



CAROLINA DE OLIVEIRA CATA PRETA

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum* EM
COLOSTRO E LEITE DE CABRAS NATURALMENTE
INFECTADAS**

**LAVRAS – MG
2024**

CAROLINA DE OLIVEIRA CATA PRETA

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum* EM COLOSTRO E LEITE
DE CABRAS NATURALMENTE INFECTADAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do curso de Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia Veterinária, para obtenção de título de Mestre.

Prof. (a) Dr. (a) Mary Suzan Varaschin

Orientadora

**LAVRAS – MG
2024**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Cata Preta, Carolina de Oliveira.

Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em colostro e
leite de cabras naturalmente infectadas / Carolina de Oliveira Cata
Preta. - 2024.

47 p. : il.

Orientador(a): Mary Suzan Varaschin.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Caprinos. 2. Sorologia. 3. Colostro e leite. I. Varaschin,
Mary Suzan. II. Título.

CAROLINA DE OLIVEIRA CATA PRETA

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum* EM COLOSTRO E LEITE
DE CABRAS NATURALMENTE INFECTADAS**

**DETECTION OF ANTI-*Neospora caninum* ANTIBODIES IN COLOSTRUM AND
MILK OF NATURALLY INFECTED GOATS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do curso de Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia Veterinária, para obtenção de título de Mestre.

APROVADA em 05 de agosto de 2024.

Dr. Djeison Lutier Raymundo – UFLA.

Dr. Luiz Daniel de Barros – UFLA

Dra. Bruna Resende Chaves (Centro Universitário de Lavras - UNILAVRAS).

Prof. (a) Dr. (a) Mary Suzan Varaschin

Orientadora

LAVRAS – MG

AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos por mais esta etapa concluída em minha vida, primeiramente a Deus, aos meus pais, Beatriz e Celso, que são minha base, meu suporte e a minha força desde sempre.

Agradeço aos meus amigos de Três Corações em especial ao Luis Otávio, que sempre esteve presente durante esse período.

Aos meus colegas da pós-graduação, que se tornaram minha família em Lavras, em especial Daiane, minha irmã de outra mãe, Daniella, Jéssika, Maristela, aos que saíram antes de mim, Laís, Lucas, Maíra, vocês são amigos que levarei por toda vida!

Agradeço a todos os meus colegas e estagiários, aos meus coorientados de iniciação científica, Pedro, Luan e Guilherme, que sempre foram de extrema dedicação. Ao núcleo de estudos PATHOS, que teve um papel essencial no meu crescimento pessoal e profissional.

Aos professores da patologia, muito obrigada por todos os ensinamentos, professora Angélica, professor Flademir e professor Djeison, em especial professora Mary, sua orientação e apoio sempre foram muito importantes para mim.

Agradeço ao meu namorado, Amom, que tem sido tão compreensivo e paciente nessa reta final, me dando total apoio.

Agradeço ao meu gato e filho de quatro patas, Simba, que esteve comigo durante toda minha formação profissional, me trazendo alegrias, me fazendo companhia nos estudos e me confortando nos momentos de cansaço.

Agradeço ao Sr. Francisco por todas as conversas e ajuda no setor.

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa de mestrado, a FAPEMIG pelo auxílio financeiro (Processo APQ-01699-22) e à UFLA.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Neosporose é uma doença parasitária responsável por grandes perdas econômicas na indústria mundial da bovinocultura de corte e leite. Em caprinos, as complicações em fêmeas prenhas incluem abortos, natimortos e nascimento de animais fracos ou normais, mas infectados. Como métodos de diagnóstico, pode ser utilizado a detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* no soro pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e a pesquisa de lesões e do parasito em fetos abortados, associados à marcação imuno-histoquímica ou a detecção do DNA de *N. caninum* nos tecidos. A detecção de anticorpos-anti *N. caninum* no leite de bovinos tem apresentado boa concordância quando comparados aos títulos sanguíneos por meio da RIFI. Em cabras não existem estudos que comparem os títulos de anticorpos no colostro e leite com o soro sanguíneo. Sendo assim o objetivo deste estudo é identificar anticorpos anti-*Neospora caninum* em colostro e leite de cabras naturalmente infectadas e avaliar a cinética de anticorpos. Foram utilizadas nove cabras naturalmente infectadas, confirmadas pela presença de anticorpos anti-*N. caninum* pela RIFI e três cabras soronegativas como controles negativos. Foram coletadas amostras de sangue das cabras no dia do parto (mãe e filhote antes de mamar o colostro) e mensalmente da mãe até o dia 120 pós-parto. Também foram coletados 10 mL de colostro e de leite através de ordenha manual no dia do parto (D0), dia 3 (D3), D6, D9, D12, D15, D30, D60, D90 e D120, totalizando 81 amostras de animais positivos. Os resultados demonstraram que foram detectados anticorpos anti-*N. caninum* em 100% das amostras de soro (9/9) no dia do parto, em 88,88% do colostro (8/9) e em 58,33 % (42/72) das amostras de leite, considerando que uma cabra foi eutanasiada ao longo do período experimental, sendo que cabras com títulos maiores no soro tenderam a apresentar maior titulação no colostro e somente 25% das cabras (2/8) apresentaram anticorpos anti-*N. caninum* ao longo dos 120 dias de lactação, os quais foram progressivamente diminuindo nas amostras de leite. Os resultados demonstram que a RIFI pode ser utilizada para a triagem de rebanhos caprinos positivos para *N. caninum*, principalmente em colostro e em leite de 75% dos animais até o décimo quinto dia de lactação.

Palavras-chave: Caprinos; Diagnóstico sorológico; Pequenos ruminantes.

ABSTRACT

Neosporosis is a parasitic disease responsible for major economic losses in the global beef and dairy cattle industry. In goats, complications in pregnant females include abortions, stillbirths, and birth of weak or normal but infected animals. As a diagnostic method, the detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in serum by Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT), the presence of lesions and the parasite in aborted fetuses, associated with immunohistochemical labelling or detection of *N. caninum* DNA in tissues, can be used. The detection of anti-*N. caninum* antibodies in bovine milk has shown good agreement when compared to blood titers by IFAT. In goats, there are no studies comparing antibody levels in colostrum and milk with blood serum. Therefore, the objective of this study is to identify anti-*Neospora caninum* antibodies in colostrum and milk of naturally infected goats and to evaluate the kinetics of antibodies. Nine naturally infected goats, confirmed by the presence of anti-*N. caninum* antibodies by IFAT, and three seronegative goats were used as negative controls. Blood samples were collected from the goats on the day of parturition (mother and kid before suckling colostrum) and monthly from the mother until day 120 postpartum. Ten mL of colostrum and milk were also found by manual ordering on the day of parturition (D0), day 3 (D3), D6, D9, D12, D15, D30, D60, D90 and D120, totaling 81 samples from positive animals. The results revealed that anti-*N. caninum* in 100% of serum samples (9/9) on the day of calving, in 88.88% of colostrum (8/9) and in 58.33% (42/72) of milk samples, considering that one goat was euthanized during the experimental period, with goats with higher serum titers tending to present higher titers in colostrum and only 25% of the goats (2/8) presented anti-*N. caninum* antibodies throughout the 120 days of lactation, which were progressively decreasing in the milk samples. The results demonstrate that IFAT can be used to track goat herds positive for *N. caninum*, mainly in colostrum and in milk from 75% of the animals up to the fifteenth day of lactation.

Keywords: Goats; Serological diagnosis; Small ruminants.

IMPACTOS SOCIAIS, TECNOLÓGICOS, ECONÔMICOS E CULTURAIS

Neosporose é uma doença parasitária responsável por grandes perdas econômicas na indústria mundial da bovinocultura de corte e leite. Em caprinos, as complicações em fêmeas prenhas incluem abortos, natimortos e nascimento de animais fracos ou normais, mas infectados. Somado a isso a transmissão transplacentária é a principal forma de manutenção do parasito no rebanho. Como métodos de diagnóstico, pode ser utilizado a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* no soro pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e a pesquisa de lesões e do parasito em fetos abortados, associados à marcação imuno-histoquímica ou a detecção do DNA de *N. caninum* nos tecidos. A detecção de anticorpos anti-*N. caninum* no leite de bovinos tem apresentado boa concordância quando comparados aos títulos sanguíneos por meio da RIFI. Em cabras não existem estudos que comparem os títulos de anticorpos no colostro e leite com o soro sanguíneo. Sendo assim o objetivo deste estudo é identificar anticorpos anti-*N. caninum* em colostro e leite de cabras naturalmente infectadas e avaliar a cinética de anticorpos até 120 dias de lactação. Os resultados demonstraram que foram detectados anticorpos anti-*N. caninum* em 100% das amostras de soro (9/9) no dia do parto, em 88,88% do colostro (8/9) e em 58,33% (42/72) das amostras de leite, sendo que cabras com títulos maiores no soro tenderam a apresentar maior titulação no colostro e somente 25% das cabras (2/8) apresentaram anticorpos anti-*N. caninum* ao longo dos 120 dias de lactação. Os resultados demonstram que a RIFI pode ser utilizada para a triagem de rebanhos caprinos positivos para *N. caninum*, principalmente em colostro e em leite de 75% dos animais até o décimo quinto dia de lactação.

SOCIAL, TECHNOLOGICAL, ECONOMIC AND CULTURAL IMPACTS

Neosporosis is a parasitic disease responsible for major economic losses in the global beef and dairy cattle industry. In goats, complications in pregnant females include abortions, stillbirths, and birth of weak or normal but infected animals. Transplacental transmission is the main way of maintaining the parasite in the herd. As a diagnostic method, the detection of anti-*N. caninum* antibodies in serum by Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT), the presence of lesions and the parasite in aborted fetuses, associated with immunohistochemical labelling or detection of *N. caninum* DNA in tissues, can be used. The detection of anti-*N. caninum* antibodies in bovine milk has shown good agreement when compared to blood titers by IFAT. In goats, there are no studies comparing antibody levels in colostrum and milk with blood serum. Therefore, the objective of this study is to identify anti-*N. caninum* antibodies in colostrum and milk of naturally infected goats and to evaluate the kinetics of antibodies up to 120 days of lactation. The results revealed that anti-*N. caninum* in 100% of serum samples (9/9) on the day of calving, in 88.88% of colostrum (8/9) and in 58.33% (42/72) of milk samples, considering that one goat was euthanized during the experimental period, with goats with higher serum titers tending to present higher titers in colostrum and only 25% of the goats (2/8) presented anti-*N. caninum* antibodies throughout the 120 days of lactation, which were progressively decreasing in the milk samples. The results demonstrate that IFAT can be used to track goat herds positive for *N. caninum*, mainly in colostrum and in milk from 75% of the animals up to the fifteenth day of lactation.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1: Ciclo biológico do *Neospora caninum*.....15

SEGUNDA PARTE

Gráfico 1. Títulos de IgG anti-*Neospora caninum* obtidos através da Reação de Imunofluorescência Indireta em colostro e leite de cabras naturalmente infectadas até 120 dias de lactação.....37

Gráfico 2. Títulos de IgG anti-*Neospora caninum* obtidos através da Reação de Imunofluorescência Indireta em soro de cabras naturalmente infectadas até 120 dias de lactação.....37

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE

- Tabela 1. Títulos de IgG anti-*Neospora caninum* obtidos através da Reação de Imunofluorescência Indireta em colostro e leite de cabras naturalmente infectadas até 120 dias de lactação.....35
- Tabela 2. Títulos de IgG anti-*Neospora caninum* obtidos através da Reação de Imunofluorescência Indireta em soro sanguíneo de cabras naturalmente infectadas do dia do parto até 120 dias de lactação.....36
- Tabela 3. Títulos de IgG anti-*Neospora caninum* obtidos através da Reação de Imunofluorescência Indireta em soro sanguíneo pré-colostro dos cabritos de cabras naturalmente infectadas.....38

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	<i>Neospora caninum</i>	13
2.2	Transmissão do <i>Neospora caninum</i>	15
2.3	Sinais clínicos e patogenicidade.....	16
2.4	Correlação de cepas de <i>Neospora caninum</i> e patogenicidade	17
2.5	Diagnóstico da neosporose.....	18
2.5.1	Detecção de anticorpos anti- <i>N. caninum</i> em leite e colostro.....	19
3	REFERÊNCIAS.....	22

SEGUNDA PARTE: ARTIGO..... 29

RESUMO	30
ABSTRACT.....	31
INTRODUÇÃO.....	32
MATERIAL E MÉTODOS	32
Manejo dos caprinos e coleta de sangue.....	32
Coleta das amostras de colostro e leite.....	33
Reação de imunofluorescência indireta (RIFI).....	33
RESULTADOS.....	34
DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS.....	41
ANEXOS.....	46

1 INTRODUÇÃO

O rebanho brasileiro de caprinos é composto por 12.366.233 cabeças (IBGE, 2022). Apesar de não existirem dados sobre os prejuízos econômicos em caprinos, dentre as principais doenças que causam grandes perdas econômicas na bovinocultura de corte e de leite, encontra-se a neosporose, uma doença parasitária causada pelo protozoário *Neospora caninum* (Reichel *et al.*, 2013). A neosporose acomete várias espécies domésticas e silvestres em diversos países, entre elas bovinos (Dubey, Schares e Ortega-Mora, 2007; Orlando *et al.*, 2014), caprinos (Mesquita *et al.*, 2013, Nakagaki *et al.*, 2016, Oliveira Junior *et al.*, 2020) suínos (Gui *et al.*, 2019) ovinos (González-Warleta *et al.*, 2014, Pereira *et al.*, 2021) e aves marinhas (Sato *et al.*, 2024).

Em caprinos as maiores complicações em fêmeas prenhas, incluem abortos, natimortos, nascimento de animais fracos ou animais sem manifestações clínicas, mas permanentemente infectados (Porto *et al.*, 2016; Mesquita *et al.*, 2018), associadas ou não a lesões placentárias causadas pela infecção por *N. caninum* (Mesquita *et al.*, 2018). Já em cabras adultas saudáveis, não prenhas, naturalmente infectadas pelo protozoário, mas com histórico da ocorrência de abortos e natimortos, foi detectado o DNA de *N. caninum* em musculatura esquelética, cardíaca, glândula mamária, ovário e útero (Nakagaki *et al.*, 2016), sugerindo a passagem do parasito pela glândula mamária.

Além da detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* no soro sanguíneo, estes também tem sido detectados em amostras de leite individual ou coletivas de bovino (Camillo *et al.* 2011a, 2011b, Cirone *et al.*, 2021, Villa *et al.*, 2024) e em colostro de ovinos (Bezerra *et al.*, 2022), utilizando provas sorológicas como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (Camillo 2011a, 2011b; Cirone *et al.*, 2021; Bezerra *et al.*, 2022) ou o teste imunoenzimático (ELISA) (Cirone *et al.*, 2021, Villa *et al.*, 2024) e apresentando boa concordância nos resultados quando comparado à titulação no soro sanguíneo (Camillo *et al.* 2011a, 2011b; Bezerra *et al.*, 2022). Ainda não há estudos demonstrando os títulos de anticorpos anti-*N.caninum* em colostro e leite ao longo do período de lactação de caprinos, assim como a sua comparação com a titulação sanguínea. Desta forma este estudo tem por objetivos detectar e titular os anticorpos anti-*Neospora caninum* em colostro e leite durante o período de lactação de cabras naturalmente infectadas e avaliar a cinética dos anticorpos através da RIFI no colostro, leite e soro sanguíneo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Neospora caninum*

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório do filo Apicomplexa, subclasse Coccidia, família *Sarcocystidae* e gênero *Neospora* (Dubey *et al.*, 1988; Dubey, Hemphill e Schares, 2017). O parasito foi descrito pela primeira vez em 1984, em cães boxer na Noruega, como um protozoário não identificado, semelhante ao *Toxoplasma gondii* (Bjerkas *et al.*, 1984; Khan, 2020). Em 1988, este foi denominado como *N. caninum* (Dubey *et al.*, 1988) e tornou-se conhecido como uma doença grave, responsável pelo aumento da mortalidade neonatal principalmente em bovinos e cães (Ellis *et al.*, 1994; Dubey *et al.*, 1998; Dubey, Schares e Ortega-mora, 2007; Dubey, Hemphill e Schares, 2017).

Há relatos de neosporose acometendo bovinos (Macaldowie *et al.*, 2004; Dubey e Schares, 2006, Dubey, Hemphill e Schares, 2017;) cabras (Dubey *et al.*, 1996; Varaschin *et al.*, 2012; Mesquita *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2014; Oliveira Junior *et al.*, 2020), cavalos, veados e cães (Dubey *et al.*, 1996, Dubey, Hemphill e Schares, 2017) ovelhas (Basso *et al.*, 2022), búfalos (Silva *et al.*, 2013), porcos domésticos (Gui *et al.*, 2019) e selvagens (Soares *et al.*, 2016), corvos (Salant *et al.*, 2015), aves marinhas (Sato *et al.*, 2024), e com sorologia positiva em seres humanos (Dubey, Hemphill e Schares, 2017; Duarte *et al.*, 2020). Já em equinos a infecção está relacionada a outra espécie *Neospora hughesi*, que possui uma diferença de 6% no antígeno de superfície (SAG1) quando comparado ao antígeno de superfície (mAb 6c11) do *N. caninum* e de 9% dos aminoácidos no antígeno de superfície SRS2 (Khan *et al.*, 2020).

O ciclo de vida do *N. caninum* (Figura 1) consiste em três estágios: taquizoítos, bradizoítos e oocistos (Dubey, Hemphill e Schares, 2017). Os bradizoítos são alongados e medem aproximadamente 8 x 2 µm. Os taquizoítos são ovoides, lunares ou globulares, medindo cerca de 3 a 7 µm por 1 a 5 µm. São importantes na transmissão transplacentária (transmissão vertical), podendo infectar células de qualquer tecido do feto. (Dubey *et al.*, 2002)

Nos hospedeiros definitivos, como cães, coiotes, lobos cinzentos e dingos, ocorre a fase de reprodução sexuada, enquanto a reprodução assexuada ocorre nos hospedeiros intermediários, que podem ser várias espécies, entre elas os cães e cabras (Dubey, Hemphill e

Schares, 2017). Os oocistos diploides não esporulados sofrem meiose e formam esporozoítos haplóides e após 24 horas no ambiente, com umidade e temperatura adequadas, sofrem esporulação. Esses oocistos esporulados são infectantes e servem de fonte de infecção (transmissão horizontal) para os animais, através da ingestão de alimentos ou água contaminados (Dubey, Schares e Ortega-mora, 2007; Khan *et al.*, 2020). No organismo os esporozoítos se tornam taquizoítos, que invadem as células e se replicam por endodiogenia dentro de um vacúolo parasitóforo, repetindo esse processo várias vezes. Em resposta à imunidade inata e adaptativa do hospedeiro, esses taquizoítos passam para um estágio semi-dormente de crescimento lento, que é conhecido como fase de bradizoítos, encontrados dentro do cisto parasitário (Khan *et al.*, 2020).

Os cistos de *N. caninum* podem persistir por toda a vida do hospedeiro sem causar manifestações clínicas (Almeria *et al.*, 2017), sendo encontrados principalmente no sistema nervoso central e musculaturas cardíaca e esquelética (Dubey, Schares e Ortega-mora, 2007). Estes podem chegar a 107 μm de diâmetro (Dubey e Lindsay, 1996; Hemphill e Gottstein, 1996), são arredondados a ovalados, revestidos por uma parede espessa com até 4 μm , e preenchidos por bradizoítos (Dubey *et al.*, 2002).

Em infecções latentes, esses bradizoítos podem ser convertidos em taquizoítos que começam o processo de reinfecção de novas células, o que pode ocorrer principalmente em hospedeiros imunocomprometidos. O ciclo se conclui quando um hospedeiro definitivo ingere tecidos e órgãos contendo cistos teciduais (Khan *et al.*, 2020).

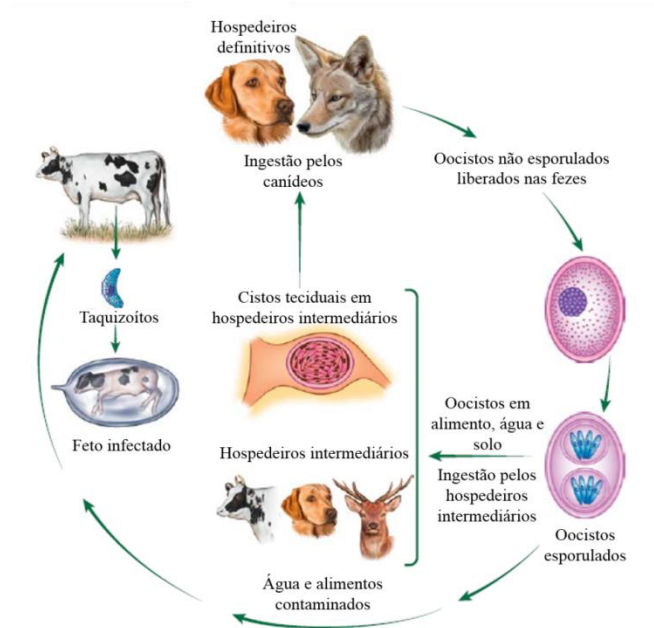


Figura 1: Ciclo de vida do *Neospora caninum*. Adaptado de Dubey (2017).

2.2 Transmissão do *Neospora caninum*

A transmissão congênita ocorre quando os taquizoítos presentes em um animal infectado passam para o feto durante a gestação (Dubey, Schares e Ortega-mora, 2007). Esta ocorre de forma exógena onde a mãe ingere oocistos esporulados no ambiente e os taquizoítos atravessam a barreira transplacentária, infectando o feto, ou de forma endógena, onde a infecção no feto advém de uma infecção persistente na mãe por reativação dos cistos parasitários (Williams *et al.*, 2009). Esta é a principal forma de manutenção da infecção no rebanho, como demonstrado em um rebanho caprino, onde foram avaliadas seis famílias de cabras naturalmente infectadas, com árvores genealógicas construídas com três a cinco gerações, na qual a infecção por *N. caninum* se manteve ao longo das gerações e a taxa de transmissão vertical variou de 71,4% a 100% (Oliveira Junior *et al.*, 2020).

A transmissão via lactogênica tem sido estudada e já foi comprovada em condições experimentais, em dois bezerros recém-nascidos que receberam colostro com taquizoítos de *N. caninum* via mamadeira. Esses dois bezerros apresentaram anticorpos anti-*N. caninum* no soro e DNA de *Neospora caninum* no encéfalo (Uggla *et al.*, 1998). Além do colostro, também é

possível infectar bezerras via substitutivo do leite, porém, a transmissão via lactogênica não parece ser uma via importante de transmissão para bovinos (Davison *et al.*, 2001).

Em ovelhas inoculadas com *N. caninum* aos 30 dias de gestação ocorreu reabsorção embrionária, nascimento de cordeiros mortos ou normais infectados congenitamente. No entanto, nesse experimento, não ocorreu a transmissão via lactogênica, no qual foi induzido uma infecção em uma ovelha negativa 10 dias após o parto e seu filhote não desenvolveu sinal clínico nem lesões histopatológicas que fossem compatíveis com infecção por *N. caninum* após sete semanas de lactação (Socarras, 2001). Contudo, não foi realizado PCR para detecção do DNA de *N. caninum* nos tecidos do cordeiro, não podendo, desta forma ser totalmente excluída a transmissão via lactogênica.

2.3 Sinais clínicos e patogenicidade

Em caprinos as principais complicações da neosporose em fêmeas prenhas são abortos, natimortos, nascimento de animais fracos ou sem manifestações clínicas, mas permanentemente infectados (Porto *et al.*, 2016; Mesquita *et al.*, 2018).

Alguns fatores podem interferir nos estudos sobre a patogenicidade do *N. caninum*, uma vez que existem complicações em relação à cultura celular do parasito, que pode diminuir sua patogenicidade com o aumento do número de passagens. Por outro lado, vários fatores podem contribuir para o aumento da taxa de infecção, como clima e estação do ano, que favorecem a esporulação do oocisto, fatores imunológicos como exposição a outros agentes infecciosos que causem estresse e supressão do sistema imune do hospedeiro, interferindo na resposta imunológica individual ao parasito (Dubey *et al.*, 2007). Além disso, existe a possibilidade de que animais adultos cronicamente infectados sejam hospedeiros subclínicos imunologicamente protegidos o que dificulta a ocorrência de lesões e formação de cistos teciduais (Malaguti *et al.*, 2012, Nakagaki *et al.*, 2016).

A invasão celular é um fator fundamental para a sobrevivência do *N. caninum* no organismo e, conseqüentemente, para a infecção persistente. Esse processo envolve um contato de baixa afinidade entre o taquizoíto e a célula hospedeira, seguido pela adesão mediada pelos proteoglicanos de superfície da célula hospedeira. Os glicosaminoglicanos de sulfato de

condroitina (GAGs) são receptores importantes para os taquizoítos enquanto os resíduos terminais de ácido siálico atuam como receptores de adesão para os bradizoítos (Naguleswaran *et al.*, 2002, Vonlaufen *et al.*, 2004). Os antígenos de superfície do agente facilitam esse contato inicial com a célula, e através de deslizamento ativo e proteínas de organelas secretoras das células hospedeiras, o parasito consegue entrar na célula (Khan *et al.*, 2020).

2.4 Correlação de cepas de *Neospora caninum* e patogenicidade

Várias cepas de *N. caninum* foram isoladas mundialmente. Embora não tenham sido amplamente estudadas, algumas ocasionaram diferentes graus de lesões dependendo da espécie de hospedeiro acometida (Chryssafidis *et al.*, 2014; Khan *et al.*, 2020).

A cepa Nc-1 foi a primeira cepa isolada em laboratório (Dubey *et al.*, 1988) e é considerada mais agressiva em comparação com a cepa Nc-3, razão pela qual é amplamente utilizada em experimentos (Chryssafidis *et al.*, 2014; Khan *et al.*, 2020). Por outro lado, a cepa Argentina Nc-6 é descrita como mais patogênica quando comparadas com a Nc-1, causando lesões acentuadas nos fetos e na placenta (Bacigalupe *et al.*, 2013). Já a cepa Nc-Bahia apresenta menor grau de patogenicidade quando comparada a cepa Nc-1 em modelos experimentais envolvendo vacas e búfalos (Chryssafidis *et al.*, 2014).

Várias cepas quando inoculadas no modelo camundongo BALB/c apresentaram diferentes níveis de patogenicidade. Por exemplo, a cepa Nc-Goiás 1 não apresentou patogenicidade, e todos os camundongos sobreviveram sem manifestações clínicas (García-Melo *et al.*, 2009). Em contraste, a cepa Nc-Liv, isolada de canino, induziu manifestações clínicas mais agressivas, sendo as lesões associadas a um infiltrado inflamatório e necrose acentuados quando comparado com a cepa avirulenta Nc-SweB1, isolado de um bovino. A cepa Nc-Nowra, também avirulenta causou encefalite não supurativa discreta (Atkison *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 2020).

Outras cepas incluem a Yanbian isolada de tecidos cerebrais de bovinos abortados na China, com 99,5% dos genes compatíveis com a cepa Nc-5, e altamente patogênica e infecciosa (Jia *et al.*, 2014). As cepas Nc-Spain5H, Nc-Spain7, Nc-Spain9, isoladas de bezerros

assintomáticos, infectados congenitamente, causaram altas cargas parasitárias quando inoculadas em camundongos BALB/c (Garcia Melo *et al.*, 2010).

Duas cepas isoladas de caprinos de Minas Gerais e inoculadas em camundongos BALB/c apresentaram diferentes padrões de patogenicidade. Na cepa Nc-goat1 as lesões de meningoencefalite com infiltrado inflamatório composto por linfócitos T CD3 foram acentuadas, enquanto na cepa Nc-goat2 foram discretas (Costa *et al.*, 2019).

Somado a isso, isolados de diferentes regiões geográficas podem apresentar uma diversidade genética, como o demonstrado por Cabrera *et al.* (2019), com quatro cepas de *N. caninum* do Uruguai, onde a cepa NcUru1 e NcUru4 são geneticamente iguais, porém foram isoladas em regiões distintas e apresentavam diferentes históricos de patogenicidade. Em contrapartida as cepas NcUru2, isolada na mesma região de NcUru1, apresentou pouca semelhança genética com NcUru1 e NcUru4, enquanto a cepa NcUru3, embora de uma localidade diferente, tinha maior semelhança genética com NcUru1 e NcUru4 (Cabrera *et al.*, 2019). Esses resultados sugerem que a virulência da cepa pode influenciar o processo evolutivo da doença e a reativação de infecções persistentes (Maley *et al.*, 2003).

2.5 Diagnóstico da neosporose

O diagnóstico da neosporose é realizado pelo exame histopatológico de fetos abortados, associados à marcação imuno-histoquímica (Dubey e Schares, 2006). Os métodos imuno-histoquímicos incluem a imunoperoxidase indireta e complexo avidina e biotina (ou o complexo streptavidina-biotina-peroxidase), utilizando anticorpos primários monoclonais ou policlonais, sendo o policlonal de maior sensibilidade (Khan *et al.*, 2020). Alternativamente pode-se detectar o DNA do parasito nos tecidos pela técnica de PCR, a qual apresenta alta sensibilidade e especificidade (Dubey e Schares, 2006).

As lesões microscópicas mais frequentes na neosporose em fetos abortados ocorrem no sistema nervoso central, na forma de encefalite não supurativa. Essas lesões são caracterizadas por manguitos perivasculares composto por linfócitos e plasmócitos, focos de gliose e necrose com infiltrado inflamatório mononuclear ao seu redor, associadas ou não à visualização de cistos ou taquizoítos em substância cinzenta (Dubey e Lindsay, 1996; Varaschin *et al.*, 2012).

Também podem ocorrer miocardite e miosite não supurativa (Varaschin *et al.*, 2012) e lesões placentárias (Mesquita *et al.*, 2018). Outros tecidos são menos frequentemente acometidos (Dubey e Lindsay, 1996).

O isolamento *in vivo* com inoculação em camundongos é menos utilizado assim como o isolamento *in vitro*, já que o crescimento do parasito em cultivo celular é bastante lento (Conrad *et al.*, 1993; Stenlund *et al.*, 1997). A microscopia eletrônica de varredura é um método adicional utilizado para diferenciar *Neospora caninum* de outros parasitos como o *Toxoplasma gondii* e *Sarcocystis neurona* (Khan *et al.*, 2020).

Os métodos indiretos são os sorológicos, que podem detectar a imunoglobulina M (IgM) por semanas após a infecção primária ou a IgG, que dependendo da espécie, só atinge o pico em 6 semanas após a infecção primária (Khan *et al.*, 2020). Nesta metodologia estão inclusos a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), teste de aglutinação direta (NAT), que faz a detecção de IgM e se mostra tão sensível quanto a RIFI, teste imunoenzimático (ELISA), teste de aglutinação em látex (LAT), imunotransferência (IB) (Dubey e Schares, 2006; Khan *et al.*, 2020) e *Western Blot*. A RIFI é considerada o teste padrão ouro (Atkinson *et al.*, 2000; Dubey e Schares, 2006).

2.5.1 Detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em leite e colostro

Além da detecção de anticorpos anti-*N. caninum* no soro sanguíneo, estes também foram detectados em amostras de leite individuais ou coletivas de bovino (Ooi *et al.*, 2000; Camillo *et al.* 2011a, 2011b, Cirone *et al.*, 2021, Villa *et al.*, 2024) e em colostro de bovinos (Moskwa *et al.*, 2007) e ovinos (Bezerra *et al.*, 2022). Para isso, foram utilizadas provas sorológicas como a RIFI (Ooi *et al.*, 2000; Camillo *et al.*, 2011; Cirone *et al.*, 2021; Bezerra *et al.*, 2022) e ELISA (Chanlun *et al.*, 2006; Moskwa *et al.*, 2007; González-Warleta *et al.*, 2011; Cirone *et al.*, 2021; Villa *et al.*, 2024), apresentando boa concordância com os títulos de anticorpos anti-*N. caninum* presentes no soro sanguíneo (Camillo *et al.* 2011a, 2011b; Bezerra *et al.*, 2022).

Moskwa *et al.* (2007) demonstra que a concordância, entre a presença de anticorpos anti-*N. caninum* no colostro e soro de bovinos foi de 95%, além de detectar o DNA do parasito no colostro através de PCR. Em ovinos, um estudo com 162 amostras de colostro e sangue, e

182 amostras de soro dos filhotes, 27,8% das mães foram positivas no soro e quando testadas somente as 27,8% fêmeas positivas, 47,6% também foram positivas no colostro, com títulos entre 1:50 e 1:200. Estatisticamente, houve concordância quanto a presença de anticorpos anti-*N. caninum* nas amostras de colostro e soro dos cordeiros. Além disso, ovelhas com títulos no soro maiores ou iguais aos do colostro resultaram em descendentes, com titulação inferior ou igual ao do colostro (Bezerra *et al.*, 2022).

Em amostras individuais de 105 vacas em lactação na Tailândia, com anticorpos anti-*Neospora caninum* detectados no soro e no leite por ELISA, coletados em diferentes ocasiões, 75% das amostras tiveram percentual de positividade nos valores de 35 para soro e 58 para leite (Chanlun *et al.*, 2006).

Cirone *et al.* (2021) analisaram 98 amostras coletivas de leite, coletadas durante o outono até a primavera de 2019, provenientes de 49 fazendas de bovinos leiteiros, além de 147 amostras individuais de leite e soro de outras duas fazendas, através de ELISA e RIFI com ponto de corte de 1:100. As amostras coletivas coletadas no outono foram 100% positivas e na primavera, obtiveram 91,8% de positividade, indicando alteração no status da neosporose conforme a época de coleta. Entre as amostras individuais, os resultados demonstraram boa concordância entre o soro e o leite com uma concordância de 84,6% para positividade e 95% para negatividade. No entanto, o estudo não especificou valores de titulação para as amostras individuais ou coletivas.

Camillo *et al.* (2011b) avaliaram a presença de anticorpos anti-*N. caninum* pela RIFI em sangue e leite de 112 vacas em lactação de seis propriedades no Rio Grande do Sul, e em uma amostra coletiva de leite de cada propriedade. Os resultados demonstraram que animais com títulos acima ou iguais a 1:100 no soro sanguíneo tiveram 100% de concordância com os títulos das respectivas amostras de leite. No entanto, amostras com títulos de 1:50 no soro sanguíneo, tiveram apenas 40% de concordância com os títulos das amostras de leite, sendo justificado pelos autores por serem títulos baixos no soro e conseqüentemente não detectáveis no leite, sendo estas amostras irrelevantes do ponto de vista diagnóstico.

Villa *et al.* (2024), detectaram de anticorpos anti-*N. caninum* por ELISA, em leite a granel, coletadas de 586 rebanhos na Itália. Entre esses, 180 rebanhos positivos na sorologia,

correlacionando com os fatores de risco para a infecção e sem descrever os títulos obtidos para as amostras.

Já González-Warleta *et al.*, (2011), realizaram uma coleta pareada de amostras de soro e leite de 1.134 bovinos leiteiros provenientes de 38 propriedades, além de uma amostra de leite a granel de cada uma das propriedades, que foram submetidas ao teste de ELISA. Os resultados demonstraram correspondência de 97,6% entre as amostras de soro e leite. Dos 1.134 animais, 167 foram positivos no soro e no leite, 940 foram negativos no soro e no leite sem influência nos resultados pelo período de lactação ou parição. Além disso, apenas 13 vacas positivas no soro, foram negativas no leite, e 14 vacas negativas no soro foram positivas no leite, sendo considerado estatisticamente irrelevantes. Já nas amostras coletivas de leite, a prevalência foi de 59,9% dos rebanhos.

Ooi *et al.* (2000) demonstrou a presença de anticorpos anti- *N. caninum* pela RIFI (ponto de corte 1:200) no soro sanguíneo de 275 bovinos, sendo que todos os bovinos soropositivos também demonstraram anticorpos no leite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMERÍA, S. *et al.* Immune response in bovine neosporosis: Protection or contribution to the pathogenesis of abortion. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 109, p. 177-182, 2017.

ANDRADE, G. S. *et al.* Soroprevalence for *Neospora caninum* in goats of Minas Gerais state, Brazil. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 94, p. 584-586, 2012.

ATKINSON, R. *et al.* Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. **Parasitology**, [s. l.], v. 118, p. 363-370, 1999.

ATKINSON, R. *et al.* Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. **Parasitology Today**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 110-113, 2000.

BACIGALUPE, D. *et al.* *Neospora caninum* NC-6 Argentina induces fetopathy in both serologically positive and negative experimentally inoculated pregnant dams. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 112, p. 2585-2592, 2013.

BASSO, W. *et al.* *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep and goats in Switzerland: Seroprevalence and occurrence in aborted fetuses. **Food and Waterborne Parasitology**, [s. l.], v. 28, p. 1-12, 2022.

BEZERRA, R. A. *et al.* Detection of Anti-*Neospora caninum* IgG in blood serum and colostrum samples in naturally infected Sheep and in their Newborn Offspring. **Pathogens**, v.11, n.11, p.1-9, 2022.

BJERKAS, I. *et al.* Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift Fur Parasitenkunde**, v.70, p. 271-274, 1984.

CABRERA, A. *et al.* Isolation and molecular characterization of four novel *Neospora caninum* strains. **Parasitology Research**, v. 118, p. 3535-3542, 2019.

CAMILLO, G. *et al.* Reação de Imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti-

Neospora caninum em amostras coletivas de leite. **Ciência Rural**, v. 41, n. 9, p. 1600-1604, 2011a.

CAMILLO, G. *et al.* Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras individuais e coletivas de leite de bovinos pela reação de imunofluorescência indireta. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 482-486, 2011b.

CHANLUN, A. *et al.* Application of repeated bulk milk testing for identification of infection dynamics of *Neospora caninum* in Thai dairy herds. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 136, p. 243-250, 2006.

CIRONE, K.M. *et al.* Frequency of *Neospora caninum*-specific antibodies in bulk milk from dairy farms from Mar y Sierras Dairy Basin, Argentina. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, [s. l.] v. 26, p. 1-6, 2021.

CONRAD, P. A. *et al.* In vitro isolation and characterization of a *Neospora sp.* from aborted bovine foetuses. **Parasitology**, [s. l.], v. 106, n. 3, p. 239-249, 1993.

COSTA, R. C. *et al.* Histological and immunohistochemical characterization of the inflammatory and glial cells in the central nervous system of goat fetuses and adult male goats naturally infected with *Neospora caninum*. **BMC Veterinary Research**, [s. l.], v. 10, p. 291, 2014.

COSTA, R. C. *et al.* The pathogenicity of two *Neospora caninum* goat strains in a BALB/c mouse model. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 205, p. 1-9, 2019.

CHRYSSAFIDIS, A. L. *et al.* Pathogenicity of Nc-Bahia and Nc-1 strains of *Neospora caninum* in experimentally infected cows and buffaloes in early pregnancy. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 113, p. 1521-1528, 2014.

DAVISON, H. C. *et al.* Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 70, p. 163–168, April 2001.

DUARTE, P.O. *et al.* Serological evaluation of *Neospora caninum* in pregnant women treated at referral center for prenatal screening in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, *Campo Grande*, v. 29, n.4, p. 1-8, 2020.

DUBEY, J. P. *et al.* A newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 193, p. 1269- 1283, 1988.

DUBEY, J. P., LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, [*s. l.*], 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**, [*s. l.*], v. 32, p. 929-946, July 2002.

DUBEY, J. P., SCHARES, G. Review diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, [*s. l.*], v. 140, n. 1-2, p. 1–34, 2006.

DUBEY, J. P., *et al.* Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, [*s. l.*], v. 20, p. 323–369, 2007.

DUBEY, J. P., HEMPHILL, A., SCHARES, G., CALERO-BERNAL, R. (Eds). **Neosporosis in animals**. Boca Raton: Taylor & Francis, p. 329-336, 2017.

ELLIS, J. *et al.* The phylogeny of *Neospora caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [*s. l.*], v. 64, n. 2, p. 303-311, 1994.

FIGLIUOLO, L. P. C. *et al.* Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goat from São Paulo State, Brazil. **Small Ruminant Research**, [*s. l.*], v. 55, p. 29-32, 2004.

GARCÍA-MELO, P. D. *et al.* Pathogenic characterization in mice of *Neospora caninum* isolates obtained from asymptomatic calves. **Parasitology**, [*s. l.*], v. 137, p. 1057-1068, 2010.

GARCÍA-MELO, P. D. *et al.* Isolation and biological characterization of new isolate of

Neospora caninum from asymptomatic calf in Brazil. **Acta Parasitologica**, [s. l.], v. 54, n. 2, p.180-185, 2009.

GONZÁLEZ-WARLETA, M. *et al.* Anti-*Neospora caninum* antibodies in milk in relation to production losses in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, [s. l.], v. 101, p. 58– 64, 2011.

GUI, B. Z. *et al.* First report of *Neospora caninum* infection in pigs in China. **Transboundary and Emerging Diseases**, [s. l.], v. 67, p. 29-32, 2019.

HEMPHILL, A., GOTTSTEIN, B. Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 82, n. 6, p. 497-504, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção agropecuária, 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/>. Acesso em: 27 jun. 2024.

JIA, L. *et al.* Isolation, identification, and pathogenicity of *Neospora caninum* China Yanbian strain. **Iranian Journal of Parasitology**, [s. l.], n.3, v.9, p.394-401, 2014.

KHAN, A. *et al.* Neosporosis: An overview of its molecular epidemiology and pathogenesis. **Engineering**, [s. l.], v. 6, p.10-19, 2020.

MACALDOWIE, C. *et al.* Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. **Journal of Comparative Pathology**, [s. l.], v. 131, p. 142-156,2004.

MALAGUTI, M. A. *et al.* *Neospora caninum* as causative agent of bovine encephalitis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 48-54, 2012.

MALEY, S. W. *et al.* The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation. **Journal of Comparative Pathology**, v. 129, p.186-195, 2003.

MESQUITA, L. P. *et al.* Antibody kinetics in goats and conceptuses naturally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 196, p. 327-333, 2013.

MESQUITA, L. P. *et al.* Placental lesions associated with abortion and stillbirth in goats naturally infected by *Neospora caninum*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 444-449, 2018.

MOSKWA, B. *et al.* The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 100, p. 633–636, 2007.

NAGULESWARAN, A. *et al.* Vero cell surface proteoglycan interaction with the microneme protein NcMIC(3) mediates adhesion of *Neospora caninum* tachyzoites to host cells unlike that in *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 32, n. 6, p.695–704. 2002.

VONLAUFEN, N. *et al.* In vitro induction of *Neospora caninum* bradyzoites in Vero cells reveals differential antigen expression, localization, and host-cell recognition of tachyzoites and bradyzoites. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 72, n.1, p. 576–83. 2004.

NAKAGAKI, K. Y. R. *et al.* Lesions and distribution of *Neospora caninum* in tissues of naturally infected female goats. **Small Ruminant Research**, [s. l.], v. 140, p. 57–62, 2016.

OLIVEIRA JUNIOR, I. M. *et al.* Endogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* in successive generations of congenitally infected goats. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 284, p. 1-8, 2020.

ORLANDO, D. R. *et al.* Abortos por *Neospora caninum* em bovinos do sul de Minas Gerais, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 1332-1338, 2014.

PEREIRA, K. A. G. *et al.* Transplacental transmission of *Neospora caninum* to lambs in successive pregnancies of naturally infected sheep in southern Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v.23, p. 1-5, 2021.

PORTO, W. J. N. *et al.* Experimental caprine neosporosis: the influence of gestational stage on the outcome of infection. **Veterinary Research**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 1-10, 2016.

REICHEL, M. P. *et al.* What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle the billion dollar question. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 133-142, 2013.

SALANT, H. *et al.* *Neospora caninum* in crows from Israel. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 212, p.375-378, 2015.

SÁNCHEZ-MACÍAS, D. *et al.* From goat colostrum to milk: Physical, chemical, and immune evolution from partum to 90 days postpartum. **Journal of Dairy Science**, v.97, p. 10-16, 2013.

SATO, A. P. *et al.* Molecular detection of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in seabirds collected along the coast of Santa Catarina, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 33, p. 1-11, 2024.

SILVA, S. P. *et al.* Comparação das técnicas de ELISA indireto e Imunofluorescência indireta na detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em búfalas (*Bubalus bubalis*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v.33, n.4, p. 431-434, 2013.

SOARES, H. S. *et al.* Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* in wildpigs (Susscrofa) in the Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 112-116, 2016.

SOCARRAS, T. J. O. **Infecção experimental de ovelhas deslanadas com *Neospora caninum***. 2001. 63p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

STENLUND, S. *et al.* Characterization of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 83, p. 214-219, 1997.

UGGLA, A. *et al.* Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **International**

Journal for Parasitology, [s. l.], n. 28, p. 1467-1472, 1998.

VARASCHIN, M. S. *et al.* Congenital neosporosis in goats from the state of Minas Gerais, Brazil. **The Korean Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 63-67, 2012.

VILLA, L. *et al.* *Neospora caninum* antibodies in bulk milk from dairy cattle herds in Italy in relation to reproductive and productive parameters and spatial analysis. **Acta Tropica**, v. 254, p. 1-10, 2024.

WILLIAMS, D. J. L. *et al.* Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* – how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. **Parasitology**, [s. l.], v. 136, n. 1, p. 1895-1900, 2009.

SEGUNDA PARTE: ARTIGO

DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum* EM COLOSTRO E LEITE DE CABRAS NATURALMENTE INFECTADAS

RESUMO

Neospora caninum é um importante agente causador de abortos e natimortos em caprinos. A detecção de anticorpos-anti-*N. caninum* no leite de bovinos tem apresentando boa concordância quando comparados aos títulos sanguíneos através da RIFI. Em cabras não existem estudos demonstrando os títulos deste parasito no colostro e leite, assim como sua comparação com o do soro sanguíneo. Sendo assim o objetivo deste estudo é identificar através da RIFI anticorpos anti-*Neospora caninum* em colostro e leite de cabras naturalmente infectadas e comparar com a titulação mensal em soro sanguíneo. Foram utilizadas nove cabras naturalmente infectadas confirmadas pela presença de anticorpos anti-*N. caninum* pela RIFI e como controles negativos três cabras soronegativas. Uma cabra positiva morreu ao longo do período experimental. Foram coletadas amostras de sangue das cabras no dia do parto (mãe e filhote antes de mamar o colostro) e mensalmente da mãe até o dia 120 pós-parto. Também foram coletados 10 mL de colostro e de leite através de ordenha manual no dia do parto (D0), dia 3 (D3), D6, D9, D12, D15, D30, D45, D60, D90 e D120, totalizando 81 amostras de animais positivos e 30 de animais negativos. Os resultados demonstraram que houve detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em 100% das amostras de soro (9/9) no dia do parto, em 88,88% do colostro (8/9) e em 58,33 % (42/72) das amostras de leite, sendo que cabras com títulos maiores no soro tenderam a apresentar maior titulação no colostro e somente 25% das cabras (2/8) apresentaram anticorpos anti-*N. caninum* ao longo dos 120 dias de lactação, os quais foram progressivamente diminuindo nas amostras de leite, demonstrando que a RIFI pode ser utilizada para a triagem de rebanhos caprinos positivos para *N. caninum*, principalmente com o colostro e em 75% dos animais até o décimo quinto dia de lactação.

Palavras-chave: Caprinos. Diagnóstico sorológico. Pequenos ruminantes.

ABSTRACT

Neospora caninum is an important agent of abortions and stillbirths in goats. The detection of anti-*N. caninum* antibodies in bovine milk has shown good agreement when compared to blood titers through IFAT. In goats, there are no studies demonstrating the titers of this parasite in colostrum and milk, as well as their comparison with blood serum. Therefore, the main of this study is to identify anti-*N. caninum* antibody through IFAT in colostrum and milk from naturally infected goats and compare them with the titer monthly in blood serum. Nine naturally infected goats confirmed by the presence of anti-*N. caninum* antibodies by IFAT were used, and three seronegative goats were used as negative controls. One positive goat died during the experimental period. Blood samples were collected from the goats on the day of parturition (mother and offspring before suckling colostrum) and monthly from the mother until day 120 postpartum. Ten mL of colostrum and milk were also collected by hand milking on the day of calving (D0), day 3 (D3), D6, D9, D12, D15, D30, D45, D60, D90 and D120, totaling 81 samples from positive animals and 30 from negative animals. The results demonstrated that were detected anti-*N. caninum* antibodies in 100% of the serum samples (9/9) on the day of calving, in 88.88% of the colostrum (8/9) and in 58.33% (42/72) of the milk samples, with goats with higher titers in the serum tending to present higher titers in the colostrum and only 25% of the goats (2/8) presented anti-*N. caninum* antibodies throughout the 120 days of lactation, which were progressively decreased in the milk samples, demonstrating that RIFI can be used to screen goat herds positive for *N. caninum*, mainly with colostrum and in 75% of the animals up to the fifteenth day of lactation.

Keywords: Goats. Serological diagnosis. Small ruminants.

INTRODUÇÃO

Neosporose é uma doença parasitária causada pelo protozoário *Neospora caninum* responsável por perdas econômicas na agropecuária de corte e leite (Reichel *et al.*, 2013). Essa enfermidade acomete várias espécies domésticas e silvestres em diversos países, entre elas os caprinos (Mesquita *et al.*, 2013, Nakagaki *et al.* 2016, Oliveira Junior *et al.*, 2020). Em caprinos as maiores complicações em fêmeas prenhas, incluem abortos, natimortos, nascimento de animais fracos ou animais assintomáticos, mas permanentemente infectados (Porto *et al.*, 2016; Mesquita *et al.*, 2018).

A infecção por *N. caninum* pode ser confirmada pela presença de anticorpos anti-*N. caninum* no soro sanguíneo (Dubey *et al.*, 2003), o que geralmente indica o status de portador em bovinos adultos (Camillo *et al.*, 2011b). Além do soro, anticorpos também tem sido detectados em amostras de leite individual e coletivas de bovino (Camillo *et al.* 2011a, 2011b, Cirone *et al.*, 2021, Villa *et al.*, 2024) e em colostro de bovinos (Moskwa *et al.*, 2007) e de ovinos (Bezerra *et al.*, 2022), utilizando provas sorológicas como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (Camillo *et al.*, 2011a, 2011b; Cirone *et al.*, 2021; Bezerra *et al.*, 2022) Estes estudos demonstram concordância nos resultados quando comparado a titulação no soro e no leite (Camillo *et al.* 2011a, 2011b; Bezerra *et al.*, 2022).

Em caprinos não há estudos demonstrando a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em colostro e leite ao longo do período de lactação, assim como a sua comparação com a titulação sanguínea. Desta forma este estudo tem por objetivos detectar anticorpos anti-*Neospora caninum* em colostro e leite durante o período de lactação de cabras naturalmente infectadas e comparar a titulação no colostro e leite com a titulação em soro sanguíneo.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo tem aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo n°009/22 (em anexo) da Universidade Federal de Lavras.

Manejo dos caprinos e coleta de sangue

Foram utilizadas 09 cabras naturalmente infectadas por *N. caninum*, com idade entre dois e 10 anos, com histórico de abortos e nascimento de filhotes soropositivos (antes de mamar colostro) e três cabras soronegativas, todas testadas previamente pela RIFI para pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum*. O rebanho é mantido pelo Setor de Patologia Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras por mais de 10 anos. Todas as cabras foram mantidas em um piquete telado durante o dia e em baias de alvenaria durante o período noturno. Neste ambiente, receberam alimentação (feno/silagem e ração) duas vezes ao dia e água *ad libitum*. Além disso, foram realizados exames clínico, coproparasitológico e vermifugação periódica.

As cabras foram emprenhadas através de monta natural. Para confirmação de prenhez foi realizada a ultrassonografia no dia 30 após a monta e periodicamente para monitorar a viabilidade fetal. O sangue da mãe e dos filhotes (antes de mamar o colostro) foram coletados no dia do parto e mensalmente até completar 120 dias pós-parto. Foram coletados 5 mL de sangue, o qual foi centrifugado a 3000rpm durante 10 minutos e o soro armazenado a -20°C até a realização da RIFI. Todas as cabras foram testadas previamente para *Toxoplasma gondii* pela RIFI, *Brucella* spp, *Cloxiella burnetti* e *Chlamydia* spp. por PCR, sendo todos os testes com resultado negativo para os respectivos agentes.

Coleta das amostras de colostro e leite

Foram coletados 10 mL de colostro e de leite através de ordenha manual, após realização da antissepsia dos tetos com álcool iodado e uso de luvas durante a manipulação. As amostras foram armazenadas individualmente em tubo tipo Falcon® estéril e mantidas sob refrigeração até a chegada ao laboratório, onde foram armazenadas a -20°C. As coletas foram realizadas no dia do parto (D0), dia três (D3), D6, D9, D12, D15, D30, D60, D90e D120. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 2500rpm durante 15 minutos para separação de três fases do leite: gordura, líquida (intermediária) e precipitado (sólida). A fase líquida foi alíquotada em microtubos (2 ml) tipo eppendorf®, armazenadas a -20°C para posterior realização da RIFI.

Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI)

Utilizou-se a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para a pesquisa de anticorpos IgG anti- *Neospora caninum* nas amostras de soro, colostro e leite, armazenados em microtubos a -20°C, conforme técnica previamente padronizada (Mesquita *et al.*, 2013; Oliveira Junior *et al.*, 2020). Foram utilizadas lâminas contendo taquizoítos (antígeno) de *N. caninum* do isolado NC-1 (Dubey *et al.*, 1988) adquiridas comercialmente e como controle positivo e negativo, soro sanguíneo de caprinos já testados anteriormente por Oliveira Junior *et al.* (2020).

As amostras de colostro e leite (fase líquida) foram descongeladas em temperatura ambiente e em seguida diluídas a um ponto de corte de 1:50, assim como os soros controle positivo e negativo, e posteriormente incubadas com antígenos a 37°C por uma hora em câmara úmida. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em PBS e secas à temperatura ambiente. Após a secagem das lâminas, foi aplicada imunoglobulina marcada com o conjugado fluoresceína-anti-IgG caprino (conjugado Sigma Aldrich), diluída em PBS (1:100).

As lâminas foram incubadas a 37°C por uma hora em câmara úmida e escura. Em seguida, submetidas ao mesmo processo de lavagem, secagem em temperatura ambiente, cobertas com glicerina tamponada 10% e examinadas por meio do microscópio de luz ultravioleta. Em cada lâmina foram colocados os soros controles positivo e negativo. O título de anticorpos foi obtido pela maior diluição que resultar na completa fluorescência da superfície de taquizoítos de *N. caninum* (Figliuolo *et al.*, 2004), considerando ponto de corte 1:50.

RESULTADOS

A titulação final de anticorpos anti-*N. caninum* para o colostro e leite estão demonstrados na tabela 1 e para o soro sanguíneo das cabras e filhotes na tabela 2 e 3 respectivamente. Três cabras abortaram, não sendo possível a coleta do sangue dos filhotes. Uma cabra positiva foi sacrificada no pós-parto e as três cabras negativas não apresentaram titulação anti-*N. caninum* ao longo da fase experimental.

A detecção de anticorpos anti-*N. caninum* foi eficiente em 100% das amostras de soro (9/9) no dia do parto, em 90,62% das amostras de soro coletadas até os 120 dias de lactação (29/32) em 88,88% do colostro (8/9) e em 58,33 % (42/72) das amostras de leite, sendo que

cabras com títulos mais altos no soro tenderam a apresentar maior titulação no colostro e as cabras com título de 1:50 no soro foram negativas (cabra 2) ou apresentaram título semelhante (cabra 5) somente em três períodos da lactação. Somente 25% das cabras (2/8) apresentaram anticorpos anti-*N. caninum* ao longo dos 120 dias de lactação, sendo que o número de animais positivos foram diminuindo assim como a titulação (Tabela 1), onde no D3, 87,5% das cabras (7/8) apresentavam títulos anti-*N. caninum*; no D6 e D9, 62,5% (5/8); no D12 e D15, 75% (6/8); no D30, 62,5% (5/8), no D60, 37,5% (3/8); no D90, 25% (2/8) e no D120, 37,5% das cabras (3/8) foram positivas.

Tabela 1. Títulos de IgG anti-*N. caninum* obtidos através da Reação de Imunofluorescência Indireta em colostro e leite de cabras naturalmente infectadas até 120 dias de lactação.

Cabra	D0	D3	D6	D9	D12	D15	D30	D60	D90	D120
1*	100	800	200	200	100	200	50	200	200	100
2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
3	800	200	50	400	200	50	400	50	NEG	50
4**	6.400	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
5	50	50	NEG	NEG	NEG	NEG	50	NEG	NEG	NEG
6*	200	50	NEG	NEG	50	50	NEG	NEG	NEG	NEG
7	6.400	800	50	50	50	50	NEG	NEG	NEG	NEG
8*	6.400	1600	200	200	200	50	200	100	200	100
9	1.600	400	100	50	50	50	50	NEG	NEG	NEG

NC: não coletado; * Distúrbios reprodutivos (abortos ou natimorto); ** Eutanásia; NEG: negativo.

Tabela 2. Títulos de IgG anti-*N. caninum* obtidos através da Reação de Imunofluorescência Indireta em soro sanguíneo de cabras naturalmente infectadas do dia do parto até 120 dias de lactação.

Cabra	D0	D30	D60	D90	D120
1*	6400	3200	1600	3200	3200
2	50	NEG	50	50	50
3	6400	3200	3200	1600	3200
4**	3200	NC	NC	NC	NC
5	50	50	NEG	NEG	50
6*	800	800	400	800	400
7	3200	1600	6400	3200	1600
8*	1600	3200	3200	1600	3200
9	400	800	800	400	1600

NC: Não coletado; * distúrbios reprodutivos; **Eutanásia; NEG: negativo.

Gráfico 1. Títulos de IgG anti-*Neospora caninum* obtidos através da Reação de Imunofluorescência Indireta em colostro e leite de cabras naturalmente infectadas até 120 dias de lactação.

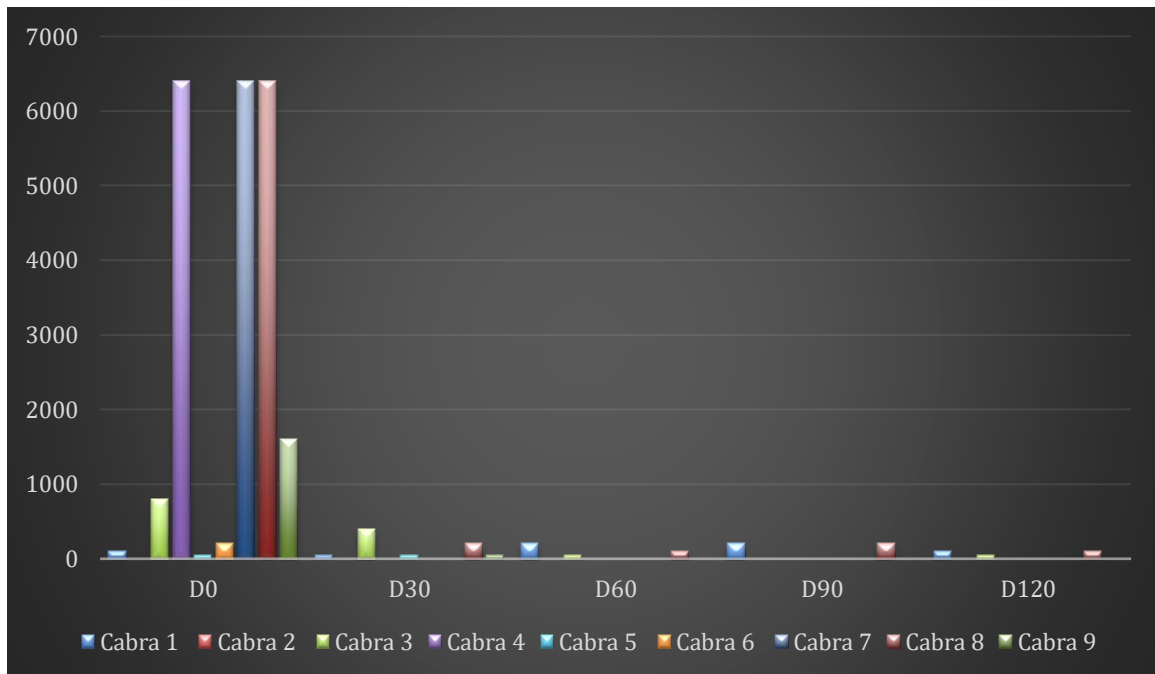


Gráfico 2. Títulos de IgG anti-*Neospora caninum* obtidos através da Reação de Imunofluorescência Indireta em soro de cabras naturalmente infectadas até 120 dias de lactação.

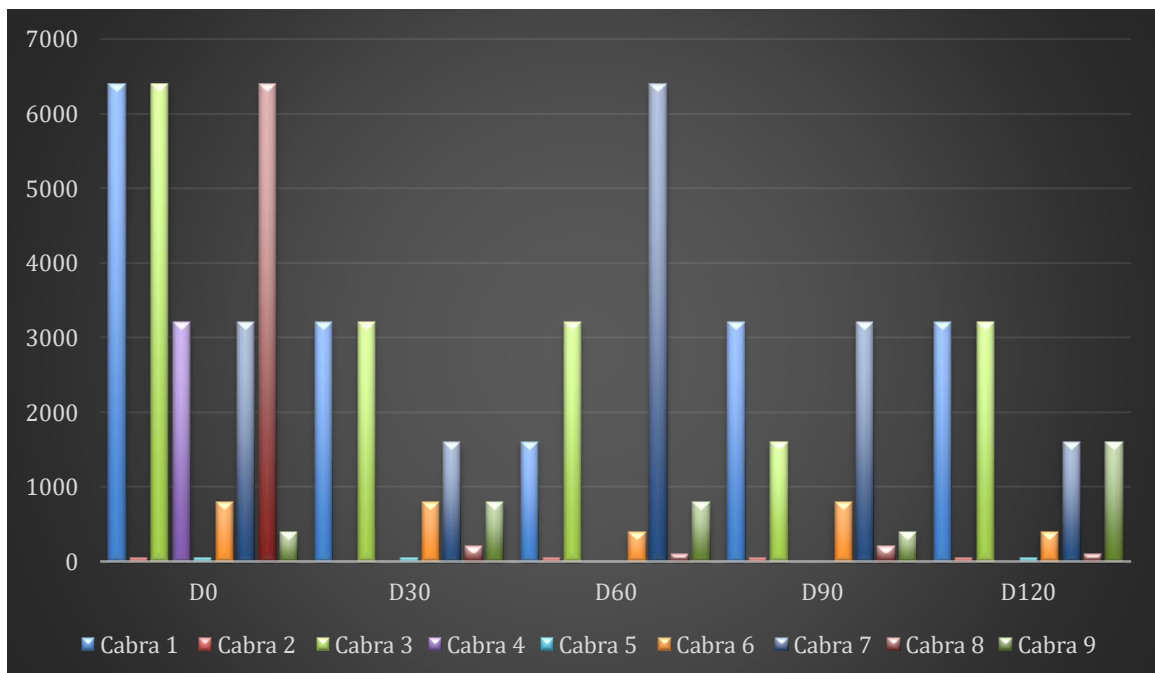


Tabela 3. Título de IgG anti-*N. caninum* por Reação de Imunofluorescência Indireta em soro sanguíneo pré-colostro dos cabritos de cabras naturalmente infectadas.

Cabrito	Mãe	D0
F1	2	Negativo
F2	2	Negativo
F3	5	Negativo
F4	5	Negativo
F5	3	1600
F6	3	800
F7	9	200
F8	9	50
F9	7	400
F10	7	1600

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Devido ao caráter persistente da neosporose, a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* geralmente indica o status de portador em bovinos adultos (Camillo *et al.*, 2011b), e esses achados podem ser expandidos para as outras espécies. Neste estudo, a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* foi eficiente em 100% (9/9) das amostras de soro no dia do parto e em 88,88% das amostras de colostro (8/9). Esses resultados são semelhantes aos achados de Moska *et al.* (2007) em bovinos, com uma concordância de 95% entre o colostro e o soro, confirmando que o colostro é um bom indicador da infecção por *N. caninum*.

A detecção de anticorpos anti-*N. caninum*, nas amostras de leite foi de 58,33% (42/72), com uma tendência a diminuição ao longo da lactação. Essa diminuição progressiva é esperada fisiologicamente, uma vez que a IgG é a primeira classe de imunoglobulina no leite de caprinos, sendo a maior concentração de IgG observada no colostro com 32.99 mg/ml. A concentração de IgG, diminui progressivamente ao longo da lactação, como por exemplo, no dia um, (20.13mg/mL) e no dia 90 de lactação, último dia quantificado (0.88mg/ml) (Sanchez-Macias *et al.*, 2014). No entanto, não há estudos disponíveis para comparar o comportamento dos títulos de anticorpos no leite em caprinos com neosporose crônica. Em animais recém-nascidos que não mamaram o colostro, a presença de anticorpos indica que houve infecção transplacentária (Dubey, 2003), como o observado neste estudo, uma vez que a placenta sindesmocorial de ruminantes não permite a passagem de anticorpos da mãe para o feto (Chucrí *et al.*, 2010)

Cabras com títulos maiores no soro tendem a apresentar maior titulação no colostro e leite, e essa titulação persiste por um período de tempo mais longo no soro. Entre essas fêmeas estão aquelas que pariram filhotes positivos (cabras 3, 7 e 9). Por outro lado, cabras com título de 1:50 no soro foram negativas (cabra 2) no colostro e leite ou apresentaram título semelhante (cabra 5) somente em três períodos da lactação, e não foram detectados anticorpos anti-*N. caninum* em seus filhotes. As variações na titulação no soro sanguíneos podem estar associadas a resposta imunológica individual, fase de reativação parasitária ou até mesmo a carga parasitária (Dubey *et al.*, 2007; Mesquita *et al.*, 2013). A não detecção de anticorpos anti *N. caninum* no leite de animais com títulos baixos de anticorpos no soro sanguíneo é descrito em bovinos (Camillo *et al.*, 2011b, González-Warleta *et al.*, 2011), justificando que os anticorpos IgG presentes no leite correspondem a cerca de 5% do que estaria no soro, podendo desta forma ser indetectáveis no leite quando os títulos sanguíneos forem baixos (González-Warleta *et al.*, 2011). Por outro lado, o nascimento de filhotes negativos de mães positivas para *N. caninum* pode estar associado a fase de recrudescência dos cistos parasitários na mãe (Mesquita *et al.*, 2013).

Algumas cabras apresentaram títulos de anticorpos anti-*N. caninum* maiores no colostro quando comparado ao soro (D0). Após esse período, a titulação no soro sempre foi maior que a do leite, sugerindo que títulos mais altos de anticorpos no colostro poderiam estar associados a fase de colostrogênese, onde a secreção mamária de IgG1 é mais alta do que no sangue, porém,

esses títulos pode ser influenciados por fatores imunossupressores (Wheeler *et al.*, 2007; Baumrucker e Bruckmaier, 2014).

Os resultados demonstram que houve detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em 88,88% das amostras de colostro e em 75% das amostras de leite nos animais até o 15º dia de lactação e que a RIFI pode ser utilizada para a triagem de rebanhos caprinos positivos para *N. caninum*, principalmente no colostro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, G. S. *et al.* Soroprevalence for *Neospora caninum* in goats of Minas Gerais state, Brazil. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 94, p. 584-586, 2012.

ATKINSON, R. *et al.* Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. **Parasitology Today**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 110-113, 2000.

BASSO, W. *et al.* *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep and goats in Switzerland: Seroprevalence and occurrence in aborted fetuses. **Food and Waterborne Parasitology**, [s. l.], v. 28, p. 1-12, 2022.

BAUMRUCKER, C. R., BRUCKMAIER, R. M. Colostrogenesis: IgG1 Transcytosis Mechanisms. **J. Mammary Gland Biol Neoplasia**, [s. l.], v. 19, p. 103-117, 2014.

BEZERRA, R. A. *et al.* Detection of Anti-*Neospora caninum* IgG in Blood Serum and Colostrum Samples in Naturally Sheep and in their Newborn Offspring. **Pathogens**, [s. l.], v.11, n.11, p.1-9, 2022.

BJERKAS, I. *et al.* Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, [s. l.], v.70, p. 271-274, 1984.

CAMILLO, G. *et al.* Reação de Imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras coletivas de leite. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 41, n. 9, p. 1600-1604, 2011a.

CAMILLO, G. *et al.* Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras individuais e coletivas de leite de bovinos pela reação de imunofluorescência indireta. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 482-486, 2011b.

CHUCRI, T.M. *et al.* A review of immune transfer by placenta. **Journal of Reproductive Immunology**, [s. l.], v.87, p.14-20, 2010.

CIRONE, K.M. *et al.* Frequency of *Neospora caninum*-specific antibodies in bulk milk from

Dairy farms from Mar y Sierras Dairy Basin, Argentina. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and reports**, [s. l.], v. 26, p. 1-6, 2021.

CONRAD, P. A. *et al.* In vitro isolation and characterization of a *Neospora sp.* From aborted bovine foetuses. **Parasitology**, [s. l.], v. 106, n. 3, p. 239-249, 1993.

COSTA, R. C. *et al.* Histological and immunohistochemical characterization of the inflammatory and glial cells in the central nervous system of goat fetuses and adult male goats naturally infected with *Neospora caninum*. **BMC Veterinary Research**, [s. l.], v. 10, p. 291, December 2014.

DUARTE, P.O. *et al.* Serological evaluation of *Neospora caninum* in pregnant women treated at referral center for prenatal screening in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Campo Grande**, v. 29, n.4, p. 1-8, 2020.

DUBEY, J. P. *et al.* A newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**. V. 193, p. 1269- 1283. 1988

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

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

DUBEY, J. P., SCHARES, G. Review diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 140, n. 1-2, p. 1–34, 2006.

DUBEY, J. P. *et al.* Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 20, p. 323–369, 2007.

DUBEY, J. P., HEMPHILL, A., SCHARES, G., CALERO-BERNAL, R. (Eds). **Neosporosis in animals**. Boca Raton: Taylor & Francis, p. 329-336, 2017.

ELLIS, J. *et al.* The phylogeny of *Neospora caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [s. l.], v. 64, n. 2, p. 303-311, 1994.

FIGLIUOLO, L. P. C. *et al.* Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goat from São Paulo State, Brazil. **Small Ruminant Research**, [s. l.], v. 55, p. 29-32, October 2004.

GONZÁLEZ-WARLETA, M. *et al.* Anti-*Neospora caninum* antibodies in milk in relation to production losses in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, [s. l.], v. 101, p. 58– 64, 2011.

GUI, B. Z. *et al.* First report of *Neospora caninum* infection in pigs in China. **Transboundary and Emerging Diseases**, [s. l.], v. 67, p. 29-32, 2019.

HEMPHILL, A., GOTTSTEIN, B. Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 82, n. 6, p. 497-504, 1996.

MACALDOWIE, C. *et al.* Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. **Journal of Comparative Pathology**, [s. l.], v. 131, p. 142-156, 2004.

MALAGUTI, M. A., *et al.* *Neospora caninum* as causative agent of bovine encephalitis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 48-54, 2012.

MESQUITA, L. P. *et al.* Antibody kinetics in goats and conceptuses naturally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 196, p. 327-333, 2013.

MESQUITA, L. P. *et al.* Placental lesions associated with abortion and stillbirth in goats naturally infected by *Neospora caninum*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 444-449, 2018.

MOSKWA, B. *et al.* The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 100, p. 633–636, 2007.

NAKAGAKI, K. Y. R. *et al.* Lesions and distribution of *Neospora caninum* in tissues of naturally infected female goats. **Small Ruminant Research**, [s. l.], v. 140, p. 57–62, 2016.

OLIVEIRA JUNIOR, I. M. *et al.* Endogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* in successive generations of congenitally infected goats. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 284, 109191, 2020.

ORLANDO, D. R. *et al.* Abortos por *Neospora caninum* em bovinos do sul de Minas Gerais, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 1332-1338, 2014.

PEREIRA, K. A. G. *et al.* Transplacental transmission of *Neospora caninum* to lambs in successive pregnancies of naturally infected sheep in southern Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v.23, p. 1-5, 2021.

PORTO, W. J. N. *et al.* Experimental caprine neosporosis: the influence of gestational stage on the outcome of infection. **Veterinary Research**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 1-10, 2016.

REICHEL, M. P. *et al.* What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle -the billion dollar question. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 133-142, 2013.

SALANT, H. *et al.* *Neospora caninum* in crows from Israel. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 212, p.375-378, 2015.

SÁNCHEZ-MACÍAS, D. *et al.* From goat colostrum to milk: Physical, chemical, and immune evolution from partum to 90 days postpartum. **Journal of Dairy Science**, v.97, p. 10-16, 2013.

SATO, A. P., *et al.* Molecular detection of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in seabirds collected along the coast of Santa Catarina, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 33, p. e003624, 2024.

SILVA, S. P., *et al.* Comparação das técnicas de ELISA indireto e Imunofluorescência indireta na detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em búfalas (*Bubalus bubalis*). **Pesquisa**

Veterinária Brasileira, [s. l.], v.33, n.4, p. 431-434, 2013.

SOARES, H. S., *et al.* Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* in wildpigs (*Sus scrofa*) in the Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 112-116, 2016.

SOCARRAS, T. J. O. **Infecção experimental de ovelhas deslanadas com *Neospora caninum***. 2001. 63p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

STENLUND, S. *et al.* Characterization of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 83, p. 214-219, 1997.

VARASCHIN, M. S. *et al.* Congenital neosporosis in goats from the state of Minas Gerais, Brazil. **The Korean Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 63-67, 2012.

VILLA, L. *et al.* *Neospora caninum* antibodies in bulk milk from dairy cattle herds in Italy in relation to reproductive and productive parameters and spatial analysis. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 254, p. 1-10, 2024.

WHEELER, T. T. *et al.* Immune Components of Colostrum and Milk – A Historical Perspective. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, [s. l.], v. 12, p. 237-247, 2007.

WILLIAMS, D. J. L. *et al.* Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* – how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. **Parasitology**, [s. l.], v. 136, n. 1, p. 1895-1900, 2009.

ANEXO 1 – Aprovação do comitê de ética



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
 COMISSÕES PERMANENTES
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
 Cx.P.3037 - Lavras - MG - 37200-000 - (35) 3829-6182 cba@ufla.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada " Detecção de DNA de *Neospora caninum* em colostro, leite e glândula mamária, lesões teciduais e de anticorpos anti-N. caninum em colostro e leite de cabras naturalmente infectadas " protocolo nº 009/22, sob a responsabilidade de Mary Suzan Varaschin, Flademir Wouters, Djeison Lutier Raymundo, Angélica T. Barth Wouters e Ivam Moreira de Oliveira Junior, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de ensino e/ou pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas edificadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFLA, em reunião de 24/03/2022.

Vigência da autorização: de 01/04/2022 a 28/02/2023

Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica

Espécie/linhagem/raça: Caprino

Número de animais aprovados: 15

Peso/Idade: 10 a 70kg / 8anos

Sexo: fêmea

Origem dos animais (documento apresentado pelo pesquisador responsável e arquivado pela CEUA)

Rafael Neodini Remédio

Prof. Rafael Neodini Remédio
 Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Anexo 2 – Identificação das cabras

C1 – ALINE

C2 – ARIEL

C3 – BOMBINHA

C4 – DEBRITA

C5 – INÊS

C6 – MARCIA

C7 – NANDINHA

C8 – PAULINHA

C9 - SAPECA