vantagens na detecção proteica (HEMPHILL *et al.*, 1996).

Uma variedade de antígenos são secretados e excretados pelos parasitos, e estes estão presentes no sangue, fezes, urina e outros fluídos do hospedeiro infectado. Estes antígenos têm potencial para serem utilizados, por exemplo, no imunodiagnóstico da enfermidade (ADEL-RAHMAN, 1999). Os antígenos mais comumente citados na literatura apresentam peso molecular de 17, 22, 29, 30, 31, 33, 35, 37, 42, 43, 56, 62, 68 e acima de 94 KDa (SCHARES *et al.*, 2000/2001; MINEO *et al.*, 2001). Assim, o reconhecimento de três ou quatro antígenos imunodominantes de 17, 29/30, 37 e 46 KDa no soro de vacas naturalmente infectadas é considerado como confirmação da infecção (SCHARES *et al.*, 1998).

A realização da técnica do Western immunoblotting pode ser resumida em quatro etapas: fracionamento de proteínas a partir de eletroforese em gel, transferência das proteínas fracionadas para membrana adsorvente, bloqueio de ligações inespecíficas e incubação com anticorpos que será ligado à proteína específica a ser analisada e revelação da membrana para análise do resultado (TOWBIN *et al.*, 1979; BURNETTE, 1981; TOWBIN e GORDON, 1984).

Na extração e quantificação de proteínas, podem ser utilizados como fonte proteica para amostras: tecidos, culturas celulares e fluidos corporais, como plasma ou líquido cefalorraquidiano, além de proteínas de agentes infecciosos, como protozoários, vírus e outros.

Após coleta e armazenamento do tecido a ser utilizado, é realizada a homogeneização da amostra, a fim de fragmentar a proteína em pequenas partículas para facilitar a solubilização, além de remover ácidos nucleicos, substâncias insolúveis, proteínas abundantes ou qualquer partícula de tecido. A homogeneização pode ser realizada por métodos mecânicos, ultrassônicos, por pressão, por descongelamento e osmótica ou lise por detergentes (BODZON-KULAKOWSKA *et al.*, 2007).

O fracionamento de proteínas é realizado por eletroforese, onde há o processo de separação de proteínas e outras moléculas que migram induzidas por um campo elétrico (VESTERBERG, 1989). A técnica mais utilizada para separação destas proteínas é por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)(Figura 4). Quando submetidas a um campo elétrico em pH neutro, as moléculas de proteína são atraídas para o polo positivo e repelidas do polo negativo (SILVA & SOUSA, 2002)(Figura 5).

Pagano (1999) afirma que o gel age como uma peneira molecular. Pequenas proteínas movem através do gel mais rápido que proteínas maiores. Quanto mais alta a concentração de acrilamida, menores são os poros do gel e as proteínas se movem mais lentamente. Entretanto, géis com alta concentração de acrilamida são usados para determinar proteínas de tamanho pequeno, como é o caso das proteínas de peso molecular de *N. caninum*, e géis com baixas concentrações de acrilamida são usados na determinação de proteínas grandes.

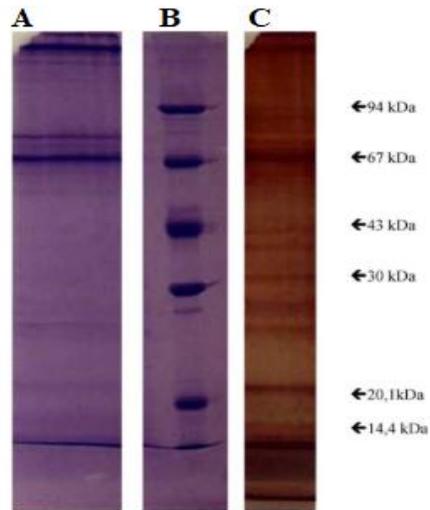


Figura 4: Representação de gel SDS-PAGE com marcação das bandas de peso molecular (kDa) de *N. caninum* corados com: A) e B) Coomassie Blue e C) Nitrato de prata.

Fonte: Adaptado de PINHEIRO (2005).

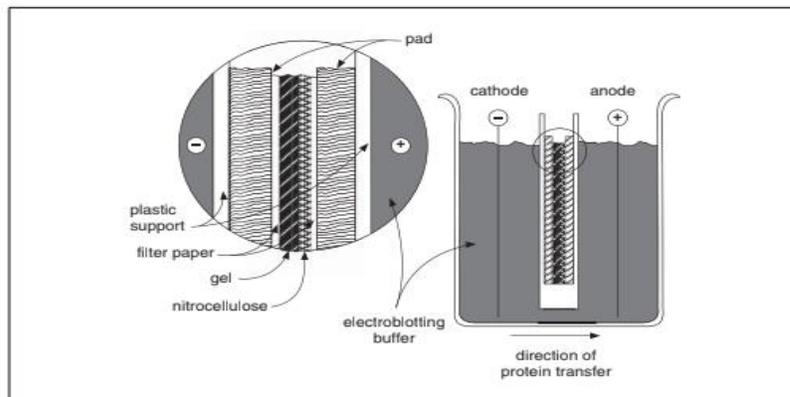


Figura 5: Cuba para transferência de proteínas por eletroforese e indicação do funcionamento interno.

Fonte: Adaptado de NI et al. (2017)

A transferência para membrana é realizada para que as proteínas sejam acessíveis à detecção específica por anticorpos, por meio da transferência destas do gel submetido a eletroforese para esta membrana adsorvente (PAGANO, 1999)(Figura 6).

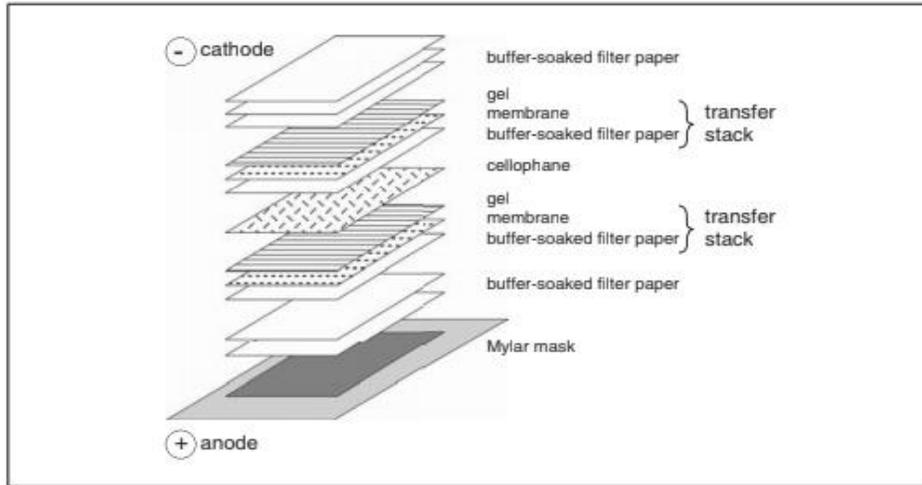


Figura 6: Representação da montagem do “sanduíche” para transferência do gel para a membrana adsorvente.

Fonte: Adaptado de Ni et al. (2017).

Na fase de bloqueio e incubação, a membrana é imersa em solução de bloqueio, comumente usa-se leite desnatado, para impedir ligações inespecíficas. Em seguida, é colocado o anticorpo primário, que irá se ligar especificamente ao epítipo do antígeno proteico, formando assim uma ligação do tipo antígeno-anticorpo (NI *et al.*, 2017).

Posteriormente, esta reação antígeno/ anticorpo primário será incubada a um anticorpo secundário (PAGANO, 1999), um anti-IgG, ou seja, um anticorpo reagindo a outro anticorpo, sendo este da mesma espécie utilizada na produção do anticorpo primário (anti-mouse, anti-rabbit). O anticorpo secundário geralmente está ligado a uma enzima reveladora que irá produzir uma mudança de cor (KURIEN e SCOFIELD, 2003)(Figura 7).

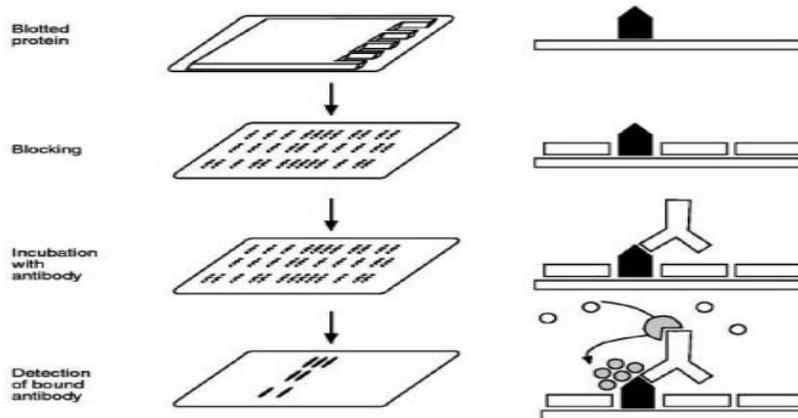


Figura 7: Esquema de uma imunodeteção por Western immunoblotting, à direita mostra-se os componentes microscópicos da reação.

Fonte: Adaptado de Towbin (1998).

Para revelação e análise dos resultados, pode-se utilizar dois métodos para detecção dos antígenos: o radioativo e o imunoenzimático. O método radioativo é menos utilizado por apresentar alto custo para sua execução, bem como riscos à saúde. Já a quimioluminescência, mais utilizada, necessita de incubação de um substrato fluorescente, que quando ligado a enzima reveladora associada ao anticorpo secundário, gera um produto colorido. A imagem é capturada em filme fotográfico ou câmeras específicas que digitalizam a imagem do Western immunoblotting, que serão analisadas quantitativamente por densitometria (KURIEN e SCOLFIED, 2006) (Figura 8).

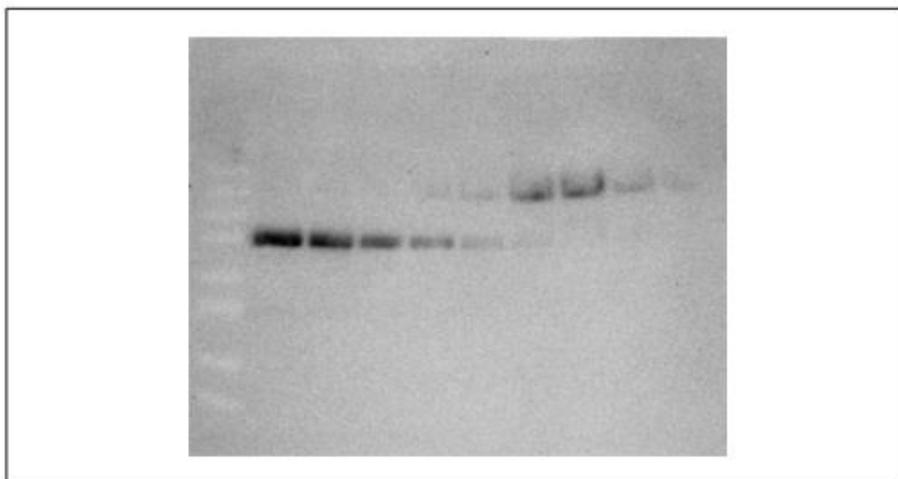


Figura 8: Membrana revelada por aparelho de quimioluminescência em exposição por 5 minutos.

Fonte: Adaptado de NI et al. (2017).

3.8 Controle e tratamento da Neosporose

As atuais estratégias para controle da neosporose envolvem medidas de biosseguridade e gestão agrícola (BARTLEY *et al.*, 2013). Bruhn *et al.* (2012) afirmam que medidas sanitárias inadequadas estão diretamente relacionadas com maiores taxas de soropositividade em bovinos.

Dentre as medidas de prevenção para neosporose, as mais utilizadas são o uso de receptoras soronegativas em programas de reprodução como a TE (transferência de embrião), limitar o acesso de canídeos a tecidos que podem estar infectados com o parasito, como materiais de aborto, bem como o acesso aos comedouros e bebedouros (REITEROVA *et al.*, 2009) além de controle de roedores (DUBEY, SCHARES E ORTEGA-MORA, 2007).

Dubey *et al.* (2007) aponta que o controle sanitário limita o ciclo de vida do parasito e conseqüentemente reduz a presença do protozoário na propriedade. Segundo Dubey *et al.* (2007a), diversas maneiras de controle vêm sendo discutidas para reduzir a infecção por *N. caninum* nos rebanhos, como técnicas de transferência de embrião (TE), inseminação artificial (IA), novilhas de substituição, quimioterapia e vacinação. Dubey, Schares e Ortega-Mora (2007) afirmam que a maneira mais eficaz para prevenção e controle da neosporose é conhecer o histórico reprodutivo e realização de soropidemiologia do rebanho.

Apesar de muitas pesquisas realizadas na área, ainda não há uma vacina eficaz contra neosporose que controle a carga parasitária, evite abortamentos e a transmissão vertical. A única vacina desenvolvida contra a neosporose (Bovilis Neoguard®) foi retirada do mercado por apresentar possível relação com o aumento de morte embrionária precoce (MONNEY e HEMPHILL, 2014; WESTON; HEUER; WILLIAMSON, 2012), visto que a resposta imune contra o parasito em si é potencialmente patogênica para o feto, principalmente no primeiro terço da gestação (WILLIAMS *et al.*, 2006).

De acordo com TAYLOR *et al.* (2010), não existe tratamento eficaz para neosporose em bovinos. Neves *et al* (2010) afirma que a eficácia da terapia medicamentosa utilizada geralmente é baixa, além de possuir limitantes como resíduos de componentes químicos nos subprodutos bovinos, como carne e leite (ANDREOTTI *et al.*, 2003).

.4.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por causar grandes impactos econômicos na produção bovina, a neosporose desde sua identificação parasitária é alvo de muito estudo entre os pesquisadores de todo o mundo, inclusive no Brasil.

Para diminuir a ocorrência de neosporose na bovinocultura, deve-se aliar as práticas de biosseguridade para controle do agente nas propriedades rurais, bem como estabelecer diagnósticos eficazes para detecção do parasito, e conseguinte a isso, tratamento dos animais contaminados.

A evolução das técnicas de diagnóstico molecular, faz do Western immunoblotting um método eficaz para detecção de inúmeras enfermidades, por ser altamente sensível e específico e de rápido resultado.

O diagnóstico por Western immunoblotting na medicina veterinária ainda é pouco utilizado por ter um custo mais elevado se comparado a outras técnicas diagnósticas, bem como necessita de mão-de-obra qualificada.

Ademais, para diagnóstico da neosporose, por razão da confiabilidade nos resultados, a técnica é utilizada como confirmação diagnóstica.

5.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEL-RAHMAN, S., O'REILLY, K.L., MALONE, J.B.: Biochemical characterization and localization of Fasciola hepatica 26-28 kDa diagnostic coproantigen. *Parasit. Immunol.* 1999; 21: 279-286.

ANDERSON, M.L. et al. Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.198, p.241-244, 1991.

ANDERSON, M.L. et al. Neosporosis in cattle. *Animal Reproduction Science*, v.60, p.417-431, 2000.

ANDREOTTI, R.; PINCKNEY, R.; GOMES, A. Diagnóstico sorológico de Neospora caninum em rebanho bovino de corte do Mato Grosso do Sul. In: Seminário brasileiro de parasitologia veterinária, 11., 1999, Salvador. Anais.... Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999, p. 226

ANDREOTTI, R. et al. Diagnóstico e controle da neosporose em bovinos. Campo Grande: Embrapa, (Documentos 136), 2003. 51p.

ANTONY, A.; WILLIAMSON, N. B. Prevalence of antibodies to Neospora caninum in dogs of rural or urban origin in central New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 51, p. 232-237, 2003

ATKINSON, R. et al. Progress in the serodiagnosis of Neospora caninum infections in cattle. *Parasitology Today*, v.16, p.110-114, 2000a.

ATKINSON, R.A. et al. Seroprevalence of Neospora caninum infection following an abortion outbreak in a dairy cattle herd. *Australian Veterinary Journal*, v.78, p.262-266, 2000b.

AZEVEDO S.S., BATISTA C.S.A., VASCONCELLOS S.A., AGUIAR DM, RAGOZO AMA, RODRIGUES AAR, et al. Seroepidemiology of Toxoplasma gondii and Neospora caninum in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. *Res Vet Sci* 2005; 79(1): 51-56

BARR, B.C. et al. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. *Veterinary Pathology*, v.27, p.354-361, 1990.

BARTELS, C. J. M. et al. Supranational comparison of Neospora caninum seroprevalences in cattle in Germany, the Netherlands, Spain and Sweden. *Veterinary Parasitology [S.I.]*, v. 137, p. 17-27, 2006.

- BJÖRKMAN, C. et al. Neospora caninum in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasite Immunology*. v.16, p. 643–648, 1994.
- BJÖRKMAN, C. et al. An indirect enzymelinked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to Neospora caninum in serum and milk of cattle. *Veterinary Parasitology*, v.68, p.251- 260, 1997.
- BJÖRKMAN, C., UGGLA, A. Serological diagnosis of Neospora caninum infection. *Int J Parasitol* 1999; 29(10): 1497-1507.
- BJERKÅS, I., MOHN, S.F., PRESTHUS, J., 1984. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenkd.* 70, 271–274
- BONIFACINO, J. S.; *Current Protocols in Cell Biology* 6.0.1-6.0.3, September 2011
- BUXTON, D., MALEY, S.W., WRIGHT, S., THOMSON, K.M., RAE, A.G., INNES, E.A., 1998. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *J. Comp. Pathol.* 118, 267–279.
- BURNETTE, W.N. 1981. Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112:195-203.
- CANADA, N., MEIRELES, C.S., ROCHA, A., CORREIA DA COSTA, J.M., ERICKSON, M.W., DUBEY, J.P., 2002. Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from naturally-infected aborted bovine fetuses. *J. Parasitol.* 88, 1247–1248.
- CAÑÓN-FRANCO W.A., BERGAMASCHI D.P., LABRUNA M.B., CAMARGO L.M.A., SOUZA SLP, SILVA JCR, et al. Prevalence of antibodies to Neospora caninum in dogs from Amazon, Brazil. *Vet Parasitol* 2003; 115(1): 71-74.
- CERQUEIRA-CÉZAR, C. K., CALERO-BERNAL, R., DUBEY, J. P., GENNARI, S. M. All about neosporosis in Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol.*, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 253-279, july-sept. 2017.
- CHEADLE, M.A. et al. (1999) Prevalence of antibodies to Neospora caninum in horses from Alabama and characterisation of an isolate recovered from a naturally infected horse. *Int. J. Parasitol.* 29, 1537–1543
- COLLANTES-FERNANDEZ, E., ZABALLOS, A., ALVAREZ-GARCIA, G., ORTEGA-MORA, L.M., 2002. Quantitative detection of Neospora caninum in bovine aborted foetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. *J. Clin.Microbiol.* 40, 1194–1198.

CONSTANTIN, E.M.; G. SCHARES, E. GROSSMANN, K. SAUTER, T. ROMIG, S. HARTMANN, Studies on the role of the red fox (*Vulpes vulpes*) as a potential definitive host of *Neospora caninum*, Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 124 (2011) 148e153.

DIJKSTRA, T.H. et al. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dair herds. *International Journal for Parasitology*, v.31, p.209-215, 2001.

DONAHOE, S.L.; S.A. LINDSAY, M. KROCKENBERGER, D. PHALEN, J. SLAPETA, A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife, *Int. J. Parasitol. Parasites Wild* 24 (2015) 216e238.

DUBEY, J.P., DAVIS S.W., SPEER C.A., BOWMAN D.D., LAHUNTA A., GRANSTROM D.E., et al. *Sarcocystis neurona* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa), the etiologic agent of equine protozoal myeloencephalitis. *J Parasitol* 1991; 77(2):

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

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

DUBEY, J.P., Neosporosis in cattle. *J. Parasitol.* 89 (Suppl.), S42–S56. 2003.

DUBEY, J.P. Neosporosis in cattle. *The Journal of Parasitology*, v.89, p.S42-S56, 2003a.

DUBEY, J.P.; G. SCHARES, L.M. ORTEGA-MORA, Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*, *Clin. Microbiol. Rev.* 20 (2007) 323e367.

DUBEY, J.P., JENKINS M.C., RAJENDRAN C., MISKA K., FERREIRA L.R., MARTINS J, et al. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 2011; 181(2-4): 382-387.

DUBEY J.P., HATTEL A.L., LINDSAY D.S.; TOPPER, M.J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J Am Vet Med Assoc* 1988; question. *Int J Parasitol* 2013; 43(2): 133-142.

DUBEY, J.P.; L.C. GASBARRE, Maternal and fetal immune response patterns in heifers experimentally infected with *Neospora caninum* in the second trimester of pregnancy-a descriptive study, *Vet. Parasitol.* 204 (2014) 146e152.

ELLIS, J.T. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle: the billion dólar

FERNANDES, B.C.T.M., GENNARI S.M., SOUZA S.L.P., CARVALHO J.M., OLIVEIRA W.G., CURY M.C. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city of Uberlândia, Minas Gerais - Brazil. *Vet Parasitol* 2004; 123(1-2): 33-40.

GENNARI, S.M., YAI L.E.O., D'ÁURIA S.N.R., CARDOSO S.M.S., KWOK O.C.H., JENKINS M.C., et al. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of São Paulo, Brazil. *Vet Parasitol* 2002; 106(2): 177-179.

GOODSWEN, S.J., KENNEDY P.J., ELLIS J.T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. *Infect Genet Evol* 2013;

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J. & OSBORNE, B.A. *Kuby Imunologia*. 4^a ed. Rio de Janeiro, Revinter, 2002.

GONDIM, L.F.P., SARTOR I.F., HASEGAWA M., YAMANE I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Vet Parasitol* 1999; 86(1): 71-75.

GONDIM, L.F.P. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.86, p. 71-75, 1999a.

GONDIM, L.F.P. et al. *Neospora caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil. *New Zealand Veterinary Journal*, v.47, p.35, 1999b.

GONDIM L.F., PINHEIRO A.M., SANTOS P.O., JESUS E.E., RIBEIRO M.B., FERNANDES H.S., et al. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. *Vet Parasitol* 2001; 101(1): 1-7.

GONDIM L.F.P., MCALLISTER M.M., PITT W.C., ZEMLICKA D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 2004; 34(2): 159-161.

GONDIM L.F., LINDSAY D.S., MCALLISTER M.M. Canine and bovine *Neospora caninum* control sera examined for cross-reactivity using *Neospora caninum* and *Neospora hughesi* indirect fluorescent antibody tests. *J Parasitol* 2009; 95(1): 86-88.

GONDIM, L.F.P., MINEO, J.R., SCHARES, G. Importance of serological cross-reactivity among *Toxoplasma gondii*, *Hammondia* spp., *Neospora* spp., *Sarcocystis* spp. and *Besnoitia besnoiti*. Review article, 2017.

HASLER, B. et al. *Neospora caninum*: Serological follow-up in dairy cows during pregnancy. *Veterinary Parasitology [S.I.]*, v. 137, n. 3-4, p. 222-230, 2006.

HEMPHILL A. The host-parasite relationship in neosporosis. *Adv Parasitol* 1999;43:48-104.

HOANE J.S., GENNARI S.M., DUBEY J.P., RIBEIRO M.G., BORGES A.S., YAI L.E., et al. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora* spp. infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. *Vet Parasitol* 2006; 136(2): 155-159.

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

INNES E.A.; S. WRIGHT, P. BARTLEY, S. MALEY, C. MACALDOWIE, I. ESTEBAN-REDONDO, D. BUXTON, The host-parasite relationship in bovine neosporosis, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108 (2005) 29e36.

JENKINS, M. et al. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *International Journal for Parasitology*, v.32, p.631-636, 2002.

KHAN, I. A. et al. *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. *Exp Parasitol.*, v. 85, p. 24-34, 1997.

KING, J.S., SLAPETA, J., JENKINS, D.J., AL-QASSAB, S.E., ELLIS, J.T. AND WINDSOR, P.A. (2010). Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology* 40, 945–950.

KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. Western blotting. *Methods. San Diego.* V.38, p.283-293, 2006.

LASRI, S.; De MEERSCHMAN, F.; RETTIGNER, C.; FOCANT, C.; LOSSON, B. Comparison of three techniques for the serological diagnosis of *Neospora caninum* in the dog and their use for epidemiological studies. *Veterinary Parasitology*, v. 123, p. 25-32, 2004

LEVINE, N.D. AND IVENS, V. (1981). *The Coccidian Parasites (Protozoa. Apicomplexa) of Carnivores*, 1st Edn. University of Illinois Press, Champaign.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). *The Journal of Parasitology, Lawrence*, v. 76, n. 3, p. 410-413, 1990

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

LOCATELLI-DITTRICH, R. et al. Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Paraná, southern Brazil. *Veterinary Record*, v.153, p.366- 367, 2003.

MARSH A.E., BARR B.C., PACKHAM A.E., CONRAD P.A. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). *J Parasitol* 1998;

MCALLISTER M.M., DUBEY J.P., LINDSAY D.S., JOLLEY W.R., WILLS R.A., MCGUIRE A.M. Rapid communication: dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 1998; 28(9): 1473-1478.

MCALLISTER, M.M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, v.28, p.1473-1478, 1998.

- MELLOR, A.L., D.H. MUNN, Immunology at the maternal-fetal interface: lessons for T cell tolerance and suppression, *Ann. Rev. Immunol.* 18 (2000) 367e391.
- MINEO T.W.P., CARRASCO A.O.T., MARCIANO J.A., WERTHER K., PINTO A.A., MACHADO R.Z. Pigeons (*Columba livia*) are a suitable experimental model for *Neospora caninum* infection in birds. *Vet Parasitol* 2009;
- MONNEY, T.; HEMPHILL, A. Vaccines against neosporosis: what can we learn from the past studies? *Experimental Parasitology*, v. 140, p .52-70, 2014
- MORÉ, G. et al. Diagnosis of *Sarcocystis cruzi*, *Neospora caninum*, and *Toxoplasma gondii* infections in cattle. *Parasitology Research [S.I.]*, v. 102, n. 4, p. 671-675, 2008.
- NAJAFOV, A., & HOXHAI, G. Introduction. *Western Blotting Guru*, 1–3. doi:10.1016/b978-0-12-813537-2.00001-1, 2017.
- NEVES, A.C. O paradigma do príon. *Revista Neurociências. São Paulo.* v.11, n.1, p.40-45, 2003.
- NI, D., XU, P., AND GALLAGHER, S. 2017. Immunoblotting and immunodetection. *Curr. Protoc. Immunol.* 114:8.10.1-8.10.36.
- ORTEGA-MORA, L. M.; FERRE, I.; DEL-POZO, I.; CAETANO-DA-SILVA, A.; FERNANDEZ, E. C.; CERRILLO, J. R.; GARAGALZA, C. U.; ADURIZ, G. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. *Veterinary Parasitology*, v. 117, p. 301-308, 2003.
- PAGANO, M. Application of electrophoresis and related methods, such as western blotting and zymography to the study of some proteins and enzymes. *Analytica Chimica Acta. Amsterdam.* v.383, p.119-125, 1999.
- PATITUCCI , A. N. et al. Sera antibodies to *Neospora caninum* in Chilean horses. *Archivos de Medicina Veterinaria.* v. 36, n 2, p. 203-206, 2004.
- PEREIRA-BUENO, J.; QUINTANILLA-GOZALO, A.; PÉREZ-PÉREZ,V.; ESPIFELGUEROSO, A.; ÁLVAREZ-GARCIA,G.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; ORTEGA-MORA, L. M. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. *Veterinary Parasitology, Amsterdam*, v. 111, n. 2-3, p. 143-152, 2003
- PETERS, M. ET AL. (2001) *Neospora caninum* infection associated with stillbirths in captive antelopes (*Tragelaphus imberbis*). *Vet. Parasitol*, 97, 153–157
- PINHEIRO, A.M. et al. Serologic immunoreactivity to *Neospora caninum* antigens in dogs determined by indirect immunofluorescence, western blotting and dot-ELISA. *Veterinary Parasitology, Amsterdam*, v.130, n. ½, p.73-79, June 2005.

PINHEIRO, R.R. 2001. Virus da artrite encefalite caprina: desenvolvimento e padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot-Blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará. Dissertação de Doutorado, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

PINHEIRO, R.R., CHAVES C.D.O., GUIMARÃES A.M.G., COSTA S.A. & ANDRIOLI A. 2006. Desenvolvimento de dot-blot para detecção de anticorpos para o vírus da Artrite Encefalite Caprina em caprinos. *Revta Port. Ciênc. Vet.* 101:51-56.

PITEL, P.H., LINDSAY, D.S., CAURE, S., ROMAND S., PRONOST S., GARGALA G., et al. Reactivity against *Sarcocystis neurona* and *Neospora* by serum antibodies in healthy French horses from two farms with previous equine protozoal myeloencephalitis-like cases. *Vet Parasitol* 2003; 111(1): 1-7.

REICHEL M.P.; A.M. AYANEGUI-ALCERRECA, L.F. GONDIM, J.T. ELLIS, What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question, *Int. J. Parasitol.* 43 (2013) 133e142.

REITEROVA, K. et al. *Neospora caninum*, potential cause of abortions in dairy cows: The current serological follow-up in Slovakia. *Veterinary Parasitology [S.I.]*, v. 159, n. 1, p. 1-6, 2009.

RODRIGUES, A.A.R., GENNARI S.M., AGUIAR D.M., SREEKUMAR C, HILL DE, MISKA KB, et al. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. *Vet Parasitol* 2004; 124(3-4): 139-150.

SARIMEHMETOĞLU, H.O. Application of Western Blotting for the immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* in cattle using excretory/secretory antigens. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, Ankara. v.26, p.1061-1065, 2002.

SCHARES, G, PETERS M, WURM R, BÄRWALD A, CONRATHS FJ. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet Parasitol* 1998; 80(2): 87-98.

SCHARES, G, RAUSER M, ZIMMER K, PETERS M, WURM R, DUBEY J.P., et al. Serological differences in *Neospora caninum*-associated epidemic and endemic abortions. *J Parasitol* 1999; 85(4): 688-694

SILVA, D.A., LOBATO, J., MINEO, T.W. AND MINEO, J.R. (2007). Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of crossreactivity with *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology* 143, 234–244.

SÖNDGEN, P. et al. Bovine neosporosis: immunoblot improves foetal serology. *Veterinary Parasitology*, v.102, p.279-290, 2001.

STEPHENS, P.R.S.; OLIVEIRA, M.B.S.C.; RIBEIRO, F.C.; CARNEIRO, L.A.D. Capítulo 2 Virologia. In: Molinaro, E.M.; Caputo, L.F.G.; Amendoeira, M.R.R. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde, volume 4, Rio de Janeiro, EPSJV; IOC, 2009.

TAUBERT, A. et al. Toxoplasma gondii and Neospora caninum infections of bovine endothelial cells induce endothelial adhesion molecule gene transcription and subsequent PMN adhesion. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, Netherlands, v.112, n° 3-4, p. 272-283, Aug., 2006.

THILSTED, J.P. & DUBEY, J.P. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *J Vet Diagn Invest* 1989; 1 : 205–209.

TIZARD, I. R. *Imunologia veterinária: uma introdução*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

TOWBIN, H., STAEGELIN, T., AND GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:4350-4354.

VAN MAANEN, C. et al. An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. *Veterinary Parasitology*, v. 126, n. 4, p. 351-64, 2004.

WALSH, P.S., METZGER, D.A., HIGUCHI, R., 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR based typing from forensic material. *Biotechniques* 10, 506–513.

WAPENAAR, W. et al. Comparison of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. *Veterinary Parasitology [S.I.]*, v. 143, n. 2, p. 166-173, 2007.

YAMANE, I. et al. (1998) An improved isolation technique for bovine *Neospora* species. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10, 364–368

YAO, L. et al. Detection of *Neospora caninum* in aborted bovine fetuses and dam blood samples by nested PCR and ELISA and seroprevalence in Beijing and Tianjin, China. *Parasitology [S.I.]*, v. 136, n. 11, p. 1251-1256, 2009.

