

Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras individuais e coletivas de leite de bovinos pela reação de imunofluorescência indireta¹

Giovana Camillo^{2*}, Alfredo Skrebsky Cezar², Ana Maria Antonello², Luís Antônio Sangioni², Eduardo Furtado Flores², Gabriel Ribas Pereira³, Paulo Bayard Dias Gonçalves³ e Fernanda Silveira Flôres Vogel²

ABSTRACT.- Camillo G., Cezar A.S., Antonello A.M., Sangioni L.A., Flores E.F., Pereira G.R., Gonçalves P.B.D. & Vogel F.S.F. 2011. [Detection of antibodies against *Neospora caninum* in individual and bulk milk samples from cattle by the technique of indirect immunofluorescence assay.] Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras individuais e coletivas de leite de bovinos pela reação de imunofluorescência indireta. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31(6):482-486. Laboratório de Doenças Parasitárias, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: giovanacamillo@yahoo.com.br

Neospora caninum is a major causative agent of reproductive losses in cattle and the diagnosis of neosporosis is essential for control and eradication programs. Therefore, this study aimed to: (1) standardize an indirect immunofluorescence assay (IFAT) for detection of antibodies against *N. caninum* in bovine milk, starting from a standard IFAT used for blood serum samples; (2) check the agreement between antibodies detection by IFAT in blood serum and in milk of cows; (3) evaluate the suitability of IFAT for detection of anti-*N. caninum* antibodies in bulk milk samples. We tested samples of blood serum and milk collected from 112 lactating cows for detection of antibodies against *N. caninum*, furthermore, six bulk milk samples, each one corresponding to each dairy farm studied. Agreement between the detection of antibodies in blood serum (with antibody titer ≥ 50) and in milk, with 90% of sensitivity and 100% of specificity for the IFAT in milk samples were found in 78% of the animals. However, for cows with antibody titers ≥ 100 in blood serum, the agreement, the sensitivity and the specificity of the IFAT in milk were of 100%. It is shown that, considering the dairy farm conditions. The most appropriate diagnostic approach to be adopted regarding the collection of blood serum or milk can elect for search anti-*N. caninum* antibodies by IFAT. Moreover, detection of antibodies in bulk milk samples can serve for diagnosis and screening of herds with infected animals.

INDEX TERMS: *Neospora caninum*, serology, immunoglobulins, IgG, diagnostic, neosporosis.

RESUMO.- *Neospora caninum* é um agente envolvido em perdas reprodutivas em bovinos. O diagnóstico dessa infecção é de grande importância, principalmente para programas de erradicação e controle. Sendo assim, os objetivos

deste estudo foram: (1) adaptar uma reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*N. caninum* no leite, a partir de uma RIFI padronizada para a detecção desses anticorpos no soro sanguíneo, (2) analisar a concordância entre a detecção desses anticorpos pela RIFI no soro sanguíneo e no leite de fêmeas bovinas, (3) avaliar a viabilidade da RIFI para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em amostras coletivas de leite. Foram testadas amostras de soro sanguíneo e de leite, coletadas de 112 vacas em lactação, e seis amostras coletivas de leite, correspondentes a cada uma das propriedades avaliadas. Encontrou-se 78% de concordância entre a detecção de

¹ Recebido em 4 de janeiro de 2011.

Aceito para publicação em 2 de fevereiro de 2011.

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. *Autor para correspondência: giovanacamillo@yahoo.com.br

³ Departamento de Clínica de Grandes Animais, CCR-UFSM, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900.

anticorpos no soro sanguíneo (com título de anticorpos ≥ 50) e no leite, com sensibilidade de 90% e especificidade de 100% para a RIFI nas amostras de leite. Entretanto, para as vacas com títulos de anticorpos ≥ 100 no soro sanguíneo, tanto a concordância como os valores de sensibilidade e especificidade da RIFI no leite foram de 100%. Todas as amostras coletivas de leite foram positivas na RIFI. Isso demonstra que, conforme a propriedade pode-se eleger com segurança qual a melhor abordagem diagnóstica a ser adotada em relação à coleta de soro sanguíneo ou de leite para a pesquisa de *N. caninum* pela RIFI. Além disso, a determinação da presença de anticorpos em amostras coletivas de leite pode servir para diagnóstico e triagem de rebanhos com animais infectados.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Sorologia, imunoglobulinas, IgG, diagnóstico, neosporose.

INTRODUÇÃO

A infecção por *Neospora caninum* (Apicomplexa: Sarcocystidae) foi relatada, inicialmente, como causa de doença neurológica e músculo-esquelética em cães (Bjerkas et al. 1984). Desde então, a neosporose tem sido considerada uma das principais causas de aborto em bovinos em todo o mundo (Dubey & Lindsay 1996). Nessa espécie, sua patogenia está relacionada, principalmente, com perdas reprodutivas, com destaque para a mortalidade embrionária e para os abortos no primeiro e no segundo terço gestacionais, respectivamente (Dubey et al. 2003). Por outro lado, morte fetal ou aborto são pouco frequentes no terço final de gestação, quando passa a ser comum a produção de bezerros saudáveis, porém, persistentemente infectados (PIs). Essas manifestações induzidas pelo parasito causam relevantes prejuízos ao acometerem rebanhos de corte e leiteiros (Dubey et al. 1999a). Em geral, a infecção não induz imunidade protetiva, podendo acarretar distúrbios reprodutivos, repetidas vezes ao longo da vida das fêmeas infectadas (Garcia-Vazquez et al. 2002).

O ciclo biológico de *N. caninum* foi esclarecido por McAllister et al. (1998) e envolve hospedeiros definitivos (HDs) e intermediários (HIs). Os primeiros, até o presente momento, cães e coiotes abrigam o agente etiológico e eliminam seus oocistos nas fezes (Gondim et al. 2004). Os oocistos esporulam no ambiente tornando-se infectantes para os HIs (uma ampla gama de espécies de animais vertebrados). Estes, por sua vez, após ingerirem os oocistos esporulados, podem desenvolver cistos teciduais com bradizoítos. Os HDs, então, se infectam ao se alimentarem de tecidos contendo cistos (Dubey 2003). Além de disseminar-se por transmissão horizontal, este agente etiológico pode, ainda, ser transmitido verticalmente por via transplacentária. A transmissão vertical tem grande importância na manutenção deste protozoário em rebanhos bovinos, pois a maioria das infecções congênitas resulta no nascimento de bezerros PIs (Trees & Williams 2005).

Atualmente, a infecção por *N. caninum* em bovinos é investigada pela pesquisa de anticorpos no soro sangüí-

neo, embora seu diagnóstico definitivo deva se basear na detecção de antígenos ou ácidos nucléicos do protozoário em tecidos - por exemplo, a partir de fetos abortados ou da placenta (Silva 2005). Contudo, devido ao caráter persistente da infecção, a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* geralmente indica o *status* de portador em bovinos adultos. A exceção a isso seriam os anticorpos oriundos de imunidade passiva e de vacinação. Em fetos, ou em neonatos desprovidos de colostro, a presença de anticorpos indica que houve infecção transplacentária e que estes animais são PIs (Dubey 2003). Com isso, demonstra-se que a identificação de animais soropositivos é de grande utilidade caso se deseje erradicar o agente em uma população. As técnicas sorológicas mais utilizadas para esse fim são: ELISA e a RIFI (Dubey & Schares 2006).

Ensaio imunoenzimático (ELISA) têm sido descritos tanto para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em amostras de leite individuais (Björkman et al., 1997; Schares et al. 2005, Chanlun et al. 2006a), quanto naquelas provenientes de tanques (amostras coletivas) (Chanlun et al. 2002, Chanlun et al. 2006b). Embora diferentes testes para detecção de anticorpos anti-*N. caninum* no leite já tenham sido descritos (Schaes et al. 2004, Chanlun et al. 2006b), pouco se estudou a respeito da utilização da RIFI para pesquisa desses anticorpos no leite bovino. A RIFI, entretanto, é utilizada rotineiramente para a pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* em amostras de soro sanguíneo, sendo considerado o teste de referência para esse fim (Ugglia et al. 1998). Já para o diagnóstico direto, ou seja, a detecção de antígenos e/ou de ácidos nucléicos do protozoário em tecidos, diferentes técnicas têm sido utilizadas, com destaque para a imunistoquímica e para a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Dubey & Schares 2006).

O controle da neosporose é baseado, principalmente, na identificação e descarte dos animais portadores (Thurmond & Hietala 1995). Para avaliação prévia de um rebanho, técnicas que possibilitem a detecção de anticorpos em amostras coletivas de leite são desejáveis, destacando-se a praticidade e os menores custos inerentes a essa metodologia. Nesse sentido, a RIFI pode representar uma alternativa ao diagnóstico sorológico para anticorpos anti-*N. caninum* em amostras individuais ou coletivas de leite principalmente em laboratórios que não dispõem de equipamentos para realização do ELISA.

Assim, os objetivos deste trabalho foram: (1) adaptar a RIFI para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em amostras de leite bovino; (2) avaliar a concordância entre a presença desses anticorpos em amostras de soro sanguíneo e do leite de fêmeas bovinas; (3) avaliar a utilidade da RIFI para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em amostras coletivas de leite como método detecção de rebanhos infectados.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental

Um total de 112 fêmeas bovinas oriundas de seis propriedades produtoras de leite, localizadas na região central do Rio

Quadro 1. Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* pela reação de imunofluorescência indireta em amostras de soro sanguíneo e em amostras individuais e coletivas de leite

Rebanho	Soro sanguíneo (ponto de corte de 1:50)		Leite	
	Positivas/total (%)	Títulos de Ac (média) ^a	Positivas/total ^b (%)	Amostras coletivas (do tanque)
1	5/13(38,4%)	2,4	4/13 (30,7%)	+
2	2/8(25,0%)	2	2/8 (25,0%)	+
3	4/11(36,4%)	3	3/11 (27,2%)	+
4	4/7(54,1%)	2,25	4/7 (54,1%)	+
5	29/48(60,4%)	2,62	28/48 (58,3%)	+
6	16/25(64%)	2,25	7/25 (28%)	+
Total	60/112(53,5%)	2,55	48/112 (42,8%)	6/6 100%

^a Média Geométrica (GMT) expresso no log 2^x.5².

^b Amostras individuais de leite.

Grande do Sul, foram utilizadas no presente estudo. Foram coletadas amostras de sangue e de leite de vacas em lactação, e também uma amostra coletiva de leite, para a pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum*. O número de animais testados por propriedade está apresentado no Quadro 1.

Coletas de sangue e de leite

Foram coletadas amostras de sangue, por punção da veia coccígea, e identificadas individualmente. As amostras de leite individuais foram coletadas de todos os animais em lactação em tubos de ensaio estéreis. De cada propriedade, foi coletada uma amostra coletiva de leite, 15mL aproximadamente, do tanque refrigerado, o qual continha a totalidade do leite coletado das vacas que foram avaliadas. Sequencialmente, as amostras de sangue foram submetidas à centrifugação a 1000 xG por 10min para obtenção do soro. Da mesma forma, as amostras de leite para extração da camada de gordura. As amostras de soro sanguíneo e de leite foram armazenadas a -20°C.

Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

A pesquisa de imunoglobulinas da classe G, anti-*N. caninum* no soro sanguíneo e no leite foi realizada pela RIFI. A RIFI foi realizada em lâminas de microscopia contendo taquizoítos da cepa NC-1 de *N. caninum* fixados por metanol. As amostras de soro sanguíneo (diluído em PBS, pH 7,2, a 1:50) ou de leite (não-diluído) foram utilizadas como anticorpo primário (e incubadas por 30 min, a 37°C, em câmara úmida). Como anticorpo secundário foi utilizada anti-IgG⁴ bovina conjugada com fluoresceína (incubação por 30 min, a 37°C, em câmara úmida). Amostras de soro sanguíneo ou de leite de bovinos, sabidamente positivas ou negativas, foram utilizadas como controle. Todas as amostras de soro sanguíneo positivas nas diluições de 1:50 foram submetidas à titulação para determinação do título máximo da reação. As amostras de leite não foram diluídas, de acordo com a padronização da RIFI, previamente realizada (dados não apresentados).

Foram consideradas positivas as reações com fluorescência periférica ou difusa dos taquizoítos, assim como, fluorescências apicais ou polares foram consideradas reações negativas (Paré et al. 1995). As amostras de soro sanguíneo e de leite foram testadas paralelamente. Os resultados da detecção de anticorpos nos diferentes fluidos testados foram compara-

⁴ Anti-IgG⁴ bovina conjugada com a fluoresceína (FITC): Affinity Purified Antibody Fluorescein. Clopper Road 910, Gaithersburg, MD 20878 USA < www.kpl.com >

dos, utilizando-se os resultados da RIFI no soro sanguíneo como referência. Assim, foram calculadas, seguindo as recomendações da OPAS (1997), a sensibilidade, a especificidade e a concordância (índice kappa) da detecção de anticorpos no leite pela RIFI.

RESULTADOS

Os resultados do presente estudo estão apresentados nos Quadros 1 e 2. Detectaram-se anticorpos anti-*Neospora caninum* em todos os rebanhos avaliados, com frequências de detecção de anticorpos no soro sanguíneo variando entre 25% (Rebanho 2) e 64% (Rebanho 6), e com um total de 53,6% de vacas soropositivas (60/112), utilizando-se o ponto de corte de 1:50 (Quadro 1). Nas amostras positivas, os títulos de anticorpos no soro sanguíneo variaram de 50 a 800. A maior parte dessas vacas soropositivas (36/60; 60%) teve títulos de anticorpos de 50 ou 100.

A sensibilidade e a especificidade da detecção de anticorpos pela RIFI para o leite foram calculadas utilizando como padrão a detecção de anticorpos nas amostras de soro sanguíneo. A comparação entre os resultados de detecção de anticorpos anti-*N. caninum* no soro sanguíneo e no leite (Quadro 1 e 2) demonstrou 100% de concordância para os animais com título de anticorpos no soro sanguíneo ≥ 100 . No entanto, dentre as amostras cujo título de anticorpos foi de 50, obteve-se apenas 40% de concor-

Quadro 2. Comparação entre o título de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras de soro sanguíneo e a detecção qualitativa de anticorpos em amostras individuais de leite através da técnica de imunofluorescência indireta (RIFI)

Título de anticorpos no soro sanguíneo	Soro sanguíneo	Leite
	Nº de vacas positivas/total de amostras(%)	Nº de vacas positivas/total de positivas no soro sanguíneo(%, κ^a)
50	18/112 (16,1%)	6/18 (33,3%, 40%)
100	18/112 (16,1%)	18/18 (100%, 100%)
200	8/112 (7,1%)	8/8 (100%, 100%)
400	0 9/112 (8,0%)	9/9 (100%, 100%)
800	7/112 (6,2%)	7/7 (100%, 100%)
Total	60/112 (53,5%)	48/60 (80%, 78%)

^a Índice KAPPA (κ).

dância. Por sua vez, quando consideradas todas as amostras de soro sanguíneo (com título de anticorpos de 50, como ponto de corte), obtiveram-se concordância de 78%, sensibilidade de 90% e especificidade de 100%.

DISCUSSÃO

Atualmente, há poucos relatos em relação à detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* no leite pela RIFI. De maneira geral, os resultados obtidos aqui concordam com aqueles obtidos por Ooi et al. (2000), que utilizaram amostras de leite de vacas com título de anticorpos e"200 no soro sanguíneo e obtiveram 100% de concordância para a RIFI. Embora esses autores tenham utilizado a RIFI para detecção de anticorpos no leite, a maioria dos estudos conduzidos com esse fim utiliza como teste diagnóstico o ELISA. Björkman et al. (1997) ao avaliarem a viabilidade do teste ELISA para demonstração de anticorpos anti-*N. caninum* no leite, utilizando amostras de vacas sabidamente soropositivas e soronegativas, encontraram uma concordância de 95% nos resultados. Da mesma forma, Schares et al. (2004), analisando a adaptação de um ELISA comercial para testar amostras de soro de sangue e de leite, observaram uma boa correlação entre os resultados das amostras pareadas, além de ressaltar que o uso do leite em um teste ELISA comercial é uma alternativa viável para diagnóstico sorológico de aborto, uma vez que, em animais com histórico abortivo, houve maior sensibilidade de detecção através da pesquisa de anticorpos no leite do que no soro sanguíneo. Em outro estudo relacionado, através do teste de ELISA (iscom), Chanlun et al. (2006a) também encontraram alta correlação entre o nível de anticorpos no soro sanguíneo e no leite de animais positivos. Os resultados foram avaliados a partir de um percentual de positividade, o qual demonstrou uma variação considerável entre soro e leite, porém o leite foi consistentemente mais positivo.

Os resultados obtidos no presente estudo são importantes do ponto de vista diagnóstico por representar uma abordagem alternativa. Além disso, a correlação encontrada entre o título de anticorpos no soro sanguíneo e no leite não é surpreendente e pode ser explicada notando-se que os níveis de imunoglobulinas no leite são influenciados pelo nível de anticorpos no soro sanguíneo (Tizard 2008). No entanto, sabe-se que outros fatores também influenciam nesta correlação, tais como fase da lactação e a produção leiteira diária, o que pode diminuir o título de anticorpos no leite (Chanlun et al. 2006a). Das amostras avaliadas, as que não tiveram concordância, ou seja, que foram positivas na amostra de soro sanguíneo e negativas na de leite (12/60; 20%), foram algumas daquelas cuja titulação no soro sanguíneo foi de 50 ($n=18$; κ 40%). Considerando que a maioria dos testes realizados utilizam diluições do soro partindo de 1:100, estas amostras seriam irrelevantes do ponto de vista do diagnóstico, uma vez que todas as amostras de soro sanguíneo discordantes seriam negativas na diluição de 1:100 ou superior. Nesses casos, a concordância seria de 100%.

Todas as amostras coletivas de leite das seis propriedades testadas foram positivas para anticorpos anti-*N. caninum* (Quadro 1), inclusive na Propriedade 2, a qual apresentou a menor média geométrica do título de anticorpos (título médio de 2) e a menor frequência de vacas soropositivas (25%). Tal fato demonstra a viabilidade do teste de amostras coletivas de leite nas condições encontradas no presente estudo, destacando-se a praticidade desse tipo de amostragem e sua aplicabilidade para o diagnóstico em nível de rebanho para a detecção da presença de anticorpos anti-*N. caninum* nos rebanhos leiteiros. Chanlun et al. (2002) realizaram um estudo semelhante, no qual, por meio do teste de ELISA (iscom), obtiveram alta absorvância nas amostras coletivas dos dois rebanhos soropositivos para *N. caninum* e, do contrário, baixa absorvância para os rebanhos soronegativos. Estes resultados aliados aos do presente estudo demonstram a viabilidade da pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* em amostras individuais e coletivas de leite, como alternativas para o diagnóstico das infecções por *N. caninum* em rebanhos leiteiros.

Em resumo, existe boa concordância na detecção de anticorpos anti-*N. caninum* no soro sanguíneo e no leite. A partir disso, pode-se afirmar que o diagnóstico sorológico para *N. caninum* em vacas leiteiras pode ser realizado com segurança a partir do leite. Como vantagem tem-se, ainda, que a coleta do leite não é invasiva e, conseqüentemente, os riscos de transmissão de doenças e de promoção de estresse aos animais são reduzidos. Além disso, a determinação da presença de anticorpos em amostras coletivas de leite pode servir para diagnóstico e triagem de rebanhos com animais infectados.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram boa concordância entre a detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* da classe G no leite e no soro sanguíneo pela RIFI.

Conforme a propriedade pode-se, com segurança, eleger qual a melhor abordagem diagnóstica, ou seja, soro sanguíneo ou leite.

O fato de que em todas as propriedades com animais positivos foram encontrados anticorpos na amostra coletiva de leite, sugere que esse tipo de amostragem pode representar uma alternativa diagnóstica, em propriedades de leite, visando diagnóstico de rebanho e para estudos epidemiológicos.

Agradecimentos.- Aos professores Rudi Weiblen e Eduardo Furtado Flores por disponibilizarem o Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria. À farmacêutica bioquímica Patrícia Bräunig pelo auxílio concedido para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Bjerkas I., Mohn S.F. & Presthus J. 1984. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenkd.* 70:271-274.
- Björkman C., Holmdahl O.J.M. & Uggla A. 1997. An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. *Vet. Parasitol.*, 68:251-260.

- Chanlun A., Näslund K., Aiumlamai S. & Björkman C. 2002. Use of bulk milk for detection of *Neospora caninum* infection in dairy herds in Thailand. *Vet. Parasitol.* 110:35-44.
- Chanlun A., Emanuelson U., Aiumlamai S. & Björkman C. 2006a. Variations of *Neospora caninum* antibody levels in milk during lactation in dairy cows. *Vet. Parasitol.* 141:349-355.
- Chanlun A., Emanuelson U., Chanlun S., Aiumlamai S. & Björkman C. 2006b. Application of repeated bulk milk testing for identification of infection dynamics of *Neospora caninum* in Thai dairy herds. *Vet. Parasitol.* 136:243-250.
- Dubey J.P. & Lindsay D.S. 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 67:1-59.
- Dubey J.P. 1999a. Neosporosis in cattle: Biology and economic impact. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214:1160-1163.
- Dubey J.P. 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Kor. J. Parasitol.* 41:1-16.
- Dubey J. P. & Schares G. 2006. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet. Parasitol.* 140:1-34.
- García-Vázquez Z., Cruz-Vázquez C., Medina-Espinoza L., García-Tapia D. & Chavarría-Martínez B. 2002. Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, Mexico. *Vet. Parasitol.* 106:115-120.
- Gondim L.F., McAllister M.M., Pitt W.C. & Zemlicka D.E. 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 34:159-161.
- McAllister M.M., Dubey J.P., Lindsay D.S., Jolley W.R., Wills R.A. & McGuire A.M. 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 28:1473-1478.
- Ooi H.K., Huang C.C., Yang C.H. & Lee S.H. 2000. Serological survey and first finding of *Neospora caninum* in Taiwan, and the detection of its antibodies in various body fluids of cattle. *Vet. Parasitol.* 90:47-55.
- Paré J., Hietala S.K. & Thurmond M.C. 1995. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *J. Vet. Diag. Invest.* 7:273-275.
- Schares G., Bärwald A., Staubach C., Wurm R., Rauser M., Conraths F.J. & Schroeder C. 2004. Adaptation of a commercial ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. *Vet. Parasitol.* 120:55-63.
- Schares G., Barwald A. & Conraths F.J. 2005. Adaptation of a surface antigen-based ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. *J. Vet. Med. B, Infect. Dis. Vet. Publ. Hlth.* 52:45-48.
- Silva A.C. 2005. Diagnóstico da neosporose bovina. *Revta Bras. Parasitol. Vet.* 13:29-33.
- Thurmond M. & Hietala S.K. 1995. Strategies to control *Neospora caninum* infection in cattle. *Bov. Pract.* 4:29-32.
- Tizard I.R. 2008. *Imunologia Veterinária*. Elsevier, Rio de Janeiro. 587p.
- Trees A.J. & Williams D.J. 2005. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol.* 21:558-561.
- Uggla A., Stenlund S., Holmdahl O.J.M., Jakubek E.B., Thebo P., Kindahl H. & Björkman C. 1998. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *Int. J. Parasitol.* 28:1467-1472.