



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL
UFRPE

POMY DE CÁSSIA PEIXOTO KIM

**DINÂMICA DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Neospora caninum* NO
MODELO DE RECRUDESCÊNCIA EM CABRAS GESTANTES E AVALIAÇÃO DE
TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DA NEOSPOROSE EM CAPRINOS**

RECIFE

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

POMY DE CÁSSIA PEIXOTO KIM

**DINÂMICA DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Neospora caninum* NO
MODELO DE RECRUDESCÊNCIA EM CABRAS GESTANTES E AVALIAÇÃO DE
TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DA NEOSPOROSE EM CAPRINOS**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal Tropical.

Área de Concentração: Epidemiologia, patologia, diagnóstico e controle das doenças nos trópicos

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota.
Co-Orientador: Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior.

RECIFE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

K49d Kim, Pomy de Cassia Peixoto
Dinâmica da infecção experimental por *Neospora caninum* no modelo de recrudescência em cabras gestantes e avaliação de técnicas de diagnóstico da neosporose em caprinos / Pomy de Cassia Peixoto Kim. – 2018.
105 f. : il.

Orientador: Rinaldo Aparecido Mota.
Coorientador: José Wilton Pinheiro Junior.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Recife, BR-PE, 2018.
Inclui referências e anexo(s).

1. Neosporose 2. Caprinos 3. Patogenia 4. Modelo Experimental 5. Sorologia I. Mota, Rinaldo Aparecido, orient. II. Pinheiro Junior, José Wilton, coorient. III. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

DINÂMICA DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Neospora caninum* NO MODELO
DE RECRUDESCÊNCIA EM CABRAS GESTANTES E AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS
DE DIAGNÓSTICO DA NEOSPOROSE EM CAPRINOS

Tese elaborada por Pomy de Cássia Peixoto Kim

Aprovada em 28 de fevereiro de 2018.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota – Orientador
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Prof. Dra. Jaqueline Bianque de Oliveira
Departamento de Biologia – UFRPE

Prof. Dr. Wagner José Nascimento Porto
Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Alagoas

Prof. Dra. Flaviana Santos Wanderley
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas

Dra. Érica Paes Barreto Xavier de Moraes Oliveira
Médica Veterinária

Para meu pai, Kim Jung Hwi.
내 아버지를 위해.

“Há em cada cidade uma tocha - o professor;
e um extintor - o padre.”
Victor Hugo

“Blackbird singing in the dead of night
Take these broken wings and learn to fly
All your life
You were only waiting for this moment to arise
(...) to be free”
John Lennon / Paul McCartney

AGRADECIMENTOS

À toda minha família pelo amor e apoio. Tenho como obrigação moral, devolver ao país que acolheu meu pai, todos os frutos promissores do meu trabalho, principalmente aqueles que deixem um legado para a sociedade, sejam eles acadêmicos ou morais no âmbito da educação. Sei que para meu pai é um orgulho que seus descendentes, fixados no Brasil, possuam a mesma formação de qualidade que aqueles familiares educados em outros países. Portanto, agradeço todo o incentivo que me foi dado para atingir tal nível acadêmico, podendo dedicar exclusivamente minha vida à educação. 감사합니다!

Ao Jonatas, meu companheiro - utilizando todas as definições para esse adjetivo. Fico grata por ter você como exemplo a ser seguido. Agradeço imensamente sua ajuda ao longo dessa fase, pela sua dedicação e seu suor nos momentos laboriosos de campo e experimentais. Obrigada por sempre me estimular, mesmo nas horas mais nebulosas e nos tristes momentos que me redoeram ao longo do doutoramento, bem como no dia-a-dia. Mesmo quando distantes um do outro, sei que sempre será meu porto seguro. *“Because maybe, you're gonna be the one that saves me. And after all, you're my wonderwall.”*

Ao meu orientador, Professor Rinaldo Mota, um ser humano admirável. Obrigada por sempre ter acreditado em mim e ter me dado tantas oportunidades ao longo de minha formação. Espero sempre poder contar com suas orientações acadêmicas e ainda poder ter o senhor ao meu lado durante os anos que se seguem. Estarei sempre à sua disposição e agradeço pela sua confiança.

Aos companheiros do Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas dos Animais Domésticos da UFRPE, tanto a safra antiga (aqueles que sabem que o piso original do nosso laboratório era da cor verde musgo), bem como, a nova safra (aquela que nunca limpou os vidros externos das janelas tendo que espantar o avestruz com a vassoura). Agradeço em especial toda a ajuda da amiga Renata Pimentel, e ainda por ela sempre ser meu poço de tranquilidade que balanceou meu agitado espírito ao longo desses anos.

Aos companheiros de república “Neo-Babilônia”, Júnior Mário e Emanuela Mesquita.

Aos Professores José Wilton Pinheiro Junior, Jaqueline Bianque, Flaviana Wanderley e Rita Maia pelas sugestões e incentivo ao longo do doutoramento e durante o processo de qualificação.

Ao Professor Wagner Porto, por toda sua ajuda durante o experimento, seu companheirismo e amizade ao longo dessa etapa. Dividir minha rotina ao seu lado foi uma excelente fase em minha vida e ainda pude entender como um verdadeiro doutor deve se portar.

À Dra. Érica Moraes por ter me apresentado a área da biologia molecular e por sempre contribuir com minha formação acadêmica, desde o início de minha iniciação científica.

Aos meus supervisores espanhóis, Professor Luís Miguel Ortega Mora e Dr. Javier Regidor Cerrillo, por todas as orientações científicas durante o período sanduíche em Madrid.

Aos meus amigos do Grupo Saluvet, em especial à *new generation*: Alex, Daniel, Laura, Marta e Carlos; à Lola, Vanessa, Javier Moreno, Pilar, Esther e Gema. Gracias por todo.

A todos os servidores, alunos e colaboradores da UFAL que participaram ativamente dessa etapa, em especial aqueles pertencentes da unidade acadêmica de Viçosa, em especial, agradeço à Ana Clécia, Seu Manoel, Marciel, Seu João e Alandesson.

As amigas Thyara, Camila e Suely, por estarem sempre ao meu lado em solos pernambucanos. E aos amigos alagoanos: Emily, Leandro e suas respectivas famílias.

Aos animais que deram suas vidas em nome desse trabalho, e que de alguma forma cumpriram com seu carma.

A todos os professores que participaram de minha formação.

À FACEPE e ao CNPq pela concessão da bolsa de pós-graduação e de doutorado sanduíche.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Caprinocultura: origem, número e produção	17
2.2 <i>Neospora caninum</i>	18
2.2.1 Ciclo biológico	18
2.2.2 Diversidade genética de <i>Neospora caninum</i>	20
2.3 Vias de transmissão de <i>Neospora caninum</i>	21
2.3.1 Mecanismos de transmissão de <i>Neospora caninum</i>	22
2.4 Patogenia da neosporose	25
2.4.1 Modelos experimentais da neosporose em pequenos ruminantes	26
2.5 Resposta imune na infecção por <i>Neospora caninum</i>	28
2.6 Soroprevalência na espécie caprina	30
2.7 Diagnóstico	32
2.7.1 Diagnóstico indireto	32
2.7.2 Detecção direta do parasito	35
2.8 Controle e Profilaxia	36
3. OBJETIVOS	38
3.1. Geral	38
3.2. Específicos	38
4. REFERÊNCIAS	39
Capítulo 1: Study of recrudescence of neosporosis in experimentally infected goats ...	62
Capítulo 2: Evaluation of the serological response and agreement between three diagnostic techniques of neosporosis in goats	80
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
6. ANEXOS	101
6.1 Comprovantes de submissão	101

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

- Figura 1.** Ciclo biológico heteroxeno de *Neospora caninum* (DUBEY et al., 2017) 20
- Figura 2.** Dendograma ilustrando as relações genéticas de nove isolados de *N. caninum* obtidas de diferentes hospedeiros e localidades utilizando análise multilocus de 12 microssatélites polimórficos (REGIDOR-CERRILLO et al., 2006) 21
- Figura 3.** Relação parasito-hospedeiro e gestação. Adaptado de TREES & WILLIAMS (2005) 23

Capítulo 1

- Figure 1.** Mean rectal temperatures (95% confidence interval) from days -3 to 21 days post-inoculation. Goats of inoculated group with 10^7 tachyzoites of *N. caninum*. Negative control group inoculated with Marc-145 cells in buffer solution at the same inoculation dose (10^7 Marc-145 cells per animal) 70
- Figure 2.** *N. caninum*-specific IgG responses in the serum of goats inoculated with 10^7 tachyzoites and negative control group. Data are expressed as mean relative index per cent (RIPC) and error bars are the standard deviations for each group. Positive cut-off ≥ 10 RIPC 71

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1. Prevalência de anticorpos específicos contra *Neospora caninum* em caprinos..... 31

Capítulo 1

Table 1. Mating and gestation data; parasite DNA detection and histopathological changes in kids and maternal tissues of goats inoculated with 107 tachyzoites of *Neospora caninum* Nc-Spain 7 isolate prior mating 79

Capítulo 2

Table 1. A comparative concordance between three serodiagnostic assays using reference samples of goat sera tested for anti-*N. caninum* antibody detection 97

Table 2. Frequency of anti-*N. caninum* IgG antibodies in samples sera of 500 goats - A comparative concordance between three serodiagnostic assays 98

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%:	Por cento
®:	Marca registrada
°C:	Graus Celsius
µg:	Micrograma
bpm:	Batimentos por minuto
bp:	Base pairs
d.p.i.:	Days post-inoculation
DNA:	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA:	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
eCG:	Equine chorionic gonadotropin
FAO:	Food and Agriculture Organization
g:	Grama
h:	Hora
HE:	Hematoxylin and eosin
HIV:	Human Immunodeficiency Virus
I.U:	International units
IFAT:	Immunofluorescence Antibody Test
IFN-γ:	Interferon gama
Ig:	Imunoglobulina
ITS1:	Internal transcribedspacer 1 region
IV:	Intravenoso
Kg:	Quilo
Km:	Quilômetro
mg:	Miligrama
ml:	Mililitro
mm:	Milímetros
NAT:	<i>Neospora</i> Agglutination Test
ng:	Nanograma
µL:	Micro litro
OD:	Optical density
p.i:	Pós-inoculação
P4:	Progesterona
PCR:	Polymerase Chain Reaction
RIPC:	Relative index per cent
rpm:	Rotações por minuto
UV:	Ultravioleta

RESUMO: Neste estudo objetivou-se aprofundar os conhecimentos sobre a dinâmica da infecção experimental por *Neospora caninum* na cabra gestante, utilizando um modelo de recrudescência e ainda, avaliar diferentes técnicas de diagnóstico sorológico. No modelo de recrudescência, dez fêmeas foram experimentalmente inoculadas e pariram: doze animais nascidos vivos (12/14), um natimorto (1/14) e outro com óbito pré-maturo (1/14). Nos tecidos das cabras inoculadas, foi detectado DNA de *N. caninum* em: 33,3% (3/9) dos cérebros, 22,2% (2/9) do linfonodos uterinos e 40% (4/10) das placentas. Nas amostras das crias, o DNA foi detectado em: 21,42% (3/14) dos cérebros, 28,57% (4/14) dos fígados e 21,42% (3/14) dos músculos esqueléticos foram positivos. Em segundo experimento objetivou-se avaliar a soroprevalência de caprinos naturalmente infectados por *N. caninum* em três técnicas sorológicas (RIFI, NAT e ELISA) e avaliar a concordância entre estas técnicas. As soroprevalências de anticorpos anti-*N. caninum* foram de 3,2% no NAT, 4,6% na RIFI e 6,4% no ELISA. Utilizando a RIFI como técnica de referência: NAT e ELISA foram considerados fraco e substancial, respectivamente; foram obtidos valores de sensibilidade de 91,3% e 97,7% de especificidade no ELISA; NAT apresentou resultados de sensibilidade de 26,1% e de especificidade de 97,9%. Estes resultados incrementam dados sobre a patogenia da neosporose caprina com a verificação da transmissão vertical de *N. caninum* comprovada através da PCR. E ainda sugerimos que a RIFI permaneça como técnica de escolha no diagnóstico sorológico da neosporose caprina em amostras individuais com as as recomendações e pontos de corte adotados neste estudo.

PALAVRAS-CHAVE

Neosporose; caprinos; patogenia; modelo experimental; sorologia.

ABSTRACT: The purpose of this study was to obtain new insights about the dynamic of experimental infection by *Neospora caninum* in pregnant goats by the recrudescence model and the performance of diferentes serological techniques. In recrudescence model, ten females were experimental inoculated and delivered: twelve animals born alive (12/14), one stillborn (1/14) and another died shortly after birth (1/14). The *N. caninum* DNA was detected in tissues of infected goats as described: 33.3% (3/9) of the brains, 22.2% (2/9) of the uterine lymph node and 40% (4/10) of the placentas. In the offspring samples, DNA was detected as described: 21.42% (3/14) of brains, 28.57% (4/14) of livers and 21.42% (3/14) of skeletal muscles were positive. In the second experiment, the aimed to measure the serological response of goats infected with *N. caninum* by assessing the diagnostic performance and agreement between three techniques (IFAT, NAT and ELISA). In the field serum samples tested, the seroprevalences of anti-*N. caninum* antibodies were: 3.2%, 4.6%, and 6.4% in the NAT, IFAT and ELISA, respectively. Using the IFAT as the gold standard, the NAT and the ELISA were considered weak and strong, respectively; ELISA showed 91.3% sensitivity and 97.7% specificity; NAT presented sensitivity of 26.1% and specificity of 97.9%. These results provide data about the pathogenesis of caprine neosporosis by the observation of the vertical transmission of *N. caninum*. Accordingly, the IFAT should remains the assay of choice for studies about *N. caninum* infection in goats in individual serum samples with our recomendations of cut-off points.

KEYWORDS

Neosporosis; caprine; pathogeny; experimental model; serological.

1. INTRODUÇÃO

A eficiência da produção de um rebanho pode também ser influenciada por seu desempenho reprodutivo, independentemente do propósito, visando obter um maior número de animais nascidos e maiores lucros (NUNES & SALGUEIRO, 2011). Uma variedade de agentes infecciosos é reconhecida como causa de abortamento em caprinos e ovinos, destacando-se bactérias como *Chlamydophila abortus*, *Coxiella burnetii*, *Brucella melitensis*, *Campylobacter* spp., agentes virais como o herpesvírus caprino e pestivírus, o protozoário *Toxoplasma gondii* e mais recentemente *Neospora caninum* que vem ganhando destaque nas falhas reprodutivas em pequenos ruminantes (KIRKBRIDE, 1993; MOELLER, 2001; GIVENS & MANLEY, 2008; FTHENAKIS & PAPADOPOULOS, 2017).

Neospora caninum está intimamente relacionado com *Toxoplasma gondii*. É um protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa e de ciclo heteroxeno. Apresenta como hospedeiros definitivos naturais o cão (*Canis familiaris*) (MCALISSTER et al., 1998; BASSO et al., 2001) e o lobo cinzento (*Canis lupus*) (DUBEY et al., 2011), além de outros canídeos como o coiote (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004a) e o dingo australiano (*C. domesticus*) (KING et al., 2010) que foram confirmados experimentalmente como hospedeiros definitivos deste protozoário.

Apresenta relevância como agente causador de abortos em bovinos e distúrbios neuromusculares em caninos. Porém, com a utilização de métodos de diagnóstico direto (identificação do parasito) e indireto (pesquisa de anticorpos), a infecção por este protozoário tem sido descrita em uma gama de espécies animais que participam ativamente de seu ciclo biológico como hospedeiros intermediários (TRESS et al., 1999; DUBEY, 2003).

Quanto aos mecanismos de infecção transplacentária, Tress e Williams (2005) descreveram duas categorias distintas: a infecção transplacentária endógena, relacionada à recrudescência de uma infecção crônica pré-existente na fêmea e a infecção transplacentária exógena como resultado de uma primo-infecção durante a gestação. As diferenças nesses dois mecanismos estão associadas com as distintas características epidemiológicas e imunológicas da transmissão de *N. caninum* (WILLIAMS et al., 2009).

Diferentes estudos soro-epidemiológicos demonstraram que para bovinos, a persistência da infecção por *N. caninum* em um rebanho está significativamente relacionada à transmissão vertical, propagada ao longo de sucessivas gerações (TRESS et al. 1999), indicando que as vacas permanecem infectadas ao longo da vida,

transmitindo o parasito para sua progênie em gestações consecutivas (BJOORKMAN et al., 1996; ANDERSON et al., 1997; PIERGILI-FIORETTI et al., 2003), ou ainda, de forma intermitente (GUY et al., 2001).

Estudos experimentais com inoculação de taquizoítos vivos de *N. caninum* em bovinos, meses antes da gestação, não confirmaram a infecção em gestações subsequentes (WILLIAMS et al., 2000; INNES et al., 2001), contrastando com o que ocorre em infecções naturais nesta espécie (GUY et al., 2001; INNES et al., 2002; WILLIAMS et al., 2003). Em ovinos, Jolley et al. (1999) descreveram a transmissão vertical para fetos de ovelhas com infecções latentes. Nas inoculações experimentais, mesmo que seja estabelecida uma infecção persistente, a recrudescência tem sido relatada de forma menos frequente nesta espécie (BUXTON et al., 2001; SYED-HUSSAIN et al., 2015).

Embora já exista a ocorrência de casos naturais de aborto e mortalidade neonatal em caprinos por *N. caninum* nos Estados Unidos (BARR et al., 1992), Costa Rica (DUBEY et al., 1996), Brasil (CORBELLINI et al., 2001; MESQUITA et al., 2013; NUNES et al., 2017; COSTA et al., 2018) e Itália (ELENI et al., 2004), ainda não está claro a real consequência da infecção natural por este coccídio como agente abortivo em cabras. Mesmo com a existência de distintos trabalhos de infecção experimental com *N. caninum* em cabras gestantes, demonstrando a ocorrência de abortamento, natimortos ou nascimento de cabritos clinicamente saudáveis em distintos períodos da gestação (PORTO et al., 2016), ainda não está totalmente elucidado se os caprinos experimental ou naturalmente infectados permanecem com episódios de recrudescência da infecção em gestações subsequentes.

A disponibilidade de modelos bem definidos da infecção é um fator chave para avaliação e desenvolvimento de novas vacinas e de drogas candidatas ao tratamento da neosporose (HORCAJO et al., 2016). Modelos experimentais caprinos se apresentam como estratégias úteis nesse campo de pesquisa, principalmente pelas vantagens relativas ao tamanho, período gestacional e custo de manutenção dessas espécies quando comparadas com o modelo bovino (ARRANZ-SOLÍS et al., 2015; PORTO et al., 2016).

Para se conhecer com mais detalhes a dinâmica da infecção experimental na espécie caprina é importante realizar outros estudos com o objetivo de determinar a capacidade de manutenção da infecção no rebanho por meio da recrudescência da infecção em cabras gestantes, além de avaliar a resposta de anticorpos em diferentes técnicas, contribuindo, assim com dados importantes sobre a patogenia e o diagnóstico da neosporose em cabras.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caprinocultura: origem, número e produção

Caprinos e ovinos pertencem ao chamado grupo de pequenos ruminantes, se encaixando perfeitamente em sistemas agrícolas de pequena escala (subsistência), sendo normalmente mantidos por pequenos agricultores por razões econômicas (FAO, 2009).

Os pequenos ruminantes foram às primeiras espécies a serem domesticadas pelos seres humanos e fazendeiros primitivos há cerca de 10 mil anos. Os primeiros rebanhos ancestrais foram originados a partir de raças de cabras e ovelhas selvagens nas regiões atualmente pertencentes ao Iraque, Irã, Síria e Turquia oriental (HAENLEIN, 2007; HATZIMINAOGLOU AND BOYAZOGLU, 2004).

A caprinocultura tornou-se recentemente um tema recorrente na agenda pública e literatura científica, considerada como estratégia adaptativa às mudanças climáticas globais (DEVENDRA, 2010). As vantagens da espécie caprina incluem sua capacidade de se adaptar no atual sistema de produção da chamada agricultura verde, fazendo oposição aos sistemas intensivos de produção de bovinos (DARCAN & SILANIKOVE, 2017).

A população mundial total de cabras no ano de 2014 foi estimada na ordem de 1,06 bilhão de cabeças, incluindo 1156 raças registradas (FAO, 2014). Aproximadamente 98% da população de caprinos concentram-se nos países em desenvolvimento, destacando o continente Asiático (480 milhões de cabeças) e Africano (169 milhões de cabeças) (DEVENDRA, 2010; FAO, 2014). Quanto à produção mundial, a região do Mediterrâneo se destaca por possuir 18% do mercado produtor de leite e queijo de cabra e a Austrália é considerado o mais importante exportador de carne; a África do Sul destaca-se como o principal produtor de *mohair* (50% total da produção mundial) e a China como o principal exportador de caxemira (65% total da produção) (DUBEUF et al., 2004).

No Brasil, estima-se que o rebanho caprino seja composto por 14 milhões de animais (VIANA, 2008; BRASIL, 2012) e 90% dessa população concentra-se na região Nordeste, com destaque para os estados da Bahia, Pernambuco, Piauí e Ceará (MACÊDO et al., 2008). Segundo dados oficiais, em Pernambuco encontram-se 21% do rebanho caprino que chega a 1.735.051 cabeças (BRASIL, 2012). A maioria dos animais naturalizados, nativos da região nordeste desenvolveu características peculiares devido ao isolamento geográfico, adaptando-se ao clima semiárido e suportando altas

temperaturas, escassez de alimentos, resistência às doenças e mantendo sua fertilidade, prolificidade e condição corporal mesmo em períodos mais secos do ano (BRASIL, 2007).

As parasitoses comprometem negativamente a produção e o bem-estar dos animais afetados, particularmente nos animais criados a campo, afetando diretamente o mercado produtivo nas regiões dos trópicos, onde caprinos desempenham um importante papel na agropecuária (FTHENAKIS & PAPADOPOULOS, 2017). Até recentemente, era amplamente aceito que evidências relacionadas às parasitoses gastrointestinais obtidas de estudos realizados em ovinos podiam ser transferidos diretamente aos caprinos, já que clínicos e pesquisadores não discriminavam ambas espécies como hospedeiros distintos (HOSTE et al., 2010). Atualmente, as diferenças foram claramente reconhecidas e o conhecimento sobre infecções e infestações parasitárias ovinas não são aplicados diretamente aos caprinos, com a necessidade de formulação e implementação de estratégias espécie-específicas para controle dessas doenças (FTHENAKIS & PAPADOPOULOS, 2017).

2.2 *Neospora caninum*

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, classe Spozoroza, subclasse Coccidia, família Sarcocystidae e subfamília Toxoplasmatinae (DUBEY et al., 2002).

Seu primeiro relato aconteceu em 1984 na Noruega, onde foi descrito como esporozoário formador de cisto, associado à encefalomielite e miosite em cães, resultando em paralisia e morte prematura de filhotes (BJERKAS et al., 1984). Apenas em 1988 foi nomeado como *Neospora caninum* após reavaliação de cistos teciduais de cachorros presumidamente mortos por toxoplasmose, sendo então descritas diferenças morfológicas entre ambos parasitos (DUBEY et al., 1988).

Já foi proposto que a especiação de *N. caninum* ocorreu após a especiação do cão primitivo (REID et al., 2012) há cerca de 57 milhões de anos atrás (HEDGES et al., 2006) no mesmo período de tempo em que cães (*Canis lupus familiaris*) e gatos (*Felis catus*) divergiram.

2.2.1 Ciclo biológico

N. caninum possui ciclo de vida heteroxeno, apresentando duas fases: a assexuada que ocorre nos tecidos dos hospedeiros intermediários e é caracterizada por multiplicação

por endodiogenia, com produção de taquizoítos, e multiplicação por endopoligenia, com produção de bradizoítos; e a fase sexuada que ocorre apenas no epitélio intestinal dos hospedeiros definitivos, caracterizando o ciclo enteroepitelial (Figura 1). Existem três estágios infectantes envolvidos no ciclo de vida de *N. caninum*: bradizoítos, taquizoítos e oocistos, estes últimos contendo esporozoítos em seu interior (McALLISTER et al., 1998; BUXTON et al., 2002; DUBEY et al., 2002).

Os hospedeiros definitivos são obrigatoriamente os carnívoros: o cão doméstico (*Canis familiaris*) e o lobo cinzento (*Canis lupus*) onde foi comprovada a eliminação de oocistos viáveis de *N. caninum* nas fezes de animais naturalmente infectados (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999; DUBEY et al., 2014). Em outros canídeos, como os coiotes (*Canis latrans*) e dingo australiano (*Canis domesticus*), já foi demonstrada a eliminação de oocistos viáveis após inoculação experimental (GONDIM et al., 2004; KING et al., 2010). Além disso já foram descritas evidências sorológicas da infecção em raposas (*Vulpes vulpesi* e *Urocyon cinereoargenteus*) (ROSYPAL & LINDSAY, 2005), cão do mato (*Lycalopex gymnocercus* e *Cercocyin thous*) (CAÑÓN-FRANCO et al., 2002) e lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*) (MATTOS et al., 2008).

São comumente citados como hospedeiros intermediários de *N. caninum* os bovinos, ovinos, caprinos, equinos, búfalos e cervídeos (DUBEY & SCHARES, 2011), além de algumas espécies de aves como pardais (GONDIM et al. 2010) e galinhas domésticas (COSTA et al., 2008). Evidências sorológicas sugerem que várias outras espécies de mamíferos e aves também possam desempenhar esse papel no ciclo de vida do parasito (DUBEY et al., 2007).

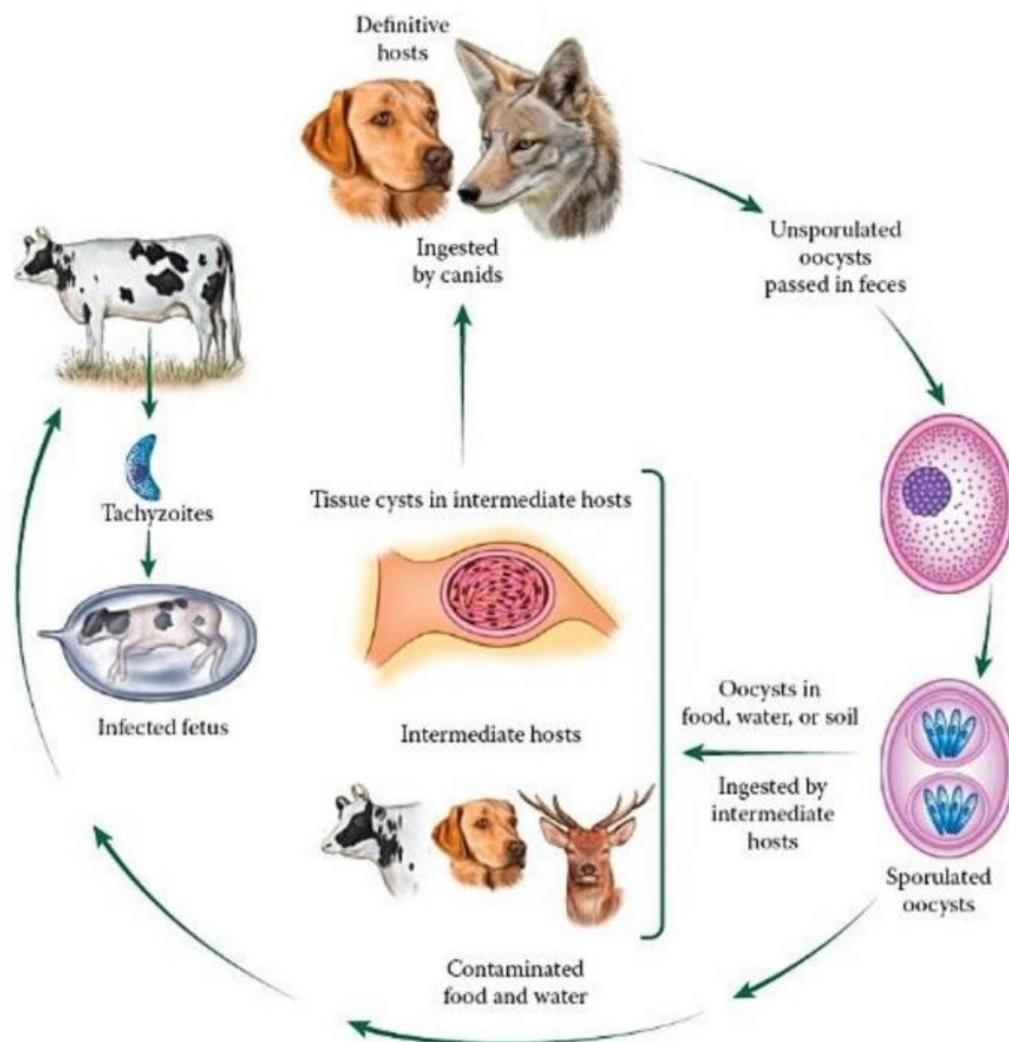


Figura 1. Ciclo biológico heteroxeno de *Neospora caninum* (DUBEY et al., 2017).

2.2.2 Diversidade genética de *Neospora caninum*

O isolamento de *N. caninum* foi descrito em uma variedade de espécies como caninos, bovinos, ovinos e bubalinos (AL-QASSAB et al., 2010) e muitos isolados foram caracterizados por análises de sequências de microssatélites (Figura 2) (REGIDOR-CERRILLO et al., 2006; SALEHI et al., 2015). Até o momento não foi descrito isolamento de *N. caninum* em caprinos (PORTO et al., 2016), embora um estudo recente descreva pela primeira vez a caracterização do alelo MS10 em três amostras de cabras naturalmente infectadas no Brasil, sendo este um importante microssatélite utilizado para diferenciação dos isolados (COSTA et al., 2018). A frequência desse alelo é descrita como variável em 20% a 30% em populações de isolados da Alemanha e Escócia e de menor frequência na Argentina e Espanha (REGIDOR-CERRILLO et al., 2016).

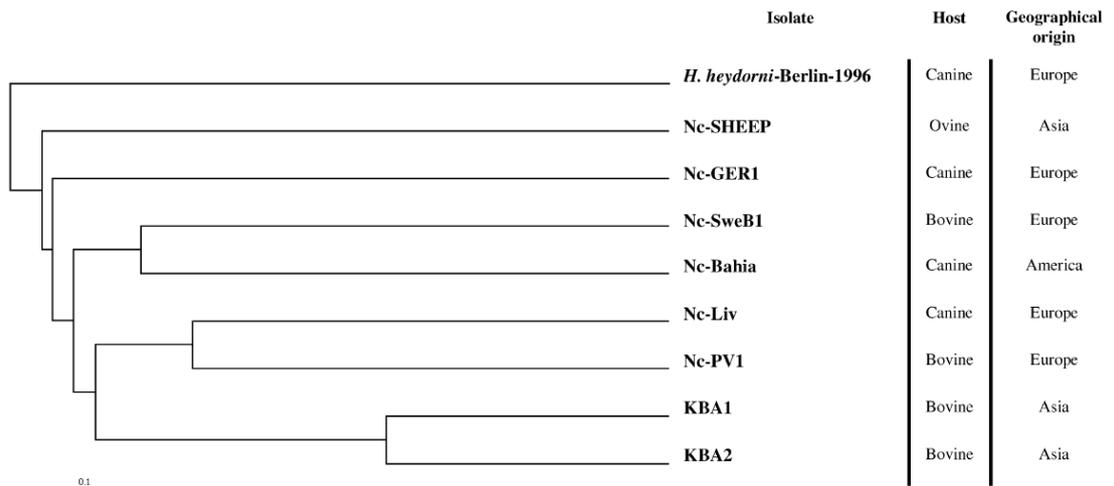


Figura 2. Dendrograma ilustrando as relações genéticas de nove isolados de *N. caninum* obtidas de diferentes hospedeiros e localidades utilizando análise multilocus de 12 microssatélites polimórficos (REGIDOR-CERRILLO et al., 2006).

Os estudos de comparação filogenética sugerem que os isolados são originados de populações heterogêneas ao redor do mundo (REGIDOR-CERRILLO et al., 2006; AL-QASSAB et al., 2010), e pode-se especular que a diversidade dentro da espécie contribui para sua patogenicidade e virulência, uma vez que as taxas de virulência encontradas em modelos murinos e o crescimento *in vitro* desses isolados variam (ATKINSON et al., 1999; SCHOCK et al., 2001; QUINN et al., 2002; REGIDOR CERRILLO et al., 2010). Além disso, a diferenciação genética entre as populações de *N. caninum* demonstram certo grau de subestruturação geográfica baseada em isolamento genético, podendo ser influenciada pelo processo de migração do parasito por meio do deslocamento dos hospedeiros entre os países (REGIDOR-CERRILLO et al., 2016).

2.3 Vias de transmissão de *Neospora caninum*

Classicamente a transmissão de *N. caninum* pode ocorrer pela via horizontal (infecção pós-natal) com a infecção do hospedeiro a partir da ingestão do oocisto esporulado e pela via vertical (endógena e exógena), a partir de uma fêmea persistentemente infectada por meio da infecção transplacentária (TREES et al., 2002; DUBEY et al., 2006). Os mecanismos de transmissão natural são amplamente descritos utilizando o modelo bovino por ser um importante agente causador de aborto nessa espécie (DUBEY, 2003).

2.3.1 Mecanismos de transmissão de *Neospora caninum*

i) Transmissão Horizontal

A ingestão de oocistos esporulados contendo esporozoítos de *N. caninum* presentes no ambiente é o único mecanismo de infecção natural demonstrado em bovinos após o nascimento (TREES et al., 2002). Os oocistos podem ser eliminados nas fezes de cães na fase aguda da infecção após a ingestão de tecidos de bovinos infectados (DIJKSTRA et al., 2001; INNES et al., 2005). O músculo esquelético de caprinos e ovinos experimentalmente infectados fornecidos a cães induzem uma maior eliminação de oocistos quando comparado a outros tecidos (SCHARES & CONRATHS, 2001). Um incremento na proporção de bovinos soropositivos com a idade e uma falta de correlação entre o soro *status* da vaca e suas crias fornecem evidências para a transmissão horizontal (DUBEY & SCHARES, 2011).

ii) Transmissão Vertical

N. caninum é um dos mais eficientes parasitos transmitidos de forma transplacentária entre todos os patógenos bovinos conhecidos (DUBEY & SCHARES, 2011). Vertical, congênita e transplacentária são termos utilizados para descrever a transmissão do parasito de uma geração para a próxima. Os termos exógeno e endógeno são utilizados para descrever dois cenários diferentes da transmissão de *N. caninum* ao feto (TREES & WILLIAMS et al., 2005; DUBEY et al., 2007). A transmissão transplacentária já foi induzida de forma experimental em bovinos, caninos, ovelhas, cabras, macacas, gatas e camundongos e ocorre de forma natural em vários hospedeiros (DUBEY et al., 2006).

Williams et al. (2009) caracterizaram as duas situações para as infecções transplacentária em bovinos como: a) **infecção transplacentária exógena** que ocorre na primo-infecção durante a gestação por meio da ingestão de oocistos. Os esporozoítos se diferenciam em taquizoítos e se disseminam por via hematogênica ou linfática, em células do sistema fagocitário mononuclear, culminando com em sua chegada ao útero, cruzam a barreira transplacentária com infecção fetal; b) **infecção transplacentária endógena** que ocorre como resultado de uma recrudescência (*de novo*) durante a gestação de uma infecção pré-existente. Nesse caso, os bradizoítos encistados se diferenciam em taquizoítos, culminando na disseminação sistêmica com consequente infecção do concepto (Figura 3).

Em bovinos, a transmissão vertical pode ocorrer ao longo de sucessivas gestações, principalmente quando fêmeas congenitamente infectadas são utilizadas para reprodução, sendo o parasito retransmitido de forma muito eficiente às crias, proporcionando a manutenção eficaz do agente no rebanho (INNES et al., 2005). A eficiência desta forma de transmissão natural é relatada em estudos baseados em análises sorológicas pré-colostrais de bezerros nascidos de vacas soropositivas, sendo observadas taxas que variam de 44% (BERGERON et al., 2001) a 95% (DAVISON et al., 1999).

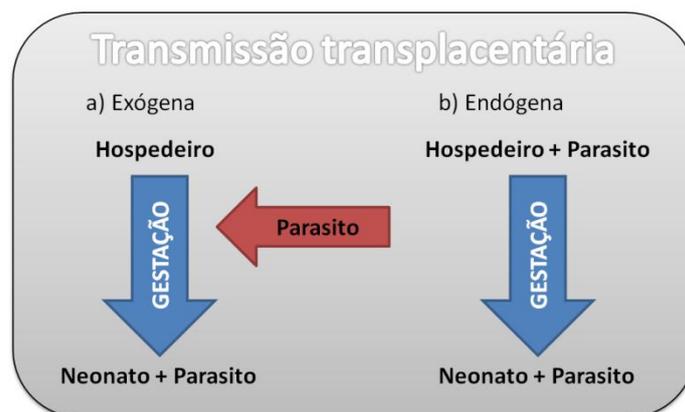


Figura 3. Relação parasito-hospedeiro e gestação. Adaptado de TREES & WILLIAMS (2005).

Historicamente, a transmissão vertical foi primeiramente reconhecida em cães, porém com cenários distintos dos observados em bovinos (DUBEY et al., 2007). Em cães, a infecção transplacentária é considerada variável e provavelmente não persiste na ausência de uma infecção horizontal, sendo o agente transmitido ao feto nos estágios finais da gestação ou por via lactogênica pós-natal (BARBER & TREES, 1998). As taxas de transmissão vertical são baixíssimas em filhotes nascidos de cadelas soropositivas e cerca de 80% não apresentam infecção por *N. caninum* (DUBEY et al., 2005).

Modelos matemáticos indicam que a transmissão transplacentária endógena sozinha não é suficiente para a manter a infecção em rebanhos bovinos (FRENCH et al., 1999), pois são observados decréscimos nas taxas de transmissão transplacentária endógena em subseqüentes gestações, indicando desenvolvimento de imunidade contra o parasito (ROMERO & FRANKENA, 2003; DUBEY et al., 2007). Estudos epidemiológicos de incidência em bovinos confirmam a contínua presença da transmissão horizontal dentro de rebanhos endêmicos (GONDIM et al., 2004b).

Taxas de transmissão vertical entre 10 a 12% já foram verificadas em ovinos experimentalmente infectados (JOLLEY et al., 1999) e 15,4% em um rebanho ovino

naturalmente infectado no Brasil (AZEVEDO-FILHO et al., 2017). Diferentes estudos demonstraram que *N. caninum* possui um papel representativo em casos de abortos em ovinos na Espanha (MORENO et al., 2012), Itália (MASALA et al., 2007), Jordânia (ABU-SHEHADA & ABU-HALAWA, 2010) Nova Zelândia (HOWE et al., 2008) e Austrália (BISHOP et al., 2010).

A infecção congênita em fetos de ovelhas cronicamente infectadas por *N. caninum* resulta em aborto semelhante ao descrito em infecções recrudescentes em vacas (JOLLEY et al., 1999). Por outro lado, Buxton et al. (2001) demonstraram que mesmo as ovelhas sendo suscetíveis à infecção, a recrudescência ocorre com menos frequência do que a descrita para bovinos, mesmo quando utilizada inoculações subsequentes do parasito nos animais já infectados. Syed-Hussain et al. (2015) demonstraram que ovelhas inoculadas dois meses antes do acasalamento não produziram evidências de transmissão para suas crias no primeiro ano, mas ressaltaram que alguns cordeiros nasceram infectados congenitamente no ano seguinte, indicando a transmissão vertical.

Em caprinos, existem poucas informações disponíveis sobre a transmissão congênita natural, porém estudos que confirmam a positividade em soros pré-colostrais de cabritos e detectaram a presença do parasito em fetos abortados e recém-nascidos indicam uma clara associação da ocorrência da transmissão transplacentária endógena (BARR et al., 1992; VARASCHIN et al., 2012; ALTBUCH et al., 2012; NUNES et al., 2017). Mesquita et al. (2013) descreveram taxas de 77% de transmissão congênita ao titular soros pré-colostrais obtidos de cabritos naturalmente infectados, associando tais resultado com taxas similares (75% a 81%) observadas em bovinos naturalmente infectados.

iii) Outras vias de transmissão horizontal pós-natal

Davison et al. (2001) relataram que *N. caninum* pode ser eliminado via leite ou em lóquios de animais infectados, indicando o potencial destas secreções como fontes de infecção para outros bovinos. A transmissão por via oral já foi descrita em bezerros neonatos alimentados com colostro ou leite contaminado com taquizoítos (UGGLA et al., 1998). Ainda não existem evidências na literatura que a transmissão de animal para animal possa ocorrer (DAVIDSON et al., 2001).

A transmissão venérea é possível, porém improvável a não ser mediante condições experimentais pela necessidade do uso de um grande número de taquizoítos para induzir a infecção (SERRANO-MARTÍNEZ et al., 2007; FERRE et al., 2008). A inseminação

artificial utilizando sêmen contaminado com taquizoítos resultou em soroconversão de algumas vacas e baixas taxas de gestação (SERRANO-MARTÍNEZ et al., 2011). A detecção de DNA de *N. caninum* já foi observada em sêmens de touros naturalmente infectados, porém em pequenas quantidades e em períodos intermitentes, portanto não sendo uma rota provável de transmissão natural (ORTEGA-MORA et al., 2003; CAETANO-DA-SILVA et al., 2004; FERRE et al., 2005). Em carneiros inoculados experimentalmente foi detectada presença de DNA de *N. caninum* de forma intermitente em até cinco semanas pós-inoculação, sendo encontradas concentrações variáveis de 1 a 889 taquizoítos por ml de sêmen. A conclusão obtida pelos autores é que seria incerta a possibilidade de transmissão por meio da monta natural (SYED-HUSSAIN et al., 2013).

2.4 Patogenia da neosporose

A ocorrência de lise celular causada pela multiplicação do agente, levando à doença, dependerá de um equilíbrio entre a capacidade do taquizoíto em penetrar, se multiplicar na célula hospedeira e a habilidade do sistema imune do hospedeiro em inibir esta multiplicação (ELLIS et al., 2010).

O reconhecimento e ligação inicial de *N. caninum* à célula hospedeira ocorre por um contato de baixa afinidade, envolvendo a presença de antígenos imunodominantes de superfície como a sequência NcSRS2 (*N. caninum* SAG-2 related sequence) (BUXTON et al., 2002). Após o contato inicial, segue-se o processo de adesão, caracterizado por uma associação de maior estabilidade entre os taquizoítos e a superfície da célula hospedeira, finalizando com a formação do vacúolo parasitóforo que leva a lise celular e infecção das células adjacentes (HEMPHILL et al., 2006). Os taquizoítos podem se diferenciar em bradizoítos em resposta a uma resposta imune (MILLER et al., 2009). Evidências mais recentes sugerem que os bradizoítos têm um importante papel na patogênese da neosporose (ROJO-MONTEJO et al., 2011).

Em animais não gestantes, a neosporose geralmente é assintomática (BUXTON et al., 2001). O principal sinal clínico da infecção por *N. caninum* em bovinos é a ocorrência de abortos ou ainda o nascimento prematuro de bezerros, podendo nascer com sinais neurológicos (DUBEY et al., 2006). Vacas de qualquer idade podem abortar durante os três primeiros meses até o final da gestação, sendo observada maior ocorrência de aborto entre o quinto e sexto mês da prenhez (DUBEY, 2003). Em períodos iniciais de gestação, fetos que morrem no útero podem ser mumificados ou reabsorvidos (DUBEY & SCHARES, 2011). Em estudos experimentais, foi descrito um curto período

de pirexia relativo à parasitemia (INNES et al., 2001; MALEY et al., 2003). Existem contradições quanto à perda embrionária e infertilidade na neosporose, sendo encontrado incremento no número de serviços por parto em vacas infectadas, sem prejuízos nas taxas de concepção (LÓPEZ-GATIUS et al., 2005). De acordo com Santolaria et al. (2009), vacas que abortaram por *N. caninum* rapidamente apresentaram fertilidade normal.

A implicação da neosporose em ovinos foi estudada pela primeira vez em um cordeiro congenitamente infectado nascido com sinais clínicos (DUBEY et al., 1990). Posteriormente, novos casos clínicos foram associados à infecção natural por *N. caninum* com ocorrência de aborto, mortalidade neonatal e aparecimento de sinais clínicos em ovinos adultos no Japão, Austrália, Suíça e América do Sul (KOBAYASHI et al., 2001; HASSIG et al., 2003; MOORE et al., 2005; BISHOP et al., 2010). A infecção natural por *N. caninum* também foi relacionada diretamente à ocorrência de casos de aborto e mortalidade neonatal em caprinos nos Estados Unidos (BARR et al., 1992), Itália (ELENI et al., 2004) e Brasil (CORBELLINI et al., 2001). A detecção de DNA de *N. caninum* foi descrita em amostras de encéfalos de fetos caprinos e ovinos abortados em diferentes países (MASALA et al., 2007; HOWE et al., 2008; ABO-SHEHADA E ABU-HALAWEH, 2010; UNZAGA et al., 2014), incluindo o Brasil (VARASCHIN et al., 2012; MESQUITA et al., 2013; NUNES et al., 2017), sugerindo um papel relevante de *N. caninum* como causa de aborto em pequenos ruminantes.

Em ovinos, a infecção por *N. caninum* também foi associada à diminuição do desempenho reprodutivo do rebanho (GONZALEZ-WARLETA et al., 2014). Em caprinos naturalmente infectados são mencionados distúrbios reprodutivos e a ocorrência de encefalite, caracterizadas por significativas lesões no sistema nervoso central (MESQUITA et al., 2013; COSTA et al., 2014; NAKAGARI et al., 2016; NUNES et al., 2017), sendo ainda descritas severas lesões placentárias, associada à multiplicação do parasito nos tecidos fetais (COSTA et al., 2018). Em cabritos recém-nascidos são observados distúrbios neurológicos na neosporose congênita, como sinais de paresia, ataxia e opistótono (CORBELLINI et al., 2001; VARASCHIN et al., 2012).

2.4.1 Modelos experimentais da neosporose em pequenos ruminantes

Diferentes infecções experimentais sustentam a suscetibilidade de ovinos e caprinos a *N. caninum*. A inoculação de dose superior a 10^5 taquizoítos de *N. caninum* entre os dias 45-90 de gestação (primeiro e segundo trimestre de gestação) pode causar aborto ou reabsorção embrionária, podendo, ainda, determinar o nascimento de cordeiros

doentes (McALLISTER et al., 1996; BUXTON et al., 1997, 1998, 2001; WESTON et al., 2009). A inoculação no terceiro terço da gestação (dia 120) resultou no nascimento de cordeiros clinicamente saudáveis (McALLISTER et al., 1996).

Recentemente, em estudo experimental utilizando ovelhas gestantes, Arranz-Solís et al. (2015) observaram diferentes resultados com inoculações de *N. caninum* (10^6 taquizoítos) em diferentes terços da gestação. Todas as ovelhas inoculadas no primeiro (40 dias – G1) e segundo terço (90 dias – G2) da gestação tiveram morte fetal, entretanto, apenas nos fetos oriundos das fêmeas do G1 foram observados múltiplos focos de necrose coagulativa no parênquima hepático, sem lesões macroscópicas placentárias; os fetos das fêmeas do G2 apresentaram lesões histológicas inflamatórias e nas placentas de algumas fêmeas foram observados agregados focais na vilosidade cotiledonária; todas as fêmeas inoculadas no terço final (aos 120 dias – G3) pariram cordeiros viáveis a termo, porém foram observados quadros de debilidade e decúbito em algumas crias. Após análise histológica evidenciou-se maior frequência de infiltrado de células inflamatórias nos encéfalos e musculatura esquelética destes animais quando comparado aos fetos dos grupos anteriores.

A inoculação de taquizoítos de *N. caninum* em cabras gestantes também produziu aborto, natimorto e nascimento de cabritos clinicamente saudáveis, dependendo da fase de gestação (PORTO et al., 2016). Lindsay et al. (1995) inocularam em cabras “anãs” com taquizoítos de *N. caninum* no dia 51 de gestação (primeiro terço) e observaram aborto em todas as cabras, enquanto que a inoculação no dia 81 (segundo terço), resultou em um natimorto em um dos dois animais inoculados; já a inoculação de *N. caninum* aos 127 dias de gestação (terceiro terço) não teve efeito clínico na gestação, resultando no nascimento de cabritos clinicamente saudáveis.

Porto et al. (2016) utilizaram modelo experimental de *N. caninum* em cabras gestantes, inoculando a dose de 10^6 taquizoítos por via intravenosa em fêmeas em diferentes períodos da gestação. Os autores descreveram pirexia e sinais clínicos como apatia, anorexia e pelos eriçados entre o quinto e nono dia pós-inoculação. Além disso, observaram morte fetal em todos os animais inoculados no primeiro terço da gestação (40 dias-G1) e em 57% dos animais inoculados no terço médio da gestação (90 dias-G2). Os animais inoculados no terço final da gestação (120 dias-G3) levaram a gestação a termo e pariram cabritos viáveis soropositivos em sua maioria, além de cabritos com quadros de debilidade e diminuição do reflexo de sucção e metade deles soropositivos; nos cabritos abortados foram observadas lesões microscópicas caracterizadas por presença de

múltiplos focos de necrose de coagulação e infiltrado de células inflamatórias no encéfalo e fígado; nas placentas dos animais dos três grupos foram observadas lesões necróticas multifocais não supurativas, embora sendo encontradas em maior extensão e frequência nas placentas dos animais do G1 e G2, caracterizada por focos distribuídos nos placentomas.

2.5 Resposta imune na infecção por *Neospora caninum*

A compreensão da neosporose leva a um frequente questionamento sobre o porquê de apenas uma proporção de vacas abortam e ainda o porquê de nem todos os bezerros de fêmeas infectadas são portadores da infecção congênita (GOODSWEN et al., 2013). Evidências atuais sugerem que a resposta imune à infecção está intrinsecamente ligada ao período gestacional, baseada no *status* pontual do sistema imunológico materno e fetal naquele período (WILLIAMS et al., 2000; INNES et al., 2001). Em bovinos, a resposta humoral e celular mediada contra *N. caninum* não é totalmente protetora, uma vez que a transmissão vertical pode ocorrer em subseqüentes gestações (BJÖRKMAN et al., 1996), contrastando com o tipo de resposta observada em infecções por *Toxoplasma gondii*, que após a exposição inicial, boa parte dos animais desenvolve uma sólida resposta imunológica, prevenindo a doença (INNES et al., 2002).

Em geral, anticorpos controlam a carga parasitária presente no sangue e fluídos teciduais, enquanto que a resposta mediada por células tem como alvo os parasitos intracelulares (HEMPHILL, 1999). Em animais natural e experimentalmente infectados, a resposta imunológica primária baseia-se na produção de interferon (IFN- γ), inicialmente pelas células *natural-killer*, inibindo a multiplicação intracelular do parasito (WILLIAMS et al., 2000; ARRANZ-SOLÍS et al., 2015; PORTO et al., 2017). Além disso, é descrita a produção de anticorpos IgG2 e resposta mista de células T do tipo Th1 e Th2 observada pela constante regulação da expressão de citocinas (IL-10, IL-2, TNF- α) em resposta à infecção parasitária (INNES et al., 2002; ANDRIANARIVO et al., 2001; ROSBOTTOM et al., 2008).

Porto et al. (2017) descreveram uma marcada diferença na expressão de IL-12 em caprinos comparada com outras espécies de ruminantes, indicando que a expressão de IL-12 é levemente induzida. Em ovinos, a expressão de IL-12 não é observada (ARRANZ-SOLÍS et al., 2015), contrastando com o descrito para bovinos que têm uma marcada expressão de IL-12 (ROSBOTTOM et al., 2008; ROSBOTTOM et al., 2011; REGIDOR-CERRILLO et al., 2014).

Williams et al. (2003) relataram que em infecções naturais, vacas cronicamente infectadas adquirem resposta imunológica protetora contra infecções exógenas de *N. caninum*, mas essa mesma proteção é ineficiente para proteger o feto ou ainda na prevenção de uma recrudescência de uma infecção latente. Durante a gestação, células do tipo Th2 são predominantes na interação materno-fetal, com regulação das citocinas IL-10, IL-4 e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) (INNES et al., 2002). É postulado que a imunomodulação que ocorre para a manutenção da gestação é o principal gatilho para a recrudescência com ativação dos bradizoítos, levando à parasitemia e à subsequente resposta inflamatória imunológica (normalmente do tipo Th1), gerando duas situações: morte fetal e controle da infecção na fêmea (INNES et al., 2001).

Os modelos experimentais com inoculações em diferentes fases da gestação sugerem que quanto mais inicial a gestação quando a infecção for instalada, maior será o potencial patogênico de *N. caninum* (LINDSAY et al., 1995; DUBEY, 2003). Arranz-Solis et al. (2015) estudaram a infecção em ovelhas no terço médio da gestação que culminaram com consequências mais severas do que as observadas em vacas inoculadas no mesmo período da gestação, com os casos de abortos, nascimento de crias debilitadas as baixas mensurações de IFN- γ periférico e expressão de citocinas.

Weston et al. (2009) concluíram que a implicação clínica varia com a concentração do inóculo, visto que, em ovelhas aos 90 dias de gestação observaram 100% de abortamentos quando utilizada concentrações de 10^6 taquizoítos, 50% de abortamentos com 10^5 taquizoítos e sem abortamento com 50 taquizoítos. No terço final da gestação, cabras inoculadas com 10^6 taquizoítos apresentaram resposta similar a de bovinos com baixas expressões de citocinas e menor regulação imune, associada a uma maior imunocompetência fetal no controle da infecção (PORTO et al., 2017).

Evidências apontam que vacas congenitamente infectadas apresentaram maior risco de abortamento na primeira gestação do que não infectadas de um mesmo rebanho, sugerindo que a imunocompetência do hospedeiro durante a primo-infecção afeta o tipo de resposta imune desencadeada (WESTON et al. 2005). Em cabras, a transmissão transplacentária endógena do feto é associada ao incremento dos títulos de IgG materna no segundo terço da gestação e estas fêmeas têm 10 vezes mais chances de gerar cabritos congenitamente infectados (MESQUITA et al., 2013).

Diferentes estudos de desafio em bovinos propõe a inoculação de taquizoítos em períodos que antecedem a gestação para prevenção da ocorrência de abortos e transmissão vertical (WILLIAMS et al., 2000; INNES et al., 2001). Williams et al. (2007)

descreveram que vacas inoculadas antes da monta e desafiadas nos períodos onde normalmente são observados abortos, não abortaram e não produziram bezerros congenitamente infectados em gestações subsequentes. Em ovinos, Syed-Hussain et al. (2015), utilizando modelo semelhante, descreveram que a inoculação prévia no primeiro ano não resulta em transmissão vertical, mas não induz nenhum tipo de proteção no ano subsequente, sugerindo que a transmissão vertical possa ocorrer bastando o animal estar infectado.

2.6 Soroprevalência na espécie caprina

A prevalência da neosporose é considerada variável em cada país, inclusive dentro de uma mesma região, podendo variar entre o tipo de criação bovina (corte ou leite) e até mesmo o tipo de domicílio dos caninos analisados (urbanos ou rurais) (GOODSWEN et al. 2013). Em um estudo de revisão realizado por de Dubey et al. (2007) são descritas as prevalências para caprinos e outras espécies ao redor do mundo, porém os autores relataram que os resultados descritos não devem ser comparados pelas diferenças nas técnicas sorológicas e pontos de corte adotados, embora afirmem que tais investigações servem para validar as evidências de que uma diversidade de espécies foi exposta ao *N. caninum*.

Para ilustrar os dados de prevalência de *N. caninum* na espécie caprina são apresentados na Tabela 1 os resultados de levantamentos sorológicos de diferentes estudos mundiais com suas respectivas técnicas e ponto-de-corte adotado.

Tabela 1. Prevalência de anticorpos específicos contra *Neospora caninum em caprinos*

País	Nº de animais testados	% Positivos	Técnica Sorológica	Título/Fabricante	Referência
Argentina	1594	6,6%	RIFI	1:50	MOORE et al. (2007)
	2922	5,5%	RIFI	1:100	GOS et al. (2017)
Grécia	375	0,7%	ELISA	<i>In-house</i>	ANASTASIA et al. (2013)
Filipinas	89	23,6%	ELISA	<i>In-house</i>	KONNAI et al. (2008)
Polônia	1060	0,4%	ELISA	VMRD	CZOPOWICZ et al. (2011)
Romênia	512	2,3%	ELISA	IDEXX	IOVU et a. (2012)
Eslováquia	116	15,5%	ELISA	IDVET	COBADIOVA et al. (2013)
Irã	450	6,2%	ELISA	IDVET	GHAREKHANI et al. (2016)
Jordânia					
Jordânia (Norte)	302	2,0%	ELISA	Bio-X	ABO-SHEHADA & ABU-HALAWEH (2010)
Jordânia (Sul)	300	5,7%	ELISA	IDEXX	AL-MAJALI et al. (2008)
China	207	7,7%	ELISA	IH-NcSAG1	LU et al. (2007)
	650	7,2%	ELISA	IDEXX	LIU et al. (2015)
Nova Zelândia	7086	1,9%	ELISA	Bio-X	ALTBUCH et al. (2012)
Espanha	638	6%	ELISA	VMRD	DÍAZ et al. (2016)
Ilhas Canária	552	7,0%	ELISA	IDVET	RODRÍGUEZ-PONCE et al. (2017)
Brasil					
Maranhão	46	17,39%	RIFI	1:25	MORAES et al. (2011)
Paraíba	306	3,3%	RIFI	1:50	FARIA et al. (2007)
Alagoas	235	5,95%	RIFI	1:50	RIBEIRO-ANDRADE et al. (2015)
	975	2,7%	RIFI	1:50	SANTOS et al. (2013)
Bahia	384	15,0%	RIFI	1:100	UZÊDA et al. (2007)
Pernambuco	174	2,9%	RIFI	1:50	ARRAES-SANTOS et al. (2016)
São Paulo	394	6,4%	RIFI	1:50	FIGLIUOLO et al. (2004)
	923	19,7%	NAT	1:25	MODOLO et al. (2008)
	923	17,3%	NAT	1:25	COSTA et al. (2012)
Minas Gerais	667	10,7%	RIFI	1:50	ANDRADE et al. (2013)
Santa Catarina	654	4,58%	RIFI	1:50	TOPAZIO et al. (2014)
Rio Grande do Sul	381	1,0%	RIFI	1:50	LIMA et al. (2008)

RIFI: Reação de imunofluorescência indireta; NAT: *Neospora Agglutination Test*. IH: *in-house*; VMRD: *Neospora caninum cELISA* (VMRD, Estados Unidos); IDEXX: *IDEXX HerdChek Neospora caninum antibody* (IDEXX Laboratories, Estados Unidos); Bio-X: *Indirect ELISA test Kit* (Bio-X Diagnostic, Bélgica); IDVET: *ID Screen Neospora caninum Competition* (Innovative Diagnostics, França).

Alguns fatores de risco descritos em surtos de abortamentos por *N. caninum* devem ser considerados, principalmente a forte associação entre a soroprevalência e a presença de cães com acesso direto aos bovinos (PARÉ et al., 1998; DUBEY et al., 2007), ovinos (FIGLIUOLO et al., 2004) e caprinos (ABO-SHEHADA et al., 2010). Santos et al. (2013) descreveram como fatores de risco associados à alta prevalência de infecção por *N. caninum* em caprinos: a não utilização de seringas descartáveis; tamanho do rebanho superior a 25 animais e o pastoreio em áreas comunitárias. Outros fatores de risco

incluem a presença de outras espécies de hospedeiros definitivos, imunossupressão e fatores como idade, raça, clima e local de criação do rebanho (HADDAD et al., 2005; THURMOND et al., 2005; ORTEGA-MORA et al., 2006).

2.7 Diagnóstico

Para o diagnóstico da neosporose é fundamental a obtenção do histórico clínico e dos dados epidemiológicos durante a investigação diagnóstica, sempre devendo ser acrescentadas informações que envolvam o tipo de aborto, idade e condição fetal (ORTEGA-MORA et al., 2006).

O diagnóstico do abortamento pode ser possível utilizando uma combinação de técnicas laboratoriais como a triagem sorológica da fêmea e a necropsia do feto abortado e anexos fetais, empregando técnicas de detecção direta como a análise histológica e molecular (DUBEY, 2003; McALLISTER et al., 2016).

2.7.1 Diagnóstico indireto

A ausência de sinais clínicos mais evidentes, a não ser o aborto, nas infecções por *N. caninum* em animais adultos estabelece a importância dos testes sorológicos como ferramentas fundamentais de diagnóstico *in vivo* e em líquidos torácicos fetais, indicando o grau de exposição do animal infectado ao agente (DUBEY & SCHARES, 2006). A utilização de técnicas sorológicas de avidéz tem se tornando importantes ferramentas na investigação da via de transmissão de *N. caninum* em um rebanho, fazendo a diferenciação entre infecções agudas de crônicas (BJÖRKMAN et al., 1999; AGUADO-MARTÍNEZ et al., 2008).

O desenvolvimento de qualquer técnica sorológica requer a manutenção do parasito em cultura para identificação de antígenos específicos (BJÖRKMAN & UGGLA, 1999). As técnicas sorológicas atuais se baseiam em sua maioria na utilização do estágio de taquizoíto (JENKINS et al., 2002), obtido principalmente de isolados de bovinos e caninos (ORTEGA-MORA et al., 2006). Estes taquizoítos podem ser fixados em formalina para utilização na reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (CONRAD et al., 1993), nos testes de aglutinação (NAT) (ROMAND et al., 1998) e em ELISAs indiretos (WILLIAMS et al., 1997). Além disso, os antígenos solúveis totais também são utilizados em ELISAs e técnicas de *immunoblot* (ÁLVAREZ-GARCÍA et al., 2002).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) foi o primeiro teste sorológico utilizado para neosporose (DUBEY et al., 1988) e rotineiramente empregada no

diagnóstico da doença (ATKINSON et al., 2000), sendo a técnica de referência para implementação de outros testes (NAGULESWARAN et al., 2004; SILVA et al., 2007; CAMPERO et al., 2018). Diferentes pontos de corte são recomendados baseados na espécie animal investigada: para bovinos adultos é aceito o ponto de corte para detectar a infecção a diluição de 1:200 (von BLUMRÖDER et al., 2004) e 1:16 a 1:25 para os fluídos fetais. Para ovinos e caprinos, o ponto de corte utilizado é a diluição 1:50 (ARRANZ-SOLÍS et al., 2015; PORTO et al., 2016). O desempenho da RIFI requer treinamento e experiência, uma vez que a interpretação do resultado sempre dependerá da análise subjetiva do avaliador (LARSI et al., 2004; ORTEGA-MORA et al., 2006).

Os testes de aglutinação (*Neospora Agglutination Test* - NAT) se baseiam no fato de taquizoítos de *N. caninum* se aglutinarem na presença de anticorpos IgG específicos (ROMAND et al., 1998). Os testes de aglutinação para *N. caninum* foram inicialmente desenvolvidos para utilização em bovinos (PACKHAM et al., 1998) e caninos (ROMAND et al., 1998), e posteriormente foram aplicados em uma variedade de espécies com razoável sensibilidade e especificidade (DONAHOE et al., 2015), justamente pela vantagem de não possuir a necessidade do uso de um conjugado espécie-específico (ORTEGA-MORA et al., 2006). Uma desvantagem na produção do NAT é a necessidade da utilização de um grande número de taquizoítos (BJÖRKMAN & UGGLA, 1999).

O ELISA apresenta como vantagem o registro quantitativo da reação, podendo ser facilmente automatizado, sendo uma técnica útil no processamento de um grande número de amostras (ORTEGA-MORA et al., 2007). Diferentes formatos de ELISAs foram desenvolvidos, incluindo os indiretos e de inibição-competitiva (*CI*)-ELISA baseado no percentual de inibição dos soros-testes contra o soro-controle (BASZLER et al., 1996). Em sua maioria são utilizadas preparações de antígenos solúveis de taquizoítos, podendo incluir ainda a utilização de proteínas recombinantes (ÁLVAREZ-GARCÍA et al., 2013), sendo aplicado para amostras de soro sanguíneo e leite (ORTEGA-MORA et al., 2006).

Os resultados obtidos em ELISA indiretos podem ser expressos em valores de densidade óptica (DO) (OSAWA et al., 1998), valores percentuais de positividade (WILLIAMS et al., 1999), índice relativo por cento (IRPC) (ÁLVAREZ-GARCÍA et al., 2003). ELISA indiretos foram modificados para permitir a análise da avidéz de IgG nos casos agudos ou crônicos da neosporose (AGUADO-MARTÍNEZ et al., 2005). Tais testes de avidéz se baseiam no princípio da primeira síntese de anticorpos primários que possuem baixa afinidade do que aqueles produzidos posteriormente, onde após a adição e incubação de ureia (6M a 8M), são eluídos (ORTEGA-MORA et al., 2006). Valores

pequenos de avidéz são observados em infecções recentes e valores altos são observados em infecções crônicas, sendo tais valores calculados nos títulos de IgG nas amostras testadas com e sem adição de ureia (AGUADO-MARTÍNEZ et al., 2005; FRÖSLING et al., 2005).

Ainda estão incluídos no diagnóstico da neosporose, os testes imunocromatográficos (ICT) e os *immunoblots* (IB). Liao et al. (2005) desenvolveram um ICT utilizando antígeno recombinante de superfície NcSAG1, ressaltando sua facilidade de utilização clínica e a campo, não necessitando de equipamentos ou materiais especiais para sua interpretação. Testes IB, comumente conhecidos como *Western Blot* são utilizados para identificação de antígenos de taquizoítos imunodominantes presentes em soro, leite e líquido (ÁLVAREZ-GARCÍA et al., 2002, ORTEGA-MORA et al., 2006), e amplamente utilizados para validação de resultados duvidosos, por possuírem altíssima sensibilidade quando comparados às técnicas de RIFI e ELISA (SÖNDGEN et al., 2001; ÁLVAREZ-GARCÍA et al., 2002).

Resultados dos testes sorológicos são dependentes de uma gama de fatores como a composição do antígeno, as características do conjugado e dos outros reagentes utilizados (BJÖRKMAN & UGGLA, 1999). Algumas técnicas sorológicas podem apresentar reação cruzada com parasitos apicomplexa correlatos (WAPENAAR et al., 2007) e em alguns animais, a sensibilidade da maioria das técnicas de diagnóstico sorológico pode ser comprometida por quedas nas concentrações de anticorpos específicos, ficando abaixo dos limites detectáveis (BARTELS et al., 2005). Incrementos subsequentes na concentração de anticorpos podem refletir a recrudescência do parasito, podendo ser um fator preditivo de abortos ou infecções verticais (GUY et al., 2001). Em alguns casos, resultados falso-positivos também podem ser associados em animais vacinados contra *N. caninum* (SCHETTERS et al., 2004) e ainda oriundo do processo de produção do antígeno, com utilização de soro fetal bovino contendo anticorpos contra *N. caninum* (TORRES & ORTEGA, 2006). Nos últimos anos houve notável mudança do painel de *kits* comerciais sorológicos; novos testes foram desenvolvidos, boa parte dos já existentes foram modificados e outros retirados do mercado (ÁLVAREZ-GARCÍA et al., 2013).

Estudos recentes de comparações de técnicas ELISA e RIFI demonstraram uma boa concordância na interpretação dos resultados (NAGULESWARAN et al., 2004; ÁLVAREZ-GARCÍA et al., 2013; CAMPERO et al., 2018). A padronização nos pontos de corte é recomendada, utilizando o emprego da chamada curva ROC (*Receiver*

Operating Characteristic Curve), que permite uma melhor interpretação, eliminando eventuais discordâncias entre os diferentes testes utilizados em estudos soropidemiológicos paralelos (ORTEGA-MORA et al., 2006).

2.7.2 Detecção direta do parasito

O exame do soro derivado de uma vaca com histórico de aborto é apenas indicativo da exposição ao *N. caninum* e a análise histológica do feto é necessária para o diagnóstico definitivo (DUBEY, 2003). Encéfalo, coração, fígado, placenta, derrames cavitários e sangue são as melhores amostras para diagnóstico, principalmente quando utilizados em conjunto (DUBEY & LINDSAY, 1996; COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006).

O diagnóstico histológico, utilizando apenas colorações de hematoxilina-eosina (HE) é dificultoso principalmente pela pouca frequência de lesões microscópicas e o número de parasitos ser escasso (DUBEY & LINDSAY, 1996; ANDERSON et al., 2000). As lesões mais significativas observadas são caracterizadas por encefalomielite focal não-suprativa e miocardites (CORBELLINI et al., 2001), além de necrose placentária que podem estar associadas a vários outros agentes, principalmente protozoários como *Sarcocystis* spp. e *T. gondii* (JENKINS et al., 2002; VARASCHIN et al., 2012). A técnica de imunohistoquímica (IHC) é amplamente utilizada (ORTEGA-MORA et al., 2006), fornecendo um diagnóstico etiológico em abortos associados a *N. caninum*, demonstrando a presença do agente em áreas do tecido fetal contendo lesões características por protozoários (WOUDA & BUXTON, 2007).

As técnicas de detecção molecular, principalmente baseadas em PCR, são ferramentas úteis na detecção de DNA do parasito, principalmente quando utilizadas para a análise de abortos (PEREIRA-BUENO et al., 2003). A PCR geralmente possui maior sensibilidade do que os métodos de IHC, sendo inclusive mais específicas (van MAANEN et al., 2004). A eficiência da PCR depende dos procedimentos adotados no laboratório, do estágio de autólise do tecido e ainda do tipo de metodologia utilizada durante coleta (DUBEY, 2003). Diferentes metodologias da PCR surgiram nos últimos anos, podendo se basear na região ITS1 de *N. caninum* (HOLMDAHL & MATTSON, 1996) e na sequência repetida Nc-5 (*Neospora-specific*) (MULLER et al., 1996) empregando, ainda, modificações como reações *Nested* ou *semi-nested* para incremento da sensibilidade e especificidade da análise (BUXTON et al., 1998). Além disso, o desenvolvimento da PCR quantitativa (*qPCR*) permitiu não só a detecção, mas também a

quantificação da carga parasitária em diferentes tecidos de animais infectados (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2002; CONRATHS & SCHARES, 2006).

O isolamento de *N. caninum* viável por meio do bioensaio em camundongos *knock-out*, gerbis e ratos do deserto, ou ainda em cultivo celular é dificultoso, sendo observados maiores chances de sucesso quando utilizado cistos teciduais pela sua maior resistência à autólise ((DUBEY & SCHARES, 2006). Em estudo recente, Costa et al. (2018) demonstraram pela primeira vez que isolados de *N. caninum* de caprinos naturalmente infectados podem infectar gerbils imunocompetentes e causar severas lesões histológicas quando inoculados em gerbils imunossuprimidos. A utilização do isolamento para obtenção de isolados normalmente é empregado em estudos baseados em epidemiologia molecular, para conhecimento de patogenicidade e ainda para desenvolvimento de vacinas (ORTEGA-MORA et a., 2006).

2.8 Controle e Profilaxia

A ocorrência de um ciclo de vida doméstico e silvestre do parasito, levam a dificuldades maiores para a implementação de medidas de controle, principalmente quando existem interações entre animais de produção e selvagens (GONDIM et al., 2004a; ROSYPAL & LINDSAY, 2005).

A longo prazo, a chave para evitar altas prevalências da infecção, ou ainda reduzir as taxas já existentes, está na proteção dos alimentos fornecidos aos animais, devido a contaminação por fezes dos hospedeiros definitivos, dando atenção similar a fonte de água (McALLISTER, 2016). A presença de outros hospedeiros intermediários positivos como roedores, galinhas e pombos (HUANG et al., 2004; HUGHES et al., 2006; COSTA et al., 2008) são potenciais fontes de infecção para os caninos e devem ser controlados (DUBEY & SCHARES, 2011).

Medidas de biossegurança, baseadas no processo de quarentena com triagem dos animais recém adquiridos e ainda, eliminação dos animais positivos no rebanho são recomendadas por vários autores para redução da prevalência em fazendas com confirmação da transmissão transplacentária endógena (HADDAD et al., 2005; DUBEY et al., 2007; ALTBUCH et al., 2012). Fatores estressantes, biológicos ou com práticas errôneas de manejo podem permitir a conversão de bradizoítos de *N. caninum* em taquizoítos (INNES et al., 2002), e também são mencionados no aumento do risco de abortos em animais infectados pelo protozoário (WILLIAMSON et al., 2000; HÄSSIG & GOTTSSTEIN,

2002), devendo ser evitados para não ocorrência de quadros de recrudescências (BJÖRKMAN et al., 2000).

A busca por estratégias vacinais tem sido um dos maiores desafios para as companhias de saúde (REICHEL & ELLIS, 2009). A vacina comercial inativada NeoGuard® foi a única a apresentar moderado sucesso nos testes de campo (ROMERO et al., 2004; WESTON et al., 2012), porém foi retirada do mercado. Vacinas vivas, baseadas na utilização de isolados avirulentos de *N. caninum* oriundos de animais naturalmente infectados se mostraram promissoras (WILLIAMS et al., 2007; ROJO-MONTEJO et al., 2009), principalmente pelo princípio da vacina ideal inibir a infecção e não causar doença clínica, além de impedir qualquer resposta mediada por células a ponto de causar patologias fetais (GOODSWEN et al., 2013).

A nova geração de vacinas baseadas em proteínas recombinantes, de DNA ou utilizando vetores são atualmente o principal alvo de pesquisa (MARUGAN-HERNANDEZ, 2017). Proteínas presentes no granuloma denso como a NcGRA7 apresentam grande potencial imunogênico e são capazes de conferir proteção em infecções por *N. caninum* em camundongos (LIDELL et al., 2003; JENKINS et al., 2004) e bovinos (NISHIMURA et al., 2013). Hecker et al. (2014) demonstraram que as proteínas recombinantes rNcSAG1, rNcHSP20 e rNcGRA7, mesmo imunogênicas para bovinos falharam na prevenção da infecção fetal em desafios utilizando animais com idade gestacional a partir de 70 dias.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

✓ Estudar a dinâmica da neosporose na cabra gestante, utilizando um modelo de recrudescência e contribuir com o diagnóstico sorológico nesta espécie.

3.2. Específicos

✓ Avaliar os sinais clínicos, ocorrência de aborto, nascimento de cabritos clinicamente afetados ou saudáveis;

✓ Avaliar a patogenia da doença por análises do grau de lesão placentária, grau de lesão no encéfalo das cabras inoculadas e nos diferentes órgãos de suas crias (sistema nervoso central, coração, fígado, pulmão e músculo esquelético);

✓ Avaliar a resposta imune humoral nos animais inoculados ao longo da gestação e dos neonatos, determinando a produção de IgG específica contra *Neospora caninum* por meio de técnica sorológica;

✓ Detectar a presença do parasito e a carga parasitária nos diferentes tecidos por meio de técnicas moleculares;

✓ Estudar a soroprevalência de caprinos naturalmente infectados mediante o estudo da concordância entre três técnicas sorológicas utilizadas para detectar anticorpos IgG específicos contra *N. caninum*.

4. REFERÊNCIAS

ABO-SHEHADA, M. N; ABU-HALAWEH, M. M. (2010) Flock-level seroprevalence of, and risk factors for, *Neospora caninum* among sheep and goats in northern Jordan. *Prev Vet Med*, 93:25-32.

AGUADO-MARTÍNEZ, A.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; ARNAIZ-SECO, I.; INNES, E.; ORTEGA-MORA, L. M. (2005) Use of avidity enzyme-linked immunosorbent assay and avidity western blot to discriminate between acute and chronic *Neospora caninum* infection in cattle. *J Vet Diagn Invest*, 17:442-450.

AL-MAJALI, A. M.; JAWASREH, K. I.; TALAFHA, H. A.; TALAFHA, A. Q. (2008) Neosporosis in sheep and different breeds of goats from southern Jordan: prevalence and risk factors analysis. *Am J Anim Vet Sci*, 3:47-52.

AL-QASSAB, S.; REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. (2010) On The Biological and Genetic Diversity in *Neospora caninum*. *Diversity*, 2:411-438.

ALTBUCH, J. A.; SCHOFIELD, M. J.; PORTER, C. A.; GAVIN, W. G. (2012) *Neospora caninum*: A successful testing and eradication program in a dairy goat herd. *Small Rumin Res*, 105:341-344.

ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; COSTAS, E.; REBORDOSA, X.; ORTEGA-MORA, L. M. (2003) Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. *Vet Res*, 34:341-352.

ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; GARCÍA-CULEBRAS, A.; GUTIÉRREZ-EXPÓSITO, D.; NAVARRO-LOZANO, V.; PASTOR-FERNÁNDEZ, I.; ORTEGA-MORA, L. M. (2013) Serological diagnosis of bovine neosporosis: A comparative study of commercially available ELISA tests. *Vet Parasitol*, 198:85-95.

ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; PEREIRA-BUENO, J.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.; ORTEGA-MORA, L. M. (2002) Pattern of recognition of *Neospora caninum* tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted foetuses. *Vet Parasitol*, 107:15-27.

ANASTASIA, D.; ELIAS, P.; NIKOLAOS, P.; CHARILAOS, K.; NEKTARIOS, G. (2013) *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* seroprevalence in dairy sheep and goats mixed stock farming. *Vet Parasitol*, 198:387-390.

ANDERSON, M. L.; PLAMER, C. W.; THURMOND, M. C.; PICANSO, J. P.; BLANCHARD, P. C.; BREITMEYER, R. E.; LAYTON, A. W.; McALLISTER, M.; DAFT, B.; KINDE, H.; READ, D. H.; DUBEY, J. P.; CONRAD, P. A.; BARR, B. C. (1997) Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *J Am Vet Med Assoc*, 207(9):1206-1210.

ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P. A. (2000) Neosporosis in cattle. *Anim Reprod Sci*, 60(61):417-431.

ANDRADE, G. S.; BRUHN, F. R. P.; ROCHA, M. B. M.; GUIMARÃES, A. S.; GOUVEIA, A. M. G.; GUIMARÃES, A. M. (2013) Seroprevalence for *Neospora caninum* in goats of Minas Gerais state, Brazil. *Res Vet Sci*, 94:584-586.

ANDRIANARIVO, A. G.; BARR, B. C.; ANDERSON, M. L.; ROWE, J. D.; PACKHAM, A. E.; SVERLOW, K. W.; CONRAD, P. A. (2001) Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. *Parasitol Res*, 87:817-825.

ARRAES-SANTOS, A. I.; ARAÚJO, A. C.; GUIMARÃES, M. F.; SANTOS, J. R.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; AZEVEDO, S. S.; LABRUNA, M. B.; HORTA, M. C. (2016) Seroprevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in domestic mammals from two distinct regions in the semi-arid region of Northeastern Brazil. *Vet Parasitol*, 5:14-18.

ARRANZ-SOLÍS- D.; BENAVIDES, J.; REGIDOR-CERRILLO, J.; FUERTES, M.; FERRE, I.; FERRERAS, M. C.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; HEMPHILL, A.; PÉREZ, V.; ORTEGA-MORA, L. M. (2015) Influence of the gestational stage on the clinical course, lesional development and parasite distribution in experimental ovine neosporosis. *Vet Res*, 46:19. DOI: 10.1186/s13567-014-0139-y

ATKINSON, R.; HARPER, P. A. W.; REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. (2000) Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. *Parasitol Today* 16:110-114.

ATKINSON, T. J.; HAUBOLD, J. T.; WILLIAMS, J. G. (1999) Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology*, 118:363-370.

AZEVEDO-FILHO, P. C.; OLIVEIRA, J. M. B.; ANDRADE, M. R.; SILVA, J. G.; KIM, P. C. P.; ALMEIDA, J. C.; PORTO, J. W. N.; MOTA, R. A. (2017) Incidence and vertical

transmission rate of *Neospora caninum* in sheep. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 52:19-22.

BARR, B. C.; ANDERSON, M. L.; WOODS, L. W.; DUBEY, J. P.; CONRAD, P. A. (1992) Neospora-like protozoal infections associated with abortion in goats. *J. Vet. Diagn Invest*, 4:365-367.

BARTELS, C. J. M.; van MAANEN, C.; van der MEULEN, A. M.; DIJKSTRA, T.; WOUDA, W. (2005) Evaluation of three enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Neospora caninum* in bulk milk. *Vet Parasitol*, 131:235-246.

BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M.C.; HILL, D. E.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; DUBEY, J.P. (2001) First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *J Parasitol*, 87:612-618.

BASZLER, T. V.; KNOWLES, D. P.; DUBEY, J. P.; GAY, J. M.; MATHISON, B. A.; MCELWAIN, T. F. (1996) Serological diagnosis of bovine neosporosis by *Neosporacanium* monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*, 34:1423-1428.

BERGERON, N.; GIRARD, C. PARE, J.; FECTEAU, G.; ROBINSON, J.; BAILLARGEON, P. (2001) Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from seropositive dams giving birth full-term calves. *J Vet Diagn Invest*, 13:173-175.

BISHOP, S.; KING, J.; WINDSOR, P.; REICHEL, M. P. ELLIS, J.; SLAPETA, J. (2010) The first report of ovine cerebral neosporosis and evaluation of *Neospora caninum* prevalence in sheep in New South Wales. *Vet Parasitol*, 170:137-142.

BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. (1984) Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs, *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 70:271-274.

BJÖRKMAN, C.; ALENIUS, S.; EMANUELSSON, U.; UGGLA, A. (2000) *Neospora caninum* and bovine virus diarrhea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. *Vet J*, 159:201-206.

BJÖRKMAN, C.; JOHANSSON, O.; STENLUND, S.; JOAKIM, O.; UGGLA, A. (1996) *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc*, 208:1441-1444.

BJÖRKMAN, C.; NASLUND, K.; STENLUND, S.; MALEY, S. W.; BUXTON, D.; UGGLA, A. (1999) An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. *J Vet Diag Investig*, 11:41-44.

BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. (1999) Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int J Parasitol*, 29:1497-1507.

BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) (2007) BGCON - Banco de Germoplasma de Caprinos e Ovinos Naturalizados: uma Alternativa para Inventariar a Infraestrutura dos Recursos Genéticos Existentes. Comunicado técnico 85, Sobral-CE.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2012) Produção Pecuária Municipal em 2010. Disponível em:
<<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=pe&tema=pecuaria2010>> Acesso em: 25/01/2018.

BUXTON, D.; McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. (2002) The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends in Parasitol*, 18(12):546-552.

BUXTON, D.; MALEY, S. W.; THOMSON, K. M.; TREES, A. J.; INNES, E. A. (1997) Experimental infection of non-pregnant and pregnant sheep with *Neospora caninum*. *J Comp Pathol*, 117:1-16.

BUXTON, D.; MALEY, S. W.; WRIGHT, S.; THOMSON, K. M.; RAE, A. G.; INNES, E. A. (1998) The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *J Comp Pathol*, 118:267-279.

BUXTON, D.; RIGHT, S. W.; MALEY, S. W.; RAE, A. G.; LUNDÉN, A.; INNES, E. A. (2001) Immunity to experimental neosporosis in pregnant sheep. *Parasite Immunol*, 23:85-91.

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

CAMPERO, L. M.; MORENO-GONZALO, J.; VENTURINI, M. C.; MORÉ, G.; DELLARUPE, A.; RAMBEAUD, M.; ECHAIDE, I. E.; VALENTINI, B.; MOTA- R. A.; SERRANO-MARTÍNEZ, M. E.; CRUZ-VÁZQUEZ, C.; ORTEGA-MORA, L. M.;

ÁLVAREZ-GARCÍA, G. (2018) An Ibero-American inter-laboratory trial to evaluate serological tests for the detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle. Trop Anim Health Prod, 50:75-84.

CAÑÓN-FRANCO, W. A.; BERGAMASCHI, D. P.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; SOUZA, S. L. P.; SILVA, J. C. R.; PINTER, A.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S.M. (2003) Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brasil. *Veterinary Parasitology*, 115:71-74, DOI: 10.1016/S0304-4017(03)00131-6

COBADIOVA, A.; REITEROVÁ, K.; DERDÁKOVA, M.; SPILOVSKA, S.; TURCEKOVA, L.; HVISCOVÁ, I.; HISIRA, V. (2013) *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and tick-transmitted bacterium *Anaplasma phagocytophilum* infections in one selected goat farm in Slovakia. *Acta Parasitol*, 58(4):541-546.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; RODRÍGUEZ-BERTOS, A.; ARNAIZ-SECO, I.; MORENO, B.; ADURIZ, G.; ORTEGA-MORA, L. M. (2006) Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine foetuses. *Theriogenology*, 65:629-641.

COLLANTES-FERNANDÉZ, E.; ZABALLOS, A.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; ORTEGA-MORA, L. M. (2002) Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 40:1194-1198.

CONRAD, P. A.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M.; ROWE, J.; BONDURANT, R.; TUTER, G.; BREITMEYER, R.; PALMER, C.; THURMOND, M.; ARDANS, A.; DUBEY, J. P.; DUHAMEL, G.; BARR, B. (1993) Detection of sérum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *J Vet Diag Invest*, 5:572-578.

CONRATHS, F. J.; SCHARES, G. (2006) Validation of molecular-diagnostic techniques in the parasitological laboratory. *Vet Parasitol*, 136:91-98.

CORBELLINI, L. G.; COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D. (2001) Granulomatous encephalitis in a neurologically impaired goat kid associated with degeneration of *Neospora caninum* tissue cysts. *J Vet Diagn Invest*, 13:416-419.

COSTA, K. S.; SANTOS, S. L.; UZÊDA, R. S.; PINHEIRO, A. M.; ALMEIDA, M. A. O.; ARAÚJO, F. R.; McALLISTER, M. M.; GONDIM, L. F. P. (2008) Chickens (*Gallus*

domesticus) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. Int J Parasitol, 38:157-159.

COSTA, H. F.; STACCHISSINI, A. V. M.; LANGONI, H.; PADOVANI, C. R.; GENNARI, S. M.; MODOLO, J. R. (2012) Reproductive failures associated with antibodies against caprine arthritis-encephalitis virus, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in goats in the state of São Paulo, Brazil. Braz J Vet Anim Sci, 49(1):67-72.

COSTA, R. C.; ORLANDO, D. R.; ABREU, C. C.; NAKAGAKI, K. Y.; MESQUITA, L. P.; NASCIMENTO, L. C.; SILVA, A. C.; MAIORKA, P. C.; PECONICK, A. P.; RAYMUNDO, D. L.; VARASCHIN, M. S. (2014) 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 Vet Res 10: 291.

COSTA, R. C.; MESQUITA, L. P.; NUNES, M. V. L.; OLIVEIRA, I. M.; OLIVEIRA, L. F. S.; SOUZA, A. R.; MAIORKA, P. C.; VARASCHIN, M. S. (2018) *Neospora caninum* bioassay in gerbils using placental tissues from naturally infected goats. Vet Parasitol, 249:70-73.

CZOPOWICZ, M.; KABA, J.; SZALUS-JORDANOW, O.; NOWICKI, M.; WITKOWSKI, L.; FRYMUS, T. (2011) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in goats in Poland. Vet Parasitol, 178:339-341.

DARCAN, N. K.; SILANIKOVE, N. (2017) The advantages of goats for future adaptation to Climate Change: A conceptual overview. Small Rumin Res, DOI: 10.1016/j.smallrumres.2017.04.013

DAVISON, H. C.; OTTER, A.; TRESS, A. J. (1999) Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. Int J Parasitol, 29:1683-1689.

DAVISON, H. C.; GUY, C. S.; McGARRY, J. W.; WILLIAMS, D. J. L.; KELLY, D. F.; TRESS, A. J. (2001) Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. Res Vet Sci, 70:163-168.

DEVENDRA, C. (2010) Concluding synthesis and the future for sustainable goat production. Small Rumin Res, 89:125-130.

- DÍAZ, P.; CABANELAS, E.; DÍAZ, J. M.; VIÑA, M.; BÉJAR, J. P.; PÉREZ-CREO, A.; PRIETO, A.; LÓPEZ, C. M.; PANADERO, R.; FERNÁNDEZ, G.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONGO, P. (2016) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in goats from north-western Spain. *Ann Agric Environ Med*, 23(4):587-590.
- DIJKSTRA, T.; EYSKER, M.; SCHARES, G.; CONRATHS, F. J.; WOUDA, W.; BARKEMA, H. W. (2001) Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrums spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int J Parasitol*, 31:747-752.
- DONAHOE, S. L.; LINDSAY, S. A.; KROCKENBERGER, M.; PHALEN, D.; SLAPETA, J. (2015) A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. *Int J Parasitol*, 4:216-238.
- DUBEUF, J. P.; MORAND-FEHR, P.; RUBINO, R. (2004) Situation, changes and future of goat industry around the world. *Small Rumin Res*, 51:165-173.
- DUBEY, J. P. (2003) Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J Parasitology*, 41(1):1-16.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G. (2006) Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet Parasitol*, 140:1-34.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G. (2011) Neosporosis in animals – The last five years. *Vet Parasitol*, 180:90-108.
- DUBEY, J. P.; KNICKMAN, E.; GREENE, C. E. (2005) Neonatal *Neospora caninum* infections in dogs. *Acta Parasitol*, 50:176-179.
- DUBEY, J. P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. (2006) Pathogenesis of Bovine Neosporosis. *J Comp Path*, 134:267-289.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. (2007) Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Vet*, 20(2):323-367.
- DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. (1988) Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Assoc*, 192:1259-1263.
- DUBEY, J. P.; HARTLEY, W. J.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. (1990) Fatal congenital *Neospora caninum* infection in a lamb. *J Parasitol*, 76:127-130.

DUBEY, J. P.; MORALES, J. A.; VILLALOBOS, P.; LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; TOPPER, M. J. (1996) Neosporosis-associated abortion in a dairy goat. *J Am Vet Med Assoc*, 208:263-265.

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

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

DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; FERREIRA, L. R.; CHOUDHARY, S.; VERMA, S. K.; KWOK, O. C. H.; FETTERER, R.; BUTLER, E.; CARSTENSEN, M. (2014) Isolation of viable *Neospora caninum* from brains of wild gray wolver (*Canis lupus*). *Vet Parasitol*, 201:150-153.

DUBEY, J. P.; HEMPHILL, A.; CALERO-BERNAL, R.; SCHARES, G. (2017) Neosporosis in Animals. CRC. 1ªed. Cap. 2. Disponível em: < <https://goo.gl/qCkErM> > Acesso em 02/01/2018.

ELENI, C.; CROTTI, S.; MANUALI, E.; COSTARELLI, S.; FILIPPINI, G.; MOSCATI, L.; MAGNINO, S. (2004) Detection of *Neospora caninum* in an aborted goat foetus. *Vet Parasitol*, 2(123):271-274.

ELLIS, J.; SINCLAIR, D.; MORRISON, D.; AL-QASSAB, S.; SPRINGETT, K.; IVENS, A. (2010). Microarray analyses of mouse responses to infection by *Neospora caninum* identifies disease associated cellular pathways in the host response. *Mol Biochem Parasit*, 174:117-127.

FARIA, E. B.; GENNARI, S. M.; PENA, H. F. J.; ATHAYDE, A. C. R.; SILVA, M. L. C. R.; AZEVEDO, S. S. (2007) Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti- *Neospora caninum* antibodies in goats slaughtered in the public slaughterhouse of Patos city, Paraíba State Northeast region of Brazil. *Vet Parasitol*, 149:126-129.

- FERRE, I.; ADURIZ, G.; del-POZO, I.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ATXAERANDIO, R.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; HURTADO, A.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L. M. (2005) Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. *Theriogenology*, 63:1504-1518.
- FERRE, I.; SERRANO-MARTÍNEZ, E.; MARTÍNEZ, A.; OSORO, K.; MATEOS-SANZ, A.; del-POZO, I.; ADURIZ, G.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C. O.; ORTEGA-MORA, L. M. (2008) Effects of re-infection with *Neospora caninum* in bulls on parasite detection in semen and blood and immunological responses. *Theriogenology*, 69:905-911.
- FIGLIUOLO, L. P. C.; RODRIGYES, A. A. R.; VIANA, R. B.; AGUIAR, D. M.; KASAI, N.; GENNARI, S. M. (2004) Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goat from São Paulo State, Brazil. *Small Rumin Res*, 55:29-32.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (2009) POLLOTT, G.; WILSON, R. T. Sheep and goats for diverse products and profits. Disponível: <<http://www.fao.org/3/a-i0524e.pdf>> Acesso: 25/01/2018.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (2014) Sustainable goat breeding and goat farming in central and eastern European countries. European Regional Conference on Goats. Disponível: <<http://www.fao.org/3/a-i5437e.pdf>> Acesso: 25/01/2018.
- FRENCH, N. P.; CLANCY, D.; DAVISON, H. C.; TRESS, A. J. (1999) Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. *Int J Parasitol*, 29:1691-1704.
- FRÖSSLING, J.; UGGLA, A.; BJÖRKMAN, C. (2005) Prevalence and transmission of *Neospora caninum* within infected Swedish dairy herds. *Vet Parasitol*, 128:209-218.
- FTHENAKIS, G. C.; PAPADOPOULOS, E. (2017) Impact of parasitism in goat production. *Small Rumin Res*, DOI: 10.1016/j.smallrumres.2017.04.001
- GHAREKHANI, J.; ESMAEILNEJAD, B.; REZAEI, H.; YAKHCHALI, M.; HEIDARI, H.; AZHARI, M. (2016) Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in Iranian goats. *Ann Parasitol*, 62(2):111-114.

- GIVENS, M. D.; MARLEY, M. S. D. (2008) Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology*, 70:270-285.
- GONDIM, L. F. P.; McALLISTER, M. M.; PITT, W. C. and ZEMLICKA, D. E. (2004a) Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *J. Parasitol*, 34:159-161.
- GONDIM, L. F. P.; McALLISTER, M. M.; ANDERSON-SPRECHER, R. C.; BJÖRKMAN, C.; LOCK, T. F. FIRKINS, L. D.; GAO, L. FISCHER, W. R. (2004b) Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. *J Parasitol*, 90:1394-1400.
- GONDIM, L. S. Q.; ABE-SANDES, K; UZÊDA, R. S.; SILVA, M. S. A.; SANTOS, S. L.; MOTA, R. A.; VILELA, S. M. O.; GONDIM, F. F. P. (2010) *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. *Vet Parasitol*, 168:121-124.
- GONZÁLEZ-WARLETA M.; CASTRO-HERMIDA J. A.; REGIDOR-CERRILLO J.; BENAVIDES J.; ÁLVAREZ-GARCÍA G.; FUERTES M.; ORTEGA-MORA L. M.; MEZO, M. (2014) *Neospora caninum* infection as a cause of reproductive failure in a sheep flock. *Vet Res*, 45:88.
- GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. (2013) A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the presente. *Infect Genet Evol*, 13:133-150.
- GOS, M. L.; MANAZZA, J. A.; SPÄTH, E. A. J.; PARDINI, L.; FIORENTINO, M. A.; UNZAGA, J. M.; MORÉ, G.; VENTURINI, M. C. (2017) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in goats from two Argentinean provinces. *Open Vet J*, 7(4):319-322.
- GUY, C. S.; WILLIAMS, D. J. L.; KELLY, D. F.; McGARRY, J. W.; GUY, F.; BKORKMAN, C.; SMITH, R. F.; TREES, A. J. (2001) *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *Vet Rec*, 149:443-449.
- HADDAD, J. P. A.; DOHOO, I. R.; VANLEEWEN, J. A. (2005) A Review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle – A canadian perspective. *Can Vet J*, 46:230-243.

- HAENLEIN, G. F. W. (2007) About the evolution of goat and sheep milk production. *Small Rumin Res*, 68:3-6.
- HÄSSIG, M.; GOTTSTEIN, R. (2002) Epidemiological investigations of abortions due to *Neospora caninum* on Swiss dairy farms. *Vet Rec*, 150:538-542.
- HÄSSIG, M.; SAGER, H.; REITT, K.; ZEIGLER, D.; STRABEL, D.; GOTTSTEIN, B. (2003) *Neospora caninum* in sheep: a herd case report. *Vet Parasitol*, 117:213-220.
- HATZIMINAOGLU, Y.; BOYAZOGLU, J. (2004) The goat in ancient civilizations: from the Fertile Crescent to the Aegean Sea. *Small Rumin Res*, 51:123-129.
- HECKER, Y. P.; CÓCERES, V.; WILKOWSKY, S. E.; ORTIZ, J. M. J.; MORELL, E. L.; VERNA, A. E.; GANIZA, A.; CANO, D. B.; LISCHINSKY, L.; VERNA, S. O.; ZAMORANO, P.; ODEÓN, A. C.; LEUNDA, M. R.; CAMPERO, C. M.; MOREIN, B.; MOORE, D. P. (2014) A *Neospora caninum* vaccine using recombinant protein fails to prevent foetal infection in pregnant cattle after experimental intravenous challenge. *Vet Immunol Immunopath*, 162:142-153.
- HEMPHILL, A. (1999) The host-parasite relationship in neosporosis. *Adv Parasitol*, 43:47-104.
- HEMPHILL, A.; VONLAUFEN, N.; NAGULESWARAN, A. (2006) Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. *Parasitology*, 133:261-278.
- HOLMDAHL, O. J. M.; MATTSON, J. G. (1996) Rapide and sensitive identification of *Neospora caninum* by in vitro amplification of the internal transcribed spacer 1. *Parasitology*, 112:177-182.
- HORCAJO, P.; REGIDOR-CERRILLO, J.; AGUADO-MARTINEZ, A.; HEMPHILL, A.; ORTEGA-MORA, L. M. (2016) Vaccines for bovine neosporosis: current status and key aspects for development. *Parasite Immunol*, 38:709-723.
- HOSTE, H.; SOTIRAKI, S.; LANDAU, S. Y.; JACKSON, F.; BEVERIDGE, I. (2010) Goat-nematode interactions: think differently. *Trends Parasitol*, 26:376-381.
- HOWE, L.; WEST, D. M.; COLLET, M. G.; TATTERSFIELD, G.; PATTISON, R. S. POMROY, W. E.; KENYON, P. R.; MORRIS, S. T. WILLIAMSON, N. B. (2008) The role of *Neospora caninum* in three cases of unexplained ewe abortions in the southern North Island of New Zealand. *Small Rumin Res*, 75:115-122.

- HUANG, C. C.; YANG, C. H.; WATANABE, Y.; LIAO, Y. K. OOI, H. K. (2004) Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). *Vet Res*, 35:283-290.
- HUGHES, J. M.; WILLIAMS, R. H.; MORLEY, E. K.; COOK, D. A. N.; TERRY, R. S.; MURPHY, R. G.; SMITH, J. E.; HIDE, G. (2006) The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. *Parasitology*, 132:29-36.
- INNES, E. I.; WRIGHT, S. E.; MALEY, S.; RAE, A.; SCHOCK, A.; KIRVAR, E.; BARTLEY, P.; HAMILTON, C.; CAREY, I. M. and BUXTON, D. (2001) Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int J Parasitol*, 31:1523-1534.
- INNES, E. A.; ANDRIANARIVO, A. G.; BJÖRKMAN, C.; WILLIAMS, D. J. L.; CONRAD, P. A. (2002) Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination, *Trends Parasitol*, 18(11):497-504.
- INNES, E. A.; WRIGHT, S.; BARTLEY, P.; MALEY, S.; MACALDOWIE, C.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D. (2005) The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet Immunol Immunopathol*, 108:29-36.
- IOVU, A.; GYÖRDE, A.; MIRCEAN, V.; GAVREA, R.; COZMA, V. (2012) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in dairy goats from Romania. *Vet Parasitol*, 186:470-476.
- JENKINS, M.; BASZLER, T.; BJÖRKMAN, C.; SCHARES, G.; WILLIAMS, D. (2002) Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Int J Parasitol*, 32:631-636.
- JENKINS, M.; PARKER, C.; TUO, W.; VINYARD, B.; DUBEY, J.P. (2004) Inclusion of CpG adjuvant with plasmid DNA coding for NcGRA7 improves protection against congenital neosporosis. *Infect Immun*, 72:1817-1819.
- JOLLEY, W. R.; McALLISTER, M. M.; McGUIRE, A. M.; WILLS, R. A. (1999) Repetitive abortion in *Neospora*-infected ewes. *Vet Parasitol*, 82:251-257.
- KING, J. S.; SLAPETA, J.; JENKINS, D. J.; AL-QASSAB, S. E.; ELLIS, J. T.; WINDOSOR, P. A. (2010) Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol*, 40:945-950.

- KIRKBRIDE, C. A. (1993) Diagnoses in 1784 ovine abortions and stillbirths. *J Vet Diagn Invest*, 5:398-402.
- KOBAYASHI, Y.; YAMADA, M.; OMATA, Y.; KOYAMA, T.; SAITO, A.; MATSUDA, T.; OKUYAMA, K.; FUJIMOTO, S.; FURUOKA, H.; MATSUI, T. (2001) Naturally occurring *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses. *J Parasitol*, 87:434-436.
- KONNAI, S.; MINGALA, C. N.; SATO, M.; ABES, N. S.; VENTURINA, F. A.; GUTIERREZ, C. A.; SANO, T.; OMATA, Y.; CRUZ, L. C.; ONUMA, M.; OHASHI, K. (2008) A survey of abortifacient infectious agents in livestock in Luzon, the Philippines, with emphasis on the situation in a cattle herd with abortion problems. *Acta Trop*, 105:269-273.
- LARSI, S.; de MEERSCHMAN, F.; RETTIGNER, C.; FOCANT, C.; LOSSON, B. (2004) Comparison of three techniques for the serological diagnosis of *Neospora caninum* in the dog and their use for epidemiological studies. *Vet Parasitol*, 123:25-32.
- LIAO, M.; ZHANG, S. F.; XUAN, X. N.; ZHANG, G. H.; HUANG, X. H.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K. (2005) Development of rapid immunochromatographic test with recombinant NcSAG1 for detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol*, 12:885-887.
- LIDDELL, S.; PARKER, C.; VINYARD, B.; JENKINS, M.; DUBEY, J.P. (2003) Immunization of mice with plasmid DNA coding for NcGRA7 or NcsHSP33 confers partial protection against vertical transmission of *Neospora caninum*. *J Parasitol*, 89:496-500.
- LIMA, J. T. R.; AHID, S. M. M.; BARRETO, R. A.; PENA, H. F. J.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M. (2008) Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* em rebanhos caprinos do município de Mossoro, Rio Grande do Norte. *Braz J Vet Res Anim Sci*, 45:81-86.
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. (1999) Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet Parasitol*, 82:327-333.
- LINDSAY, D. S.; RIPPEY, N. S.; POWE, T. A.; SARTIN, E. A.; DUBEY, J. P.; BLAGBURN, B. L. (1995) Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. *Am J Vet Res* 56(9):1176-1180.

- LIU, J.; YU, J.; WANG, M.; LIU, Q.; ZHANG, W.; DENG, C.; DING, J. (2007) Serodiagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle using a recombinant tNcSRS2 protein-based ELISA. *Vet Parasitol*, 143:358-363.
- LIU, Z.; LI, J.; PAN, H. (2015) Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in small ruminants in China. *Prev Vet Med*, 118:488-492.
- LÓPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; ALMERÍA, S. (2005) *Neospora caninum* infection does not affect the fertility of dairy cows in herds with high incidence of *Neospora* associated abortions, *J Med Vet*, B(52):51-53.
- MACÊDO, J. T. S. A.; RIET-CORREA, F.; DANTAS, A. F. M.; SIMÕES, S. V. D. (2008) Doenças da pele em caprinos e ovinos no semi-árido brasileiro. *Pesq Vet Bras*, 28(12):633-642.
- MALEY, S. W.; BUXTON, D.; ERA, D. G.; WRIGHT, S. E.; SCHOCK, A.; BARTLEY, P. M.; ESTEBAN-REDONDO, I.; SWALES, C.; HAMILTON, C. M.; SALES, J.; INNES, E. A. (2003) The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation. *J Comp Pathol*, 129:186-195.
- MARUGAN-HERNANDEZ, V. (2017) *Neospora caninum* and Bovine Neosporosis: Current Vaccine Research. *J Comp Path*, 157:193-200.
- MASALA, G.; PORCU, R.; DAGA, C.; DENTI, S.; CANU, G.; PATTA, C.; TOLA, S. (2007) Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. *J Vet Diagn Invest* 19:96-98.
- MATTOS, B. C.; PATRÍCIO, L. L. F.; PLUGGE, N. F.; LANGE, R. R.; RICHARTZ, R. R. T. B.; DITTRICH, R. L. (2008) Seroprevalence of antibodies anti-*Neospora caninum* and anti-*Toxoplasma gondii* in captive wild canids. *Rev Bras de Parasitol Vet*, (17):267-272.
- McALLISTER, M. (2016) Diagnosis and controlo f bovine neosporosis. *Vet Clin Food Anim*, 32:443-463.
- 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.

- McALLISTER, M. M.; MCGUIRE, A. M.; JOLLEY, W. R.; LINDSAY, D. S.; TREES, A. J.; STOBART, R. H. (1996) Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. *Vet Pathol*, 33:647-655.
- MESQUITA, L. P.; NOGUEIRA, C. I.; COSTA, R. C.; ORLANDO, D. R.; BRUHN, F. R. P.; LOPES, P. F. R.; NAKAGAKI, K. Y. R.; PECONICK, A. P.; SEIXAS, J. N.; BEZERRA JÚNIOR, P. S.; RAYMUNDO, D. L.; VARASCHIN, M. S. (2013) Antibody kinetics in goats and conceptuses naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet Parasitol*, 196:327-333.
- MILLER, C.M.; BOULTER, N. R.; IKIN, R. J.; SMITH, N. C. (2009) The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, 39:23–39.
- MODOLO, J. R.; STACISSINI, A. V. M.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; LANGONI, H.; PADOVANI, C. R.; BARROZO, L. V.; LEITE, B. L. S. (2008) Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. *Pesq Vet Bras*, 28:597-600.
- MOELLER, Jr. R. B. (2001) Causes of caprine abortion: diagnostic assessment of 211 cases (1991-1998). *J Vet Diagn Invest*, 13:265-270.
- MOORE, D. P. (2005) Neosporosis in South America. *Vet Parasitol*, 127:87-97.
- MOORE, D. P.; YANIZ, M. G.; ODEÓN, A. C.; CANO, D.; LEUNDA, M. R.; SPÄTH, E. A. J.; CAMPERO, C. M. (2007) Serological evidence of *Neospora caninum* infections in goats from La Rioja Province, Argentina. *Small Rumin Res*, 73:256-258.
- MORAES, L. M. B.; RAIMUNDO, J. M.; GUIMARÃES, A.; SANTOS, H. A.; MACEDO-JUNIOR, G. L.; MASSARD, C. L.; MACHADO, R. Z.; BALDANI, C. D. (2011) Occurrence of anti-*Neospora caninum* and anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in goats and sheep in western Maranhão, Brazil. *Ver Bras Parasitol Vet*, 20(4):3212-317.
- MORENO, B.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; VILLA, A.; NAVARRO, A.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ORTEGA-MORA, L. M. (2012) Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. *Vet Parasitol*, 187:312-318.
- MÜLLER, Z.; ZIMMERMANN, V.; HENTRICH, B.; GOTTSTEIN, B. (1996) Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. *J Clin Microbiol*, 34:2850-2852.

- NAGULESWARAN, A.; HEMPHILL, A.; RAJAPAKSE, R. P. V. J.; SAGER, H. (2004) Elaboration of a crude antigen ELISA for serodiagnosis of caprine neosporosis: validation of the test by detection of *Neospora caninum*-specific antibodies in goats from Sri Lanka. *Vet Parasitol*, 126:257-262.
- NAKAGARI, K. Y. R.; ABREU, C. C.; COSTA, R. R.; ORLANDO, D. R.; FREIRE, L. R.; BRUHN, F. R. P.; PECONICK, A. P.; WOUTERS, F.; WOUTERS, A. T. B.; RAYMUNDO, D. L.; VARASCHIN, M. S. (2016) Lesions and distribution of *Neospora caninum* in tissues of naturally infected goats. *Small Rumin Res*, 140:57-62.
- NISHIMURA, M.; KOHARA, J.; KURODA, Y.; HIASA, J.; TANAKA, S.; MUROI, Y.; KOJIMA, N.; FURUOKA, H.; NISHIKAWA, Y. (2013) Oligomannose-coated liposome-entrapped dense granule protein 7 induces protective immune response to *Neospora caninum* in cattle. *Vaccine*, 31:3528-3535.
- NUNES, A. C. B. T.; YAMASAKI, E. M.; KIM, P. C. P.; MELO, R. P. B.; RIBEIRO-ANDRADE, M.; PORTO, W. J. N.; MOTA, R. A. (2017) Transplacental transmission of *Neospora caninum* in naturally infected small ruminants from northeastern Brazil. *Pesq Vet Bras*, 37(9):921-925.
- NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M. (2011) Strategies to improve the reproductive efficiency of goats in Brazil. *Small Rumin Res*, 98:176-184.
- ORTEGA-MORA, L. M.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; GÓMEZ-BAUTISTA, M. (2006) Diagnosis of bovine neosporosis: Recent advances and perspectives. *Acta Parasitol*, 51(1):1-14.
- ORTEGA-MORA, L. M.; FERRE, I.; del-POZO, I.; CAETANO-DA-SILVA, A.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ADURIZ, G. (2003) Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. *Vet Parasitol*, 117:301-308.
- ORTEGA-MORA, L. M.; GOTTSTEIN, B.; CONRATHS, F. J.; BUXTON, D. (2007) Protozoal abortions in farm ruminants: Guidelines for diagnosis and control. CAB International.
- OSAWA, T.; WASTLING, J.; MALEY, S.; BUXTON, D.; INNES, E.A. (1998) A multipleantigen ELISA to detect *Neospora*-specific antibodies in bovine serabovine foetal fluids, ovine and caprine sera. *Vet Parasitol*, 79:19-34.

PACKHAM, A. E.; SVERLOW, K. W.; CONRAD, P. A.; LOOMIS, E. F.; ROWE, J. D.; ANDSERON, M. L.; MARSH, A. E.; CRAY, C. BARR, B. C. (1998) A modified agglutination test for *Neospora caninum*: Development, optimization, and comparison to the Indirect Fluorescent-Antibody Test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Clin Diagn Lab Immunol, 5(4):467-473.

PARE, J.; FECTEAU, G.; FORTIN, M.; MARSOLAIS, G. (1998) Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. J Am Vet Med Assoc, 213:1595-1598.

PEREIRA-BUENO, J.; QUINTANILLA-GOZALO, A.; PÉREZ-PÉREZ, V.; ESPI-FELGUEROSO, A.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ORTEGA-MORA, L. M. (2003) Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. Vet Parasitol, 111:143-152.

PIERGILI-FIORETTI, P. D.; PASQUALI, P.; DIAFERIA, M.; MANGILI, V.; ROSIGNOLI, L. (2003) *Neospora caninum* Infection and Congenital Transmission: Serological and Parasitological Study of Cows up to the Fourth Gestation. J Vet Med, 50:399-404.

PORTO, W. J. N.; HORCAJO, P.; KIM, P. C. P.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ROMÃO, E. A.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; MESQUITA, E. P.; MOTA, R. A.; ORTEGA-MORA, L. M. (2017) Peripheral and placental immune responses in goats after primoinfection with *Neospora caninum* at early, mid and late gestation. Vet Parasitol, 242:38-43.

PORTO, W. J. N.; REGIDOR-CERRILLO, J.; KIM, P. C. P.; BENAVIDES, J.; SILVA, A. C. S.; HORCAJO, P.; OLIVEIRA, A. A. F.; FERRE, I.; MOTA, R. A.; ORTEGA-MORA, L. M. (2016) Experimental caprine neosporosis: the influence of gestational stage on the outcome of infection. Vet Res, 47(29), DOI: 10.1186/S13567-016-0312-6

QUINN, H. E.; ELLIS, J. T.; SMITH, N. C. (2002) *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? Trends Parasitol, 18:391-394.

REGIDOR CERRILLO, J.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.; DEL-POZO, I.; JIMÉNEZ-RUIZ, E.; ADURIZ, G.; ORTEGA-MORA, L. M. (2010) Influence of *Neospora caninum* intra-specific variability in the outcome of infection in a pregnant BALB/c mouse model. Vet Res, 41(52), DOI: 10,1051/vetres/2010024

REGIDOR-CERRILLO, J.; ARRANZ-SOLÍS, D.; BENAVIDES, J.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.; CASTRO-HERMIDA, J. A.; MEZO, M.; PÉREZ, V.; ORTEGA-

MORA, L. M.; GONZÁLEZ-WARLETA, M. (2014) *Neospora caninum* infection during early pregnancy in cattle: how the isolate influences infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses. *Vet Res*, 45(10).

REGIDOR-CERRILLO, J.; DÍEZ-FUERTES, F.; GARCÍA-CULEBRAS, A.; MOORE, D. P.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; CUEVAS, C.; SCHARES, G.; KATZER, F.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; MEZO, M.; ORTEGA-MORA, L. M. (2013) Genetic diversity and geographic population structure of bovine *Neospora caninum* determined by microsatellite genotyping analysis. *Plos One*, 8(8). DOI: 10.1371/journal.pone.0072678

REGIDOR-CERRILLO, J.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.; ORTEGA-MORA, L. M. (2006) Multilocus microsatellite analysis reveals extensive genetic diversity in *Neospora caninum*. *J Parasitol*, 92(3):517-524.

REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. (2009) *Neospora caninum* – How close are we to development of an efficacious vaccine that prevents abortion in cattle? *Int J Parasitol*, 39:1173-1187.

REID, A. J.; VERMONT, S. J.; COTTON, J. A.; HARRIS, D.; HILL-CAWTHORNE, G. A.; KÖNEN-WAISMAN, S.; LATHAM, S. M.; MOURRIER, T.; NORTON, R.; QUAIL, M. A.; SANDERS, M.; SHANMUGAM, D.; SOHAL, A.; WASMUTH, J. D.; BRUNK, B.; GRIGG, M. E.; HOWARD, J. C.; PARKINSON, J.; ROOS, D. S.; TREES, A. J.; BERRIMAN, M.; PAIN, A.; WASTLING, J. M. (2012) Comparative genomics of the Apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: Coccidia differing in host range and transmission strategy. *Plos One*, 8(3). DOI: 10.1371/journal.ppat.1002567

RIBEIRO-ANDRADE, M.; LEÃO-FILHO, W. F.; SILVA, L. A.; MELO, R. P. B.; PORTO, W. J. N.; MOTA, R. A. (2015) Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cabras da Microrregião de Arapiraca, Alagoas. *Cienc Vet Trop*, 18(2):355-357.

RODRÍGUEZ-PONCE, E.; CONDE, M.; CORBERA, J. A.; JABER, J. R.; VENTURA, M. R. GUTIÉRREZ, C. (2017) Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in goat population in Canary Islands (Macaronesia Archipelago, Spain). *Small Rumin Res*, 147:73-76.

ROJO-MONTEJO, S.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ALVAREZ-GARCIA, G.; MARUGAN-HERNANDEZ, V.; PEDRAZA-DIAZ, S.; BLANCO-MURCIA, J.; PRENAFETA, A.; MIGUEL ORTEGA-MORA, L. M. (2009).

Isolation and characterization of a bovine isolate of *Neospora caninum* with low virulence. *Vet Parasitol*, 159:7-16.

ROJO-MONTEJO, S.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; RODRIGUEZ-MARCOS, S.; PEREZ-ZABALLOS, F.; LOPEZ-PEREZ, I.; PRENAFETA, A.; ORTEGA-MORA, L. M. (2011) Comparative efficacy of immunization with inactivated whole tachyzoites versus a tachyzoitebradyzoite mixture against neosporosis in mice. *Parasitology*, 138:1372-1383.

ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; DUBEY, J. P. (1998) Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitol Res*, 84:50-53.

ROMERO, J. J.; FRANKENA, K. (2003) The effect of the dam-calf relationship on serostatus to *Neospora caninum* on 20 Costa Rican dairy farms. *Vet Parasitol*, 114:159-171.

ROMERO, J. J.; PEREZ, E.; FRANKENA, K. (2004) Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rica dairy cows under field conditions. *Vet Parasitol*, 123:149-159.

ROSBOTTOM, A.; GIBNEY, E. H.; GUY, C. S.; KIPAR, A.; SMITH, R. F.; KAISER, P.; TRESS, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. (2008) Up regulation of cytokines is detected in the placentas of cattle infected with *Neospora caninum* is more marked early in gestation when fetal death is observed. *Infec Immun*, 76(6), 2352-2361.

ROSBOTTOM, A.; GIBNEY, E. H.; KAISER, P.; HARTLEY, C.; SMITH, R. F.; ROBINSON, R.; KIPAR, A.; WILLIAMS, D. J. L. (2011) Up regulation of the maternal immune response in the placenta of cattle naturally infected with *Neospora caninum*. *Plos One*, 6(1), DOI: 10.1371/journal.pone.0015799

ROSYPAL, A.C.; LINDSAY, D.S. (2005) The sylvatic cycle of *Neospora caninum*: where do we go from here? *Trends Parasitol*, 21:439-440.

SALEHI, N.; GOTTSSTEIN, B.; HADDADZADEH, H. R. (2015) Genetic diversity of bovine *Neospora caninum* determined by microsatellites markers. *Parasitol Int*, 64:357-361.

SANTOLARIA, P.; LÓPEZ-GATIUS, F.; YÁNIZ, J.; GARCÍA-ISPIERTO, I.; NOGAREDA, C.; BECH-SÀBAT, G.; SERRANO, B.; ALMERÍA, S. (2009) Early

postabortion recovery of *Neospora*-infected lactating dairy cows. *Theriogenology*, 72:798-802.

SANTOS, C. S. A. B.; AZEVEDO, S. S.; SOARES, H. S.; HIGINO, S. S. S.; SANTOS, F. A.; SILVA, M. L. C. R.; PENA, H. F. J.; ALVES, C. J.; GENNARI, S. M. (2013) Flock-level risk factors associated with *Neospora caninum* seroprevalence in dairy goats in a semiarid region of Northeastern Brazil. *Small Rumin Res*, 112:239-242.

SCHARES, G.; CONRATHS, F. J. (2001) Placentophagia – an alternative way of horizontal transmission of *Neospora caninum* in cattle? Responde from Gereon Schares and Franz Josef Conraths. *Trens Parasitol*, 17:574-575.

SCHETTERS, T.; DUBEY, J. P.; ADRIANARIVO, A.; FRANKENA, K.; ROMERO, J. J.; PERÉZ, E.; HEUER, C.; NICHOLSON, C.; RUSSEL, D.; WESTON, J. (2004) Intervet symposium: bovine neosporosis. *Vet Parasitol*, 125:137-146.

SCHOCK, A.; INNES, E. A.; YAMANE, I.; LATHAM, S. M.; WASTLING, J. M. (2001) Genetic and biological diversity among isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology*, 123:13-23.

SERRANO, B.; ALMERIA, S.; GARCIA ISPIERTO, I.; YANIZ, J. L.; ABDELFATTAH-HASSAN, A.; LOPEZ-GATIUS, F. (2011). Peripheral white blood cell counts throughout pregnancy in non-aborting *Neospora caninum*-seronegative and seropositive high-producing dairy cows in a Holstein Friesian herd. *Res Vet Sci*, 90:457-462.

SERRANO-MARTINEZ, E.; FERRE, I.; MARTINEZ, A.; OSORO, K.; MATEOS-SANZ, A.; del-POZO, I.; ADURIZ, G.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C. O.; ORTEGA-MORA, L. M. (2007). Experimental neosporosis in bulls: parasite detection in sêmen and blood and specific antibody and interferon-gamma responses. *Theriogenology*, 67:1175-1184.

SÖNDGEN, P.; PETERS, M.; BÄRWALD, A.; WURM, R.; HOLLING, F.; CONRATHS, F. J.; SCHARES, G. (2001) Bovine neosporosis: immunoblot improves foetal serology. *Vet Parasitol*, 102:279-290.

SYED-HUSSAIN, S. S.; HOWE, L.; POMROY, W. E.; WEST, D. M.; HARDCASTLE, M.; WILLIAMSON, N. B. (2015) Vertical transmission in experimentally infected sheep

despite previous inoculation with *Neospora caninum* NcNZ1 isolate. Vet Parasitol, 208:150-158.

SYED-HUSSAIN, S. S.; HOWE, L.; POMROY, W. E.; WEST, D. M.; SMITH, S. L.; WILLIAMSON, N. B. (2013) Detection of *Neospora caninum* DNA in semen of experimental infected rams with no evidence of horizontal transmission in ewes. Vet Parasitol, 197:534-542.

THURMOND, M. C.; BRANSCUM, A. J.; JOHNSON, W. O.; BEDRICK, E. J.; HANSON, T. E. (2005) Predicting the probability of abortion in dairy cows: a hierarchical Bayesian logistic-survival model using sequential pregnancy data. Prev Vet Med, 68:223-239.

TOPAZIO, J. P.; WEBER, A.; CAMILLO, G.; VOGEL, F. F.; MACHADO, G.; RIBEIRO, A.; MOURA, A. B.; LOPES, L. S.; TONIN, A. A.; SOLDÁ, N. M.; BRÄUNIG, P.; SILVA, A. S. (2014) Seroprevalence and risk factors for *Neospora caninum* in goats in Santa Catarina state, Brazil. Braz J Vet Parasitol, 23(3):360-366.

TORRES, M. P.; ORTEGA, Y. R. (2006) *Neospora caninum* antibodies in comercial fetal bovine sserum. Vet Parasitol, 140:352-355.

TRESS, A. J.; DAVISON, H. C.; INNES, E. A.; WASTLING, J. M. (1999) Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. Int J Parasitol, 29:1195-1200.

TRESS, A. J.; McALLISTER, M. M.; GUY, C. S.; McGARRY, J. W.; SMITH, R. F.; WILLIAMS, D. J. L. (2002) *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. Vet Parasitol, 109:147-154.

TRESS, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. (2005) Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. Trends Parasitol. 21(12):558-561.

UGGLA, A.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O. J. M.; JAKUBEK, E. B.; KINDAHL, H.; BJÖRKMAN, C. (1998) Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. Int J Parasitol, 28:1467-1472.

UNZAGA, J. M.; MORÉ, G.; BACIGALUPE, D.; RAMBEAUD, M.; PARDINI, L.; DELLARUPE, A.; DE FELICE, L.; GOS, M. L.; VENTURINI, M. C. (2014) *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in goat abortions from Argentina. Parasitol Int, 63:865-867.

UZÊDA, R. S.; PINHEIRO, A. M.; FERNÁNDEZ, S. Y.; AYRES, M. C. C.; GONDIM, L. F. P.; ALMEIDA, M. A. O. (2007) Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy goats from Bahia, Brazil. *Small Rum Res*, 70:257-259.

Van MAANEN, C.; WOUDA, W.; SCHARES, G.; von BLUMRÖDER, D.; CONRATHS, F. J.; NORTON, R.; WILLIAMNS, D. J. L.; ESTEBAN-REDONDO, I.; INNES, E. A.; MATTSON, J. G.; BJÖRKMAN, C.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; ORTEGA-MORA, L. M.; MÜLLER, N.; SAGER, H.; HEMPHILL, A. (2004) An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. *Vet Parasitol*, 126:351-364.

VARASCHIN, M. S.; HIRSCH, C.; WOUTERS, F.; NAKAGARI, K. Y.; GUIMARÃES, A. M.; SANTOS, D. S.; BEZERRA, P. S.; COSTA, R. C.; PECONICK, A. P.; LANGONI, I. M. (2012) Congenital Neosporosis in Goats from the State of Minas Gerais, Brazil. *Korean J Parasitol*, 50(1):63-67.

VIANA, J. G. A. (2008) Panorama Geral da Ovinocultura no Mundo e no Brasil. *Revista Ovinos*, Porto Alegre, 4(12).

Von BLUMRÖDER, D.; SCHARES, G.; NORTON, R.; WILLIAMS, D. J. L.; ESTEBAN-REDONDO, I.; WRIGHT, S.; BJÖRKMAN, C.; FRÖSSLING, J.; RISCO-CASTILLO, V.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; ORTEGA-MORA, L. M.; SAGER, H.; HEMPHILL, A.; van MAANEN, C.; WOUDA, W.; CONRATHS, F. J. (2004) Comparison and standardisation of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. *Vet Parasitol*, 120:11-22.

WAPENAAR, W.; BARKEMA, H. W.; VanLEEuwEN, J. A.; McCLURE, T. T.; O'HANDLEY, R. M.; KWOK, O. C. H.; THULLIEZ, P.; DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C. (2007) Comparison of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. *Vet Parasitol*, 143:166-173.

WESTON, J. F.; HEUER, C.; WILLIAMSON, N. B. (2012) Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. *Prev Vet Med*, 103:136-144.

WESTON, J. F.; HOWE, L.; COLLETT, M. G.; PATTISON, R. S.; WILLIAMSON, N. B.; WEST, D. M.; POMROY, W. E.; SYED-HUSSAIN, S. S.; MORRIS, S. T.; KENYON, P. R. (2009) Dose-titration challenge of young pregnant sheep with *Neospora caninum* tachyzoites. *Vet Parasitol*, 164:183-191.

WESTON, J. F.; WILLIAMSON, N. B.; POMROY, W. E. (2005) Associations between pregnancy outcome and serological response to *Neospora caninum* among a group of dairy heifers. *N Z Vet J*, 53:142-148.

WILLIAMS, D. J. L.; GUY, C. S.; McGARRY, J. W.; TASKER, L.; SMITH, F.; MacEACHERN, K.; CRIPPS, P. J.; KELLY, D. F.; TREES, A. J. (2000) *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology*, 121:347-358.

WILLIAMS, D. J. L.; GUY, C. S.; SMITH, R. F.; ELLIS, J.; BJÖRKMAN, C.; REICHEL, M. P.; TREES, A. J. (2007) Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. *Infect Immun*, 75:1343-1348.

WILLIAMS, D. J. L.; GUY, C. S.; SMITH, R. F.; GUY, F.; McGARRY, J. W.; TREES, A. J. (2003) First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. *Int J Parasitol*, 33:1059-1065.

WILLIAMS, D. J. L.; HARTLEY, C. S.; BJÖRKMAN, C.; TREES, A. J. (2009) Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* – how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. *Vet Parasitol*, 136:1895-1900.

WILLIAMS, D. J.; DAVISON, H. C.; HELMICK, B.; McGARRY, J.; GUY, F.; OTTER, A.; TREES, A. J. (1999) Evaluation of a commercial ELISA for detecting serum antibody to *Neospora caninum* in cattle. *Vet Rec*, 145:571–575.

WILLIAMSON, N. B.; ANTONY, A.; PFEIFFER, D. U.; POMROY, W. M.; REICHEL, M. P.; WALTON, J. K. (2000) Recent research into *Neospora caninum* in New Zealand. In: st'21 World Buiatrics Congress. Punta del Este, Uruguay, 95.

WOUDA, W.; BUXTON, D. (2007) Aetiological diagnosis: neosporosis – immunohistochemistry. In: ORTEGA-MORA, L. M.; GOTTSTEIN, B.; CONRATHS, F. J.; BUXTON, D. Protozoal abortion in farm ruminants. Guidelines for diagnosis and control. CAB International Oxfordshire, 57-58.

CAPÍTULO 1

Study of recrudescence of neosporosis in experimentally infected goats

**Artigo submetido ao periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e
Zootecnia – ISSN 1678-4162**

(Qualis A2 – Área de avaliação: Medicina Veterinária)

1 Study of recrudescence of neosporosis in experimentally infected goats

3 Estudo da recrudescência da neosporose em cabras experimentalmente infectadas

5 ABSTRACT

6 The purpose of this study was to obtain new insights about the dynamic of experimental
7 infection by *Neospora caninum* in pregnant goats by the recrudescence model. Fifteen
8 Boer goats were used as described: ten animals inoculated with 10^7 tachyzoites from NC-
9 Spain 7 isolate, two months prior to the mating, and five animals were used as negative
10 control group. The infection was confirmed by the significant increasing of the
11 temperature and seroconversion. As result of the first pregnancy, ten inoculated females
12 delivered: twelve animals born alive (12/14), one stillborn (1/14) and another died shortly
13 after birth (1/14). The *N. caninum* DNA was detected in tissues of infected goats as
14 described: 33.3% (3/9) of the brains, 22.2% (2/9) of the uterine lymph node and 40%
15 (4/10) of the placentas. In the offspring samples, DNA was detected as described: 21.42%
16 (3/14) of brains, 28.57% (4/14) of livers and 21.42% (3/14) of skeletal muscles were
17 positive. These preliminary results provide data about the pathogenesis of caprine
18 neosporosis by the observation of the vertical transmission of *N. caninum*. Further studies
19 are necessary to better understand the real influence of the isolate and the infection
20 consequences in successive pregnancies, as well as the vertical transmission rate.

22 KEYWORDS

23 *Neospora caninum*, caprine, pathogeny, experimental model

25 RESUMO

26 Objetivou-se neste estudo aprofundar os conhecimentos sobre a dinâmica da infecção
27 experimental por *Neospora caninum* na cabra gestante, utilizando um modelo de
28 recrudescência. Foram utilizadas 15 cabras da raça Boer; 10 cabras foram inoculadas dois
29 meses antes da cobertura com 10^7 taquizoítos do isolado Nc-Spain 7 de *N. caninum* e
30 cinco cabras formaram o grupo controle negativo. A infecção foi comprovada pelo
31 incremento significativo da temperatura e soroconversão. Como resultado da primeira
32 prenhez, as fêmeas inoculadas pariram: doze animais nascidos vivos (12/14), um
33 natimorto (1/14) e outro com óbito pré-maturo (1/14). Nos tecidos das cabras inoculadas,
34 foi detectado DNA de *N. caninum* em: 33,3% (3/9) dos cérebros, 22,2% (2/9) do

35 linfonodos uterinos e 40% (4/10) das placentas. Nas amostras das crias, o DNA foi
36 detectado em: 21,42% (3/14) dos cérebros, 28,57% (4/14) dos fígados e 21,42% (3/14)
37 dos músculos esqueléticos foram positivos. Estes resultados prévios incrementam dados
38 sobre a patogenia da neosporose caprina com a verificação da transmissão vertical de *N.*
39 *caninum* na espécie caprina na PCR. É necessário dar continuidade nos estudos para obter
40 respostas sobre a real influência do isolado e a patogenia da infecção em gestações
41 subsequentes assim como e a taxa de transmissão vertical.

42

43 **PALAVRAS-CHAVE**

44 *Neospora caninum*, caprinos, patogenia, modelo experimental

45

46 **INTRODUCTION**

47 *Neospora caninum* is an obligate intracellular protozoan parasite belonging to the
48 phylum Apicomplexa, closely related to *Toxoplasma gondii*, also with a heteroxenous
49 cycle. The dog (*Canis familiaris*) (Mcalisster et al, 1998; Basso et al, 2001) and gray wolf
50 (*Canis lupus*) (Dubey et al, 2011) have proven to be natural definitive hosts of the
51 parasite, and other canids such as coyotes (*Canis latrans*) and the australian dingo (*Canis*
52 *domesticus*) were also demonstrated experimentally as definitive hosts for this protozoan
53 (Gondim et al., 2004; King et al, 2010).

54 Transmission of *N. caninum* can occur by the horizontal route (postnatal infection)
55 when the intermediate host is infected by ingestion of sporulated oocysts; although the
56 vertical route via transplacental that occurs from a infected female to her offspring appear
57 to be the most relevant (congenital infection) (Dubey et al. 2011). For the mechanisms of
58 transplacental infection, Tress & Williams (2005) there are described two distinct
59 categories: endogenous transplacental infection related to recrudescence of a pre-existing
60 chronic infection in a pregnant female; and exogenous transplacental infection, as a result
61 of primary infection by oocysts during pregnancy. The occurrence of these two
62 mechanisms of transmission determine different epidemiological and pathological
63 consequences. Seroepidemiological studies in cattle have demonstrated that the
64 persistence of *N. caninum* infection in a herd is significantly related to the efficient
65 vertical transmission, since it allows propagation of the parasite over successive
66 generations (Tress et al. 1999), indicating that females remain infected throughout life,
67 transmitting the infection to their progeny in successive pregnancies or intermittently
68 (endogenous) (Dubey et al., 2006; 2007; 2011).

69 Experimental studies with live tachyzoites of *N. caninum* inoculated in cattle
70 months before pregnancy showed no evidences of infection in subsequent pregnancies
71 (Williams et al., 2000; Innes et al., 2001), in contrast to what occurs in natural infections
72 in this same species (Guy et al., 2001; Innes et al, 2002; Williams et al., 2003). In sheep,
73 Jolley et al. (1999) described vertical transmission to fetuses of sheep with latent
74 infections. However, after an established persistent infection, the recrudescence has been
75 reported less frequently (Buxton et al., 2001; Gonzalez-Warleta et al., 2014; Syed-
76 Hussain et al., 2015).

77 Cases of abortion and neonatal mortality have been described in goats by *N.*
78 *caninum* in experimental model (Lindsay et al., 1995; Porto et al., 2016) and natural
79 infection in the United States (Barr et al., 1992), Costa Rica (Dubey et al., 1996), Brazil
80 (Corbellini et al., 2001; Mesquita et al., 2013) and Italy (Eleni et al., 2004), but remains
81 unclear the real consequences of natural infection by this coccidia like an abortive agent
82 in these ruminants.

83 To understand details of dynamics in the experimental infection in goats is
84 necessary to carry out further studies, in order to determine the maintainability of the
85 infection in the herd through vertical transmission by transplacental route, as well as
86 understanding the kinetics of the humoral immune response, providing more data on the
87 pathogenesis of the disease in this species, since they are scarce. The aim of this study
88 was to investigate the outcome of an experimental *N.caninum* infection in pregnant goats,
89 using a model of recrudescence.

90

91 **MATERIALS AND METHODS**

92 Prior to the beginning of the experimental activities was requested permission
93 from the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Alagoas, Brazil,
94 where the animals were allocated. The project was approved with license number
95 59/2013.

96 Fifteen primiparous goats, with nine months old of Boer breed were selected from
97 a property without reproductive disorders. All animals were seronegative to agents
98 associated with reproductive failure in goats such as *N. caninum*, *T. gondii*, *Brucella* spp.,
99 *Chlamydomphila abortus* and *Coxiella burnetii*. The animals were kept in stables (intensive
100 breeding system) and their food consisted mostly of tifton grass hay (*Cynodon* spp.) and
101 native fresh chopped grass, offered twice a day, in addition to concentrated (commercial
102 balanced feed), protein mineral salt and water *ad libitum*.

103 Of the selected animals, 10 were inoculated intravenously, in the jugular vein with
104 10^7 tachyzoites of the Nc-Spain7 isolate. The five remaining animals, formed the negative
105 control group of infection, and were inoculated with PBS. All experimental infections
106 were performed in less than an hour after harvest the tachyzoites of the cell culture.

107 Two months after experimental inoculation, the goats were oestrus synchronized,
108 adopting a short protocol: 1) application of 0.3 mL of cloprostenol (Ciosin® - Intervet,
109 Brazil), intramuscularly; 2) followed by placing intravaginal devices (CIDR®, Pfizer,
110 Canada), for a period of five days; 3) in withdrawal of the devices was applied
111 intramuscularly 200 IU of equine chorionic gonadotropin - eCG (Novormon®, Zoetis-
112 Pfizer, Brazil). Twelve hours after the eCG application and removal of CIDR, the females
113 were kept under close observation to check if the oestrus started with the introduction of
114 males for natural mating. Two males with fertility checked by andrological tests and
115 seronegative for infectious agents mentioned above were used. The diagnosis of
116 pregnancy was performed by ultrasonography via transabdominal and/or transrectal, from
117 day 21 of gestation (calculated from the withdrawn of males).

118 The isolate Nc-Spain7 of *N. caninum* (passage number 13) used in the study was
119 maintained in Marc-145 cells in monolayer culture before inoculation under conditions
120 specified by Regidor-Cerrillo et al. (2010). Inocula was prepared as previously described
121 by Arranz-Solís et al. (2015). Tachyzoite numbers were determined by Trypan blue
122 exclusion followed by counting in a Neubauer chamber, and parasites were resuspended
123 in PBS at the required dose of 10^7 tachyzoites in a final volume of 1 mL. Tachyzoites
124 were administered to goats within 1h of harvesting from tissue culture.

125 The diagnosis of pregnancy was performed by ultrasonography via
126 transabdominal and/or transrectal, from day 21 of gestation (calculated from the
127 withdrawn of males) and repeated weekly to assess fetal viability in pregnant goats.
128 Parameters suggestive of fetal debility such as fetal heart rate below 100 beats per minute
129 (bpm), slow fetal moving and decreased amniotic fluid volume were considered.

130 Clinical examination was performed in all the animals by observation of all
131 parameters of interest: attitude, behavior, body condition score, heart rate, respiratory
132 rate, rectal temperature, ruminal movements. All goats were examined at two different
133 times of day (morning and afternoon) for monitoring the appearance of any clinical signs
134 such as anorexia, hyperthermia, weight loss and behavior changes. The rectal temperature
135 was measured for 18 consecutive days (three days before and 15 after inoculation) and,
136 after this period, the temperature was measured twice a week.

137 The diagnosis of pregnancy was performed by ultrasonography weekly from day
138 21 of gestation to assess fetal viability in pregnant goats. Parameters suggestive of fetal
139 debility such as fetal heart rate below 100 beats per minute (bpm), slow fetal moving and
140 decreased amniotic fluid volume were considered

141 In animals that led to term pregnancy clinical examination of the offspring was
142 conducted, with attention to the presence of neuromotor disorders such as persistent
143 presence of decubitus, motor weakness to maintain station, decreased or absent sucking
144 reflex. All the goats that generated kids with visible clinical disorders and poor prognosis
145 were euthanized in accordance with the standards established by Resolution No.
146 714/2002, the Federal Council of Veterinary Medicine - Brazil (CFMV, Brazil).

147 Goats delivered healthy females were kept alive in order to check for possible
148 reproductive changes: possibility of vertical transmission of the disease in their offspring
149 reflecting reproductive problems in F2 or the possibility of reactivation of infection in
150 subsequent pregnancies.

151 To confirm infection by *N. caninum*, the blood of animals was collected from day
152 -3 before inoculation on, with intervals of three days between the collects. After 21 day
153 p.i., blood samples were taken with a fortnightly period. After the birth of the offspring,
154 the blood was collected before ingestion of colostrum. To evaluate the humoral immune
155 response both maternal and pre-colostral, total blood was collected from the jugular vein
156 using sterile 21G needle into 10 ml vacutainer tubes without anticoagulant, followed by
157 centrifugation at 1800 rpm for five minutes to the clot retraction and obtainment of serum.
158 Serum samples were stored in sterile polypropylene microcentrifuge tubes at -20°C until
159 the completion of serological tests.

160 From euthanized goats, 10 randomly selected placentomes were recovered from
161 each placenta and were transversely cut in slices of 2–3 mm of thickness that were
162 distributed for storage in 10% formalin for histopathological examinations, and the rest
163 of the placentomes were kept at -80°C for further parasite DNA detection by PCR. Brain
164 (one half at -80°C and one half in 10% formalin) and uterine and a pre-scapular lymph
165 nodes from goats were collected for PCR and histopathological analysis. Kids tissues
166 (brain, heart, liver, lungs and a portion of semitendinosus skeletal muscle) were stored at
167 -80°C for DNA extraction and fixation in 10% formalin.

168 For serological analysis, serum samples were assayed for specific IgG antibodies
169 using an *N. caninum* soluble extract antigen-based ELISA prepared according to Álvarez-
170 García et al. (2003). Serum samples were analysed in duplicate and the mean value of the

171 optical density (OD) was converted into a relative index per cent (RIPC) using the
172 following formula: $RIPC = (OD_{405} \text{ sample} - OD_{405} \text{ negative control}) / (OD_{405} \text{ positive}$
173 $\text{control} - OD_{405} \text{ negative control}) \times 100$. The RIPC value ≥ 10 indicates a positive result.

174 Samples intended for histopathological examinations, which were previously
175 fixed in buffered formalin, embedded in special paraffin wax for histology and were
176 processed by standard procedures for hematoxylin and eosin (HE) staining (Luna, 1968).

177 Genomic DNA was extracted from 50–100 mg of maternal and kids tissue samples
178 using the commercial Maxwell® 16 Mouse Tail DNA Purification Kit, developed for
179 automated Maxwell® 16 System (Promega®, USA), following the manufacturer's
180 recommendations. The concentration of DNA for all samples was determined by
181 spectrophotometry (NanoPhotometer P-300, Inplen®, Germany) and adjusted to 50–100
182 ng/μL. All DNA samples from placentomes and lymph nodes were also subjected to
183 electrophoresis on a 0.8% agarose gel to check the quality of DNA extraction process.

184 Parasite DNA detection was carried out by a nested-PCR adapted to a single tube
185 from the internal transcribed spacer (ITS1) region of *N. caninum*, using the external
186 primers TgNN1-TgNN2 and internal primers NP1–NP2 as previously described (Buxton
187 et al., 1998; Regidor-Cerrillo et al., 2014). Each reaction was performed in a final volume
188 of 25 μL with 5 μL of sample DNA. To avoid cross-contamination and false positive
189 reactions, DNA extraction, PCR sample preparation and electrophoresis were performed
190 in separate rooms employing different sets of instruments, aerosol barrier tips and
191 disposable gloves. Moreover, both reactions without a template and DNA samples from
192 the kid-control group were included in each round of DNA extraction and PCR as
193 negative controls. Positive PCR controls with *N. caninum* genomic DNA equivalent to
194 10, 1 and 0.1 tachyzoites in 100 ng of goat DNA were also included in each batch of
195 amplifications. In addition, nested PCR for *Toxoplasma gondii* protocol described by
196 Hurtado et al. (2001) as counter-evidence of infection was used. Ten μL aliquots of the
197 PCR products were visualized under UV light in 1.5% agarose/ethidium bromide gel to
198 detect the *N. caninum*-specific 247 bp amplification product.

199 To analyze the differences between the rectal temperatures (pre and post-
200 inoculation) and seroconversion (relative index $\times 100$ - IRPC above 10) two-way
201 ANOVA test was used and for comparison between groups Dunn's test was performed.
202 In the second analysis stage, Tukey's test was used to evaluate all possible paired
203 comparisons between samples collected over time in the control group and infected.

204 Statistical significance for all analysis was established at $P < 0.05$. All statistical analyses
205 were carried out using GraphPad Prism 6.0 software.

206

207 RESULTS

208 The mean rectal temperature of the infected group reached 40.8°C peaks at 8 days
209 post-inoculation (d.p.i.). The mean values of temperatures of the animals in this group
210 were significantly higher than control group from 5 to 10 dpi. ($p < 0.05$), returning to
211 normal after that period. The summary of mean values of temperature of all the groups
212 can be seen in Figure 1.

213 Individually, varied response in the inoculated group was observed. In one of the
214 inoculated animals, there was a different response in temperature, with a feverish peak of
215 40.5°C at 1 d.p.i. followed by average temperatures of 39.1°C between the 2nd and 7^d.pi,
216 and back to raise its temperature only on 8^d.pi to 40.2°C. In another animal of the
217 inoculated group, average values of 40.9 ° C were measured from the 4 to the 15 dpi. In
218 females inoculated, clinical signs consistent with fever (apathy, decreased appetite,
219 ruffled hair, tachypnea and dyspnea) were noticed. Animals in the negative control group
220 showed no clinical changes throughout the experimental period.

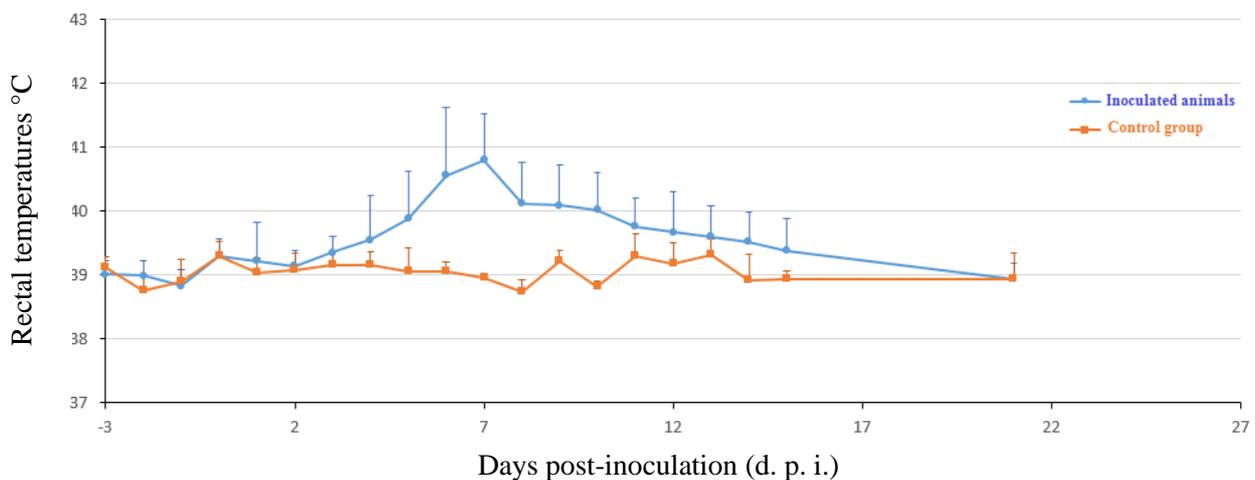


Figure 1. Mean rectal temperatures (95% confidence interval) from days -3 to 21 days post-inoculation. Goats of inoculated group with 10^7 tachyzoites of *N. caninum*. Negative control group inoculated with Marc-145 cells in buffer solution at the same inoculation dose (10^7 Marc-145 cells per animal).

221 Effective mating (with confirmation of gestation) was observed in nine inoculated
222 goats at different moments, as described: 50% (5/10) in an average of 66.4 ± 1.34 d.p.i.;
223 20% (2/10) in 81.5 ± 3.53 d.p.i. and 20% (2/10) in 105.5 ± 2.12 d.p.i. One (1/10) of the
224 inoculated females (identified by number 61), had gestation confirmed at 435 d.p.i. Until

225 that period, no signals of gestation were observed with several repetition of estrus. The
226 control group had an average of effective mating of 73.2 ± 4.32 d.p.i.

227 Monitoring of gestation by ultrasound showed no fetal features of debility, no
228 cases of embryonic absorption, and no abortion in pregnant goats. Average gestation time
229 in inoculated animals was 142.7 ± 5.03 days.

230 As result of the first pregnancy, nine inoculated females delivered 13 kids in total.
231 Eleven animals were born alive (11/13), one stillborn (1/13) and another died shortly after
232 birth (1/13). Of live kids, nine (9/13) were euthanized and four (4/13) healthy females
233 kids were kept alive.

234 In the second gestation, four animals (4/10) delivered five healthy kids and the
235 goat 61 had your first gestation stabilized. The mating data, gestation period and number
236 of kids associated with parasite DNA detection and histological lesions per animal are
237 shown in Table 1.

238 The five animals in the control group had an average gestation period of 146 ± 2.54
239 days, resulting in five healthy kids that were euthanized.

240 The specific antibody response against *N. caninum* in all animals over time can be
241 seen in Figure 2. In serum samples from the inoculated group taken from prior inoculation
242 until 10 d.p.i., no IgG specific antibodies for *N. caninum* were detected. Seroconversion
243 was detected in the infected animals from 14 d.p.i., with a significant increase in the
244 production of IgG ($p < 0.0001$), and it peaked at 21 and 28 d.p.i. In control group,
245 seroconversion was not detected, and no significant fluctuation in antibody levels when
246 compared to animals from the inoculated group ($p > 0.05$) was present.

247 The pre-colostral blood taken from 13 kids of infected goats and the five kids of
248 control group were all ELISA seronegative.

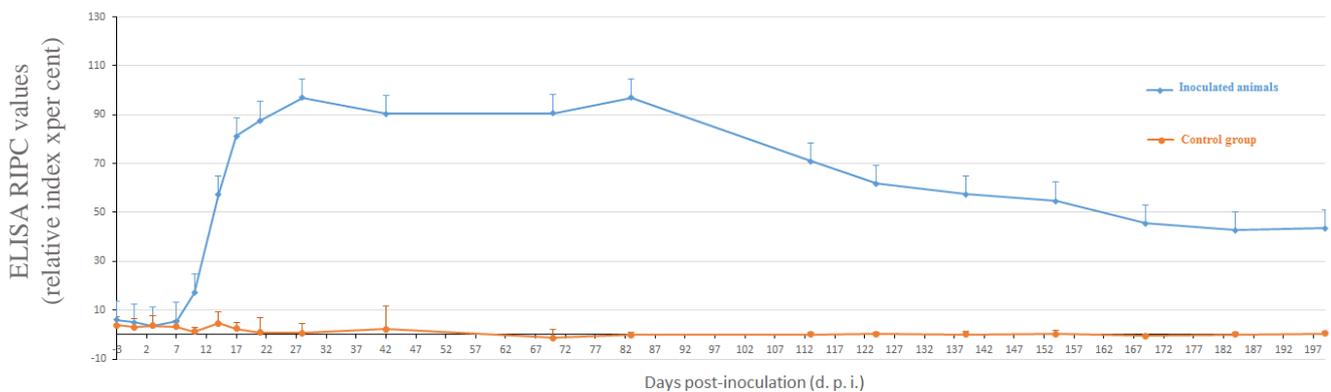


Figure 2. *N. caninum*-specific IgG responses in the serum of goats inoculated with 10^7 tachizoytes and negative control group. Data are expressed as mean relative index per cent (RIPC) and erros bars are the standard deviations for each group. Positive cut-off ≥ 10 RIPC.

249 By nested PCR, the *N. caninum* DNA was detected in tissues of infected goats as
250 described: 33.3% (3/9) of the brains, 22.2% (2/9) of the uterine lymph node and 40%
251 (4/10) of the placentas (Table 1).

252 In the offspring samples (first and second delivery), DNA was detected as
253 described: 21.42% (3/14) of brains, 28.57% (4/14) of livers and 21.42% (3/14) of skeletal
254 muscles were positive. All tissue samples were analyzed in triplicate and just one of them
255 was positive (Table 1). *N. caninum* DNA was not detected in any sample of the animals
256 from negative controls (females and offspring).

257 In addition, samples of brain and skeletal muscle from all offsprings were negative
258 to *T. gondii*.

259 DNA of *N. caninum* was not detected in any sample of the animals from negative
260 controls (females and offspring).

261 In the brain tissue of the inoculated goats, consistent lesions with neosporosis were
262 visualized in two (2/10) animals. Specifically, the brain from goat 62 showed moderate
263 congestion, perivascular edema, focal necrosis area and activation of glial cells; and in
264 another animal, goat 54, spongiosis lesions was observed. Microscopically, the placentas
265 with lesions classified by consistent (3/10) showed: submucosal layer and villi with focal
266 areas of necrosis; decrease in the number of trophoblasts; infiltrate of inflammatory
267 mononuclear cells, and areas of the cubic epithelium with vacuolized cells. Two placentas
268 (2/10) classified by characteristic lesion of neosporosis showed areas with calcification
269 necrosis. Tissue samples that were observed lesions such as congestion, presence of
270 inflammatory cells or areas of haemorrhage were classified as non-specific of
271 neosporosis. The uterine lymph nodes analyzed presented no significant histological
272 lesions.

273 Histological lesions classified by consistent were observed in the brains of three
274 (3/14) kids of the first gestation (identification 55F2, 58F, 62F3) testing as positive by
275 nested PCR. In that samples moderate congestion, perivascular edema, spongiosis,
276 neuronal necrosis and infiltration of inflammatory mononuclear cells were observed.

277 Histological alterations were not detected in any sample of the animals and
278 offspring from negative controls.

279

280 **DISCUSSION**

281 Goat and sheep production is an economic activity developed in almost all regions
282 of the world, demonstrating the diversity of these species and their potential to convert
283 dry matter into a source of proteins destined for food and other products (CSCO, 2006).
284 The productivity of goats and sheep is directly influenced by the reproductive
285 performance of these species, in order to effectively increase the coverage in the flock with
286 a greater number of conceptions per year. Thus, abortion and neonatal mortality are the
287 main causes of economic losses in this livestock sector.

288 At the present moment, this is the first study to use goats as a recrudescence model
289 for neosporosis, to increase data about experimental neosporosis in ruminants.

290 The *Neospora caninum* Nc-Spain7 strain (Regidor-Cerrillo et al. 2008) was
291 chosen to perform the experimental inoculation because it has a marked virulence
292 previously described in mouse (Regidor-Cerrillo et al., 2010), cattle (Caspé et al., 2012;
293 Regidor-Cerrillo et al., 2014), sheep (Arranz-Solis et al., 2015) and goat (Porto et al.,
294 2016), involves transplacental transmission and may cause fetal death. Intravenous
295 inoculation was adopted to facilitate the infection and to simulate the same parasitemia
296 that occurs in natural infections (Williams et al., 2000). The high dose (10^7 tachyzoites)
297 follows what is recommended for experimental models in cattle. This dose is able to
298 establish a chronic infection as recorded by Buxton et al. (2001).

299 There was an increase in corporal temperature values ($<39.5^{\circ}\text{C}$) four days post-
300 inoculation (d.p.i) with the fever peak occurring about six d.p.i in inoculated group,
301 according with other studies which used the same strain in experimental models in cattle
302 (Regidor-Cerrillo et al., 2014), sheep (Arranz-solis et al., 2015) and goat (Porto et al.,
303 2016). One of the goats from inoculated group showed a biphasic response with two
304 fevers peak in non-consecutive days, similar to other findings described in experimental
305 models in cattle (Buxton et al., 1998; Malley et al., 2003; Caspé et al., 2012).

306 Significant increase in antibodies concentration starting at 14 d.p.i with peaks at
307 21 and 28 d.p.i, was a signal of seroconversion, also observed by others studies in
308 different species (Innes et al., 2001; Williams et al., 2003; Rojo-Montejo et al., 2009). In
309 experimental infections using Nc-Spain 7 isolate, an early seroconversion in cattle has
310 been observed, with a marked increase of antibodies starting at ten days post-inoculation
311 and reaching peak at 20 d.p.i. (Regidor-Cerrillo et al., 2014). Molecular detection of
312 parasite DNA in goat tissues and maintenance of specific antibody titers during the
313 gestation suggest an establishment of a persistent infection in inoculated animals.
314 Antibody titers reached a plateau that was maintained throughout the experiment and IgG

315 levels were not returned to basal levels. Buxton et al (1993) inoculated sheep with
316 *T.gondii*, a parasite closely related to *N.caninum*, and observed maintenance of antibody
317 titers over time. The same condition not occurred in sheep inoculated with an incomplete
318 strain of *T.gondii*, resulting in a decrease of antibody titers from 30 d.p.i, with titers
319 similar to negative control animals. These data suggest that the strain used may affect the
320 maintenance of immunological response. In addition, Rojo-Montejo et al (2013) reported
321 a decline of antibody titers in cattle inoculated with viable tachyzoites of Nc-Spain 1H,
322 with antibody values close to negative control group.

323 Abortion in cows infected by *N.caninum* is more common when there is a
324 substantial increase in antibody levels in the middle third of pregnancy than in the final
325 third (Guy et al., 2001). The abortion is associated with changes in progesterone levels
326 (P4). Cell-mediated immunity show peaks of specific antibodies against *N.caninum* in
327 early and late phases of pregnancy, moments when P4 levels are lower. Progesterone has
328 been appointed as a bias in response modulation of Th2 cells, with significant reduction
329 of IFN- γ production in the middle third of pregnancy when compared to progesterone
330 values obtained in final and first third of pregnancy (Innes et al., 2001). IFN- γ is a
331 cytokyne responsible to prevent tachyzoites multiplication, and is considered a factor
332 involved in appearance of recrudescence, and parasitemia in animals with chronic
333 infection. Recrudescence caused by *T.gondii* infection was observed in mouse and have
334 been described in HIV-infected patients, as a consequence of debility in T cell response
335 and production of IFN- γ (Luft et al., 1984; Suzuki et al., 1989; Innes et al., 2002).

336 In the present study any increase of IgG production was not detected, with a
337 decline in values after the peak relative to the seroconversion, and no abortion cases. The
338 analysis of IgG levels show a modest increase in antibody titers about 83 d.p.i, but it was
339 not significant to justify a disease reactivation in the goats. There was a close relation
340 between the medium period of mating of goats inoculated and the increase of specific
341 antibody values detected by serology. This would be related to the increase in P4
342 production, and according to Charallah et al (2010), significant measurement of P4 may
343 be obtained three weeks after the mating, and reaching peak during the fourth week.

344 In three studies using a bovine model of neosporosis (Williams et al, 2000; Innes
345 et al, 2001; Williams et al., 2007), there was no evidences of vertical transmission of
346 *N.caninum* in calves from cows inoculated with viable tachyzoites prior to mating. In
347 contrast, other studies have reported abortion cases and presence of the parasite in
348 inoculated cattle (Hecker et al, 2013; Weber et al., 2013). Jolley et al. (1999) showed that

349 congenital infection in fetuses of sheep chronically infected with *N. caninum* produced
350 abortion, similar to findings previously reported in bovine infection. Nonetheless, Buxton
351 et al (2001), have demonstrated that recrudescence in sheep followed by parasitemia
352 occurs with low frequency when compared to studies with bovine model, even those using
353 subsequent inoculations in animals sensitized. Syed-Hussain et al. (2015) have showed
354 that sheep inoculated two months prior to mating, not exhibited evidences of vertical
355 transmission in first year, but highlighted that some lambs born in following year were
356 congenitally infected, showing the vertical transmission. A similar pattern was already
357 reported in cases of toxoplasmosis in ovine and caprine: after the primo-infection during
358 the pregnancy, an immunological response is produced, with an uncommon incidence of
359 recrudescence. The hypothesis would be the existence of a better control of infection due
360 a specific immunological mechanism in these two species when compared to bovine
361 (Buxton et al., 2002).

362 The strain used in this study, Nc-Spain 7, with a marked virulence in murine
363 model, and the high dose of parasites may have contributed to infection. Our results are
364 different those described in sheep and cattle. There was no disease reactivation in
365 pregnant goats, but birth of weak lambs was observed, and *N. caninum* DNA was found
366 in tissue samples analyzed (brain, liver, skeletal muscles).

367 There were few histopathological lesions consistent with the parasite, suggesting
368 low parasitic load, supported by PCR results. These data confirm transplacental
369 transmission, but no efficient, and a frail uterine infection, unable to stimulate an immune
370 response in lambs, evidenced by absence of specific antibodies in precolostral serum
371 samples. No alterations were observed in negative control group.

372 Four inoculated females and their respectively kids are alive, in order to try to
373 clarify the persistence and infection reactivation in subsequent gestations.

374

375 **CONCLUSIONS**

376 In the process of investigating new models of experimental infections of
377 neosporosis in an attempt to mimic what really happens in natural infection, we have
378 added new data to study the pathogenesis of the disease using the goats, where data
379 regarding the disease in this species are scarce. The vertical transmission of *N. caninum*
380 was attested by PCR technique. It becomes necessary to continue studies in order to
381 elucidate the influence of the isolate (virulence) in the immune balance of the host,

382 determining the prevalence of infection in subsequent pregnancies and real importance of
383 vertical transmission for maintenance of infection in a herd.

384

385 **ACKNOWLEDGEMENTS**

386 The authors acknowledge CNPq (National Council for Scientific and
387 Technological Development) for financial support (Process 400405/2012-1).
388 Support from CYTED (Iberoamerican science and technology programme for
389 development) (113RT0469) and CAPES (Brazilian Federal Agency for Support
390 and Evaluation of Graduate Education) (PHBP14/00081) is also gratefully
391 acknowledged.

392

393 **REFERENCES**

394 Álvarez-García, G., Collantes-Fernández, E., Costas, E., Rebordosa, X. and Ortega-Mora,
395 L. M. Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological
396 methods in bovine neosporosis. *Vet. Res.*, v.34, p.341–352, 2003.

397 Anderson, M. L., Plamer, C. W., Thurmond, M. C., Picanso, J. P., Blanchard, P. C.,
398 Breitmeyer, R. E., et al. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in
399 selected dairy herds in California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.207, n.9, p.1206-1210, 1997.

400 Arranz-Solis, D., Benavides, J., Regidor-Cerrillo, J., Furtes, M., Ferre, I., et al. Influence
401 of the gestational stage on the clinical course, lesional development and parasite
402 distribution in experimental ovine neosporosis. *BMC Vet. Res.*, v.46, n.19, 2015. Doi:
403 10.1186/s13567-014-0139-y

404 Barr, B. C., Anderson, M. L., Woods, L. W., Dubey, J. P. and Conrad, P. A. *Neospora*-
405 like protozoal infections associated with abortion in goats. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.4,
406 p.365-367, 1992.

407 Basso, W., Venturini, L., Venturini, M. C., Hill, D. E. et al. First isolation of *Neospora*
408 *caninum* from the feces of a naturally infected dog. *J. Parasitol.*, v.87, p.612–618, 2001.

409 Bjorkman, C., Johansson, O., Stenlund, S., Joakim, O. and Uggla, A. *Neospora* species
410 infection in a herd of dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.208, p.1441-1444, 1996.

411 Buxton, D., Thomson, K. M., Maley, S., Wright, S. and Bos, H. J. Experimental challenge
412 of sheep 18 months after vaccination with a live *Toxoplasma gondii* vaccine. *Vet. Rec.*,
413 v.133, p.310-312, 1993.

414 Buxton, D., Maley, S. W., Wright, S., Thomson, K. M., et al. The Pathogenesis of
415 Experimental Neosporosis in Pregnant Sheep. *J. Comp. Path.*, v.118, p.267-279, 1998.

416 Buxton, D., Right, S. W., Maley, S. W., Rae, A. G., et al. Immunity to experimental
417 neosporosis in pregnant sheep. *Parasite Immunol.*, v.23, p.85-91, 2001.

418 Buxton, D., McAllister, M. M. and Dubey, J. P. The comparative pathogenesis of
419 neosporosis. *Trends Parasitol.*, v.18, n.12, p.546-552, 2002.

420 Caspe, S. G., Moore, D. P., Leunda, M. R., Cano, D. B., et al. The *Neospora caninum*-
421 Spain 7 isolate induces placental damages, fetal death and abortion in cattle when
422 inoculated in early gestation. *Vet. Parasitol.*, v.189, p.171-181, 2012.

423 Charallah, S., Amirat, Z., Sulon, J., Khammar, F. and Beckers, J. F. *Reprod. Dom. Anim.*,
424 v.45, p.231-238, 2010. Doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01511.x

425 Corbellini, L. G., Colodel, E. M. and Driemeier, D. Granulomatous encephalitis in a
426 neurologically impaired goat kid associated with degeneration of *Neospora caninum*
427 tissue cysts. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.13, p.416-419, 2001.

428 CSCO - Câmara Setorial da Cadeia Produtiva de Caprinos e Ovinos. In: Vilela, D. Araújo,
429 P. M. M. Contribuições das câmaras setoriais e temáticas à formulação de políticas
430 públicas e privadas para o agronegócio (in Portuguese). Brasília: MAPA/SE/CGAC,
431 p.248- 263, 2006.

432 Dubey, J. P., Morales, J. A., Villalobos, P., Lindsay, D. S., et al. Neosporosis-associated
433 abortion in a dairy goat. *J. Am.Vet. Med. Assoc.*, v.208, p.263 265, 1996.

434 Dubey, J. P., Buxton, D. and Wouda, W. Pathogenesis of Bovine Neosporosis. *J. Comp.*
435 *Path.*, v.134, p.267-289, 2006.

436 Dubey, J. P., Jenkins, M. C., Rajendran, C., Miska, K., et al. Gray wolf (*Canis lupus*) is
437 a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.*, v.181, p.382-387, 2011.

438 Eleni, C., Crotti, S., Manuali, E., Costarelli, S., et al. Detection of *Neospora caninum* in
439 an aborted goat foetus. *Vet. Parasitol.*, v.2, n.123, p.271-274, 2004.

440 Gondim, L. F. P., McAllister, M. M., Pitt, W. C. and Zemlicka, D. E. Coyotes (*Canis*
441 *latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *J. Parasitol.*, v.34, p.159-161, 2004.

442 Guy, C. S., Williams, D. J. L., Kelly, D. F., McGarry, J. W., et al. *Neospora caninum* in
443 persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated
444 with an acute increase in maternal antibody. *Vet. Rec.*, v.149, p.443-449, 2001.

445 Hecker, Y. P., Moore, D. P., Quattrocchi, V., Regidor-Cerrillo, J., et al. Immune response
446 and protection provided by live tachyzoites and native antigens from NC-6 Argentina
447 strain of *Neospora caninum* in pregnant heifers. *Vet. Parasitol.*, v.197, p.436-446, 2013.

448 Hurtado, A., Aduriz, G., Moreno, B., Barandika, J., García-Pérez, A. L. Single tube nested
449 PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes.
450 *Vet Parasitol.*, v.102, p.17-27, 2001.

451 Innes, E. I., Wright, S. E., Maley, S., Rae, A., et al. Protection against vertical
452 transmission in bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.*, v.31, p.1523-1534, 2001.

453 Innes, E. A., Andrianarivo, A. G., Bjorkman, C., Williams, D. J. L. and Conrad, P. A.
454 Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol.*,
455 v.18, n.11, p.497-504, 2002.

456 Jolley, W. R., McAllister, M. M., McGuire, A. M. and Wills, R. A. Repetitive abortion
457 in *Neospora*-infected ewes. *Vet. Parasitol.*, v.82, p.251-257, 1999.

458 King, J. S., Slapeta, J., Jenkins, D. J., Al-Qassab, S. E. et al. Australian dingoes are
459 definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, v.40, p.945-950, 2010.

460 Lindsay, D. S., Rippey, N. S., Powe, T. A., Sartin, E. A., et al. Abortions, fetal death, and
461 stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*.
462 *Am. J. Vet. Res.*, v.56, n.9, p.1176-1180, 1995.

463 Luft, B. J., Kansas, G., Engleman, E. G. and Remington, J. S. Functional and quantitative
464 alterations in T lymphocyte subpopulation in acute toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.*, v.150,
465 n.5, p.761-767, 1989.

466 Luna, L. G. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of
467 Pathology. 3. ed. New York: McGraw-Hill, 1968, p.258.

468 Malley, S. W., Buxton, D., Rae, A. G., Wright, S. E., et al. The Pathogenesis of
469 Neosporosis in Pregnant Cattle: Inoculation at Mid-gestation. *J. Comp. Path.*, v.129,
470 p.186-195, 2003.

471 McAllister, M.M., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Jolley, W.R., Wills, R.A. and McGuire,
472 A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, v.28, p.1473-
473 1478, 1998.

474 Mesquita, L. P., Nogueira, C. I., Costa, R. C., Orlando, D. R., et al. Antibody kinetics in
475 goats and conceptuses naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.*, v.196,
476 p.327-333, 2013.

477 Piergili-Fioretta, P. D., Pasquali, P., Diaferia, M., Mangili, V. and Rosignoli, L. *Neospora*
478 *caninum* Infection and Congenital Transmission: Serological and Parasitological Study
479 of Cows up to the Fourth Gestation. *J. Vet. Med.*, v.50, p.399-404, 2003.

480 Porto, W. J. N., Regidor-Cerrillo, J., KIM, P. C. P., Benavides, J. et al. Experimental
481 caprine neosporosis: the influence of gestational stage on the outcome of infection. *Vet.*
482 *Res.*, v.47, n.29, 2016. Doi: 10.1186/s13567-016-0312-6

483 Regidor-Cerrillo, J., Gómez-Bautista, M., Pereira-Bueno, J., Aduriz, G., et al. Isolation
484 and genetic characterization of *Neospora caninum* from asymptomatic calves in Spain.
485 *Parasitology*, v.135, p.1651-1659, 2008.

486 Regidor-Cerrillo, J., Gómez-Bautista, M., Del Pozo, I., Jiménez-Ruiz, E., et al. Influence
487 of *Neospora caninum* intra-specific variability in the outcome of infection in a pregnant
488 BALB/c mouse model. *Vet. Res.*, v.41, n.52, 2010. Doi: 10.1051/vetres/2010024

489 Regidor-Cerrilho, J., Arranz-Solís, D., Benavides, J., Gómez-Bautista, M., et al.
490 *Neospora caninum* infection during early pregnancy in cattle: how the isolate influences
491 infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses. *BMC*
492 *Vet. Res.*, v.45, v.10, 2014.

493 Rojo-Montejo, S., Collantes-Fernández, E., Blanco-Murcia, J., Rodríguez-Bertos, A., et
494 al. Experimental infection with a low virulence isolate of *Neospora caninum* at 70 days
495 gestation in cattle did not result in foetopathy. *Vet. Res.*, v.40, n.49, 2009. Doi:
496 10.1051/vetres/2009032

497 Rojo-Montejo, S., Collantes-Fernández, E. Pérez-Zaballos, F., Rodríguez-Marcos, S., et
498 al. Effect of vaccination of cattle with the low virulence Nc-Spain 1H isolate of *Neospora*
499 *caninum* against a heterologous challenge in early and mid-gestation. *BMC Vet. Res.*,
500 v.44, n.106, 2013.

501 Suzuki, Y., Conley, F. K., Remington, J. S. Importance of endogenous IFN-gama for
502 prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. *J. Immunol.*, v.15, n.143, p.2045-2050,
503 1989.

504 Syed-Hussain, S. S., Howe, L., Pomroy, W. E., West, D. M., et al. Vertical transmission
505 in experimentally infected sheep despite previous inoculation with *Neospora caninum*
506 NcNZ1 isolate. *Vet. Parasitol.*, v.208, p.150-158, 2015.

507 Tress, A. J., Davison, H. C., Innes, E. A. and Wastling, J. M. Towards evaluating the
508 economic impact of bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.*, v.29, p.1195-1200, 1999.

509 Tress, A. J., and Williams, D. J. L., 2005. Endogenous and exogenous transplacental
510 infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol.*, v.21, n.12,
511 p.558-561.

512 Weber, F. H., Jackson, J. A., Sobecki, B., Choromanski, L., et al. On the Efficacy and
513 Safety of Vaccination with Live Tachyzoites of *Neospora caninum* for Prevention of

514 *Neospora*-Associated Fetal Loss in Cattle. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.20, n.1, p.99-105,
515 2013.

516 Williams, D. J. L., Guy, C. S., McGarry, J. W., Tasker, L., et al. *Neospora caninum*-
517 associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitemia during
518 gestation determines foetal survival. *Parasitology*, v.121, p.347-358, 2000.

519 Williams, D. J. L., Guy, C. S., Smith, R. F., Guy, F., et al. First demonstration of
520 protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection.
521 *Int. J. Parasitol.*, v.33, p.1059-1065, 2003.

522 Williams, D. J. L., Guy, C. S., Smith, R. F., Ellis, J., Bjorkman, C., et al. Immunization
523 of Cattle with Live Tachyzoites of *Neospora caninum* Confers Protection against Fetal
524 Death. *Infect. Immun.*, v.75, n.3, p.1343-1348, 2007. doi:1.1128/IAI.00777-06

Table 1. Mating and gestation data; parasite DNA detection and histopathological changes in kids and maternal tissues of goats inoculated with 10⁷ tachyzoites of *Neospora caninum* Nc-Spain 7 isolate prior mating

Inoculated Group Animal ID	1 st Effective Mating (d. p. i.)	Delivery		2 nd Effective Mating (d. p. i.)	Delivery		Maternal tissues				Offspring ID	Offspring tissues									
		d. p. i.	Gestation time (days)		d. p. i.	Gestation time (days)	Brain		Placentome			Uterine lymph node		Brain		Liver		Skeletal muscle			
							PCR ^a	HP ^b	PCR	HP		PCR	HP	PCR	HP	PCR	HP	PCR	HP		
55	79	210	131	Euthanized			0/3	-	1/3	*	0/3	-	55F1	0/3	-	0/3	-	1/3	-		
															55F2	1/3	*	0/3	-	1/3	-
58	68	211	143	Euthanized			2/3	-	2/3	*	0/3	-	58F	1/3	*	1/3	-	1/3	-		
59	67	206	139	Euthanized			0/3	*	0/3	-	0/3	-	59F ^{††}	0/3	*	0/3	-	0/3	-		
60	67	212	145	Euthanized			2/3	-	0/3	**	2/2	-	60F	0/3	-	0/3	-	0/3	-		
62	84	225	141	Euthanized			1/3	*	1/3	*	1/3	-	62F1	0/3	*	1/3	-	0/3	-		
															62F2	0/3	*	1/3	-	0/3	-
															62F3 [†]	1/3	*	0/3	-	1/3	-
61 [*]	435	583	148	No detected			NA	NA	0/3	-	NA	-	61F	0/3	NA	0/3	NA	0/3	NA		
54	65	208	144	565	710	145	0/3	*	0/3	**	0/3	-	54F [*]	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
															005F	0/3	-	0/3	-	0/3	-
56	107	223	142	562	710	149	0/3	-	1/3	-	0/3	-	56F [*]	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
															56F1B	0/3	-	0/3	-	0/3	-
															56F2B	0/3	-	0/3	-	0/3	-
57	65	211	146	566	715	149	0/3	-	0/3	-	0/3	-	57F [*]	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
															57FB	0/3	-	0/3	-	0/3	-
63	104	251	148	567	715	148	0/3	-	0/3	-	0/3	-	63F [*]	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
															63FB	0/3	-	0/3	-	0/3	-

Days post-inoculation (d.p.i.); • Animal kept alive; † stillborn; †† died shortly after birth; a. Fractions represent number of samples positive by nested PCR/number of samples examined. b. Histopathological lesion severity: Not available for analysis (NA), undetected/non-specific (-), consistent (*), and characteristic of *N. caninum* infection (**).

CAPÍTULO 2

Evaluation of the serological response and agreement between three diagnostic techniques of neosporosis in goats

Artigo submetido ao periódico Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

ISSN 0103-846X

(Qualis A2 – Área de avaliação: Medicina Veterinária)

1 **Serological response to *Neospora caninum* infection in goats and agreement**
2 **between three diagnostic techniques to detect caprine neosporosis**

3 Resposta sorológica à infecção por *Neospora caninum* em cabras e concordância entre
4 três técnicas diagnósticas para detecção de neosporose caprina

5
6 **Abstract**

7 The present study aimed to measure the serological response of goats infected with *N.*
8 *caninum* by assessing the diagnostic performance and agreement between three
9 techniques (IFAT - Indirect Immunofluorescent Antibody Test, NAT – Neospora
10 Agglutination Test, and ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). The panel of
11 sera were comprised of 500 samples of goats, and 60 reference serum samples. These
12 reference and field serum samples were tested by ELISA, NAT, and IFAT. In the field
13 serum samples tested, the seroprevalences of anti-*N. caninum* antibodies were: 3.2%,
14 4.6%, and 6.4% in the NAT, IFAT and ELISA, respectively. Using the IFAT as the gold
15 standard, the NAT and the ELISA were considered weak ($k=0.28$) and strong ($k=0.75$),
16 respectively. When the IFAT performance was used for comparison purposes, the ELISA
17 showed 91.3% sensitivity and 97.7%, specificity with a PPV of 65.2% and a NPV of
18 99.6%; The NAT presented sensitivity of 26.1% and specificity of 97.9% with a PPV of
19 37.5% and a NPV of 96.5%. Accordingly, the IFAT should remains the assay of choice
20 for studies about *N. caninum* infection in goats in individual serum samples. A
21 combination of serological assays with high sensitivity and specificity is recommended
22 in serosurveys of caprine neosporosis.

23
24 **Keywords:** caprine neosporosis, serological screening tests, goat, *Neospora caninum*

25
26 **Resumo**

27 Objetivou-se avaliar a resposta sorológica de caprinos infectados com *N. caninum*
28 mediante o estudo da performance e concordância de três técnicas sorológicas (RIFI,
29 NAT e ELISA). O painel de soros testes foi composto por 500 amostras de caprinos e
30 ainda 60 soros classificados como de referência. Todos os soros de referência e de campo

31 foram testados por ELISA, NAT e RIFI. Nos soros de campo, as soroprevalências de
32 anticorpos anti-*N. caninum* foram de: 3,2% no NAT, 4,6% na RIFI e 6,4% no ELISA.
33 Utilizando a RIFI como técnica de referência: NAT e ELISA foram considerados fraco
34 ($kappa = 0,28$) e substancial ($kappa = 0,75$), respectivamente. Ainda utilizando a RIFI
35 como comparação, foram obtidos valores de sensibilidade de 91,3% e 97,7% de
36 especificidade no ELISA, e valores preditivos positivo de 65,2% e negativo de 99,6%;
37 NAT apresentou resultados de sensibilidade de 26,1% e de especificidade de 97,9% com
38 valores preditivos positivo de 37,5% e negativo de 96,5%. Com base nos resultados deste
39 trabalho, sugerimos que a RIFI permaneça como técnica de escolha no estudo da
40 neosporose caprina em amostras individuais, resguardando as recomendações e pontos de
41 corte adotados neste estudo. Indicamos a associação de técnicas sorológicas de alta
42 sensibilidade e especificidade.

43

44 **Palavras-chaves:** Neosporose caprina; testes de triagem sorológica; cabra; *Neospora*
45 *caninum*

46

47 **Introduction**

48 *Neospora caninum* is an obligate intracellular coccidian parasite that belongs to the
49 phylum Apicomplexa and is considered an important cause of abortion in cattle around
50 the globe (DUBEY et al., 2007). This protozoal organism has a complex heteroxenous
51 life cycle in which the domestic dog and other canids act as definitive hosts and a number
52 of ungulates play a role as intermediate hosts in the transmission of the disease agent
53 (DUBEY & SCHARES, 2011).

54 In non-pregnant animals, neosporosis is usually a latent asymptomatic infection
55 (BUXTON et al., 2002). Persistent infection throughout life is an important feature of
56 bovine neosporosis. *N. caninum* can be transmitted vertically from the dam to the fetus in
57 successive pregnancies resulting in repeated abortions and unthrifty, weak calves at birth.
58 Congenitally infected animals transmit the protozoan parasite to their offspring in the next
59 generation (WILLIAMS et al., 2000, BUXTON et al., 2002). Over the years, neosporosis
60 have been extensively studied in cows as the bovine is the most important farm animal
61 species in economic terms (REICHEL et al., 2013), Cases of neosporosis in small
62 ruminants have also been reported worldwide, and studies on the transplacental

63 transmission of *N. caninum* have been conducted by numerous researchers (DUBEY &
64 SCHARES, 2011; VARASCHIN et al., 2012; MORENO et al., 2012; NUNES et al.,
65 2017).

66 The occurrence of reproductive disorders in goats that are seropositive for *N. caninum*
67 suggest that neosporosis is a significant cause of abortion and neonatal deaths in caprine
68 herds (MORENO et al., 2012). *N. caninum* congenital transmission rates in goats may be
69 as high as those reported for cattle. The prevalence of congenitally infected offspring is
70 similarly high (MESQUITA et al., 2013).

71 Neosporosis should be included in the differential diagnosis of endemic or epidemic
72 abortions along with other toxic and infectious causes of abortion that commonly affect
73 farm animals (McALLISTER et al., 2016). Diagnosis of abortion due to *N. caninum*
74 infection in production animals is based on the clinical history and epidemiological data
75 of the affected herd, serological screening of female animals, and a comprehensive
76 diagnostic workup on aborted fetuses including necropsy, histopathology, and serology
77 of fetal fluids (ORTEGA-MORA et al., 2006). The definitive diagnosis of abortion due
78 to *N. caninum* can be tricky and relatively expensive. Asymptomatic *N. caninum*
79 congenital infections are common. The presence of the pathogen DNA in tissues of
80 aborted fetuses does not necessarily mean that this protozoan parasite was the cause of
81 the abortion (DUBEY & SCHARES, 2011).

82 A number of serological assays which include commercially available kits have been
83 used to detect specific anti-*N. caninum* antibodies in cattle. These ancillary tests are used
84 primarily to distinguish between infected animals and non-infected ones. Each of these
85 diagnostic tools has its particular features and pros and cons (BLUMRODER et al., 2004,
86 AGUADO-MARTINEZ et al., 2008, ÁLVAREZ-GARCÍA et al., 2013). The Indirect
87 fluorescent antibody test (IFAT) is routinely used for the detection of specific IgM and
88 IgG in serum samples. This assay was further optimized for the use in sera from small
89 ruminants and other animal species (BUXTON et al., 1998). Other techniques that have
90 also been used in serological surveys of antibodies to *N. caninum* in large animals include
91 the Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) using recombinant antigens or intact
92 tachyzoites, Immunoblotting (IB) (an immunoprotein technique), and the *Neospora*
93 Agglutination Test (NAT). These assays should be carefully chosen according to the
94 needs of the researcher and diagnostician (ORTEGA-MORA, et al., 2006; AGUADO-
95 MARTÍNEZ et al., 2008; GUIDO et al., 2016).

96 The evaluation of the degree of concordance (agreement) between tests to detect *N.*
97 *caninum* infection and the comparative assessment of the performance of different assays
98 used for the detection of *N. caninum* infections can be challenging, especially because a
99 gold standard technique for the serological diagnosis of neosporosis is lacking
100 (ORTEGA-MORA et al., 2007; GUIDO et al., 2016).

101 The aim of the present study was to evaluate the serological response of goats to *N.*
102 *caninum* by assessing the performance and agreement between three different serological
103 techniques used to detect specific IgG antibodies against *N. caninum* in serum samples of
104 naturally and experimentally infected animals.

105

106 **Material and Methods**

107

108 *Panel of sera and experimental design*

109 The present survey consisted of a panel of serum samples for testing and a panel of
110 reference (control) sera. Sample selection criteria used in this study were those available
111 in the section about analytical and diagnostic performance characteristics of laboratory
112 tests published in the OIE Guideline “Principles and Methods of Validation of Diagnosis
113 Assays for Infectious Diseases” (OIE, 2013). A total of 560 caprine serum samples were
114 analysed. Serum samples were divided into two categories: reference sera (positive
115 controls and negative controls), and samples from naturally infected animals raised for
116 subsistence in extensive goat farms (sera for testing). *N. caninum* serostatus of these
117 caprine herds was unknown.

118 In our study, the panel of sera for testing was composed of 500 samples from goats of
119 both genders between 1 and 3 years of age, of different breeds, raised on rural premises
120 located in the Sertão sub-region, State of Pernambuco, northeast of Brazil. These farms
121 were selected according to the ease of access. Sampling was approved by the Ethics
122 Committee on the Use of Animals in Research from the Federal University of Alagoas
123 (UFAL), Maceió, State of Alagoas, northeast Brazil, scientific research permit 78/2017.

124 A total of 60 reference sera were divided as follows: 30 serum samples positive for *N.*
125 *caninum*, and 30 serum samples negative for *N. caninum*. These sera were originally
126 collected during a experimental *N. caninum* inoculation study previously published by

127 Porto et al. (2016). Negative samples were collected from goats serologically negative for
128 *N. caninum*, *Toxoplasma gondii*, Caprine Arthritis Encephalitis virus (CAEV), and
129 *Coxiella burnetii*. These animals had no clinical history of reproductive problems, and
130 did not seroconvert for neosporosis in three consecutive tests. Serum samples were tested
131 by IFAT and ELISA at intervals of 30 days.

132 All data regarding the maintenance of *N. caninum* strains in the laboratory, selection
133 of animals for this study, inoculation dose, sampling, and analysis of the immunological
134 dynamics associated with *N. caninum* infection were previously published by Porto et al.
135 (2016).

136

137 *Serological tests (IFAT, ELISA, and NAT)*

138

139 Antigen preparation and antigen production

140 The *N. caninum* Nc-Spain 7 isolate used in this study was maintained in a monolayer
141 culture of Marc-145 cells under specific standardized laboratory conditions previously
142 used in research conducted by Regidor-Cerrillo et al. (2008). Tachyzoites were stained
143 with Tripan blue and resuspended in sterile PBS 1X (pH 7.4). The number of viable
144 tachyzoites was determined with a Neubauer counting chamber. The protocol published
145 by Álvarez-García et al. (2003) was followed for the preparation and production of the
146 finished antigen that was used in the three serological techniques that were assessed in
147 the present study (i.e., IFAT, ELISA, and NAT). Initially, the 30 positive serum samples
148 and 30 negative serum samples from goats (reference sera) were tested with each of the
149 three techniques (IFAT, ELISA, and NAT) in order to validate the methods used in this
150 study.

151

152 Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT)

153 In the present study, the IFAT was used as a reference technique (gold standard) to
154 detect anti-*N. caninum* IgG antibodies in goat sera. The IFAT was performed according
155 to the guidelines provided by Porto et al. (2016). The protocol established by Álvarez-
156 García et al. (2003) was followed with some minor modifications. In summary, 10µl of

157 the *N. caninum* tachyzoite suspension in formalin solution at a concentration of 10^7
158 tachyzoites/mL was inoculated into each slide well and then dried at room temperature.
159 Slides were immersed for 10 min in acetone at -20°C in order to finish antigen fixation.
160 A cut-off point of 1:50 was used with dilutions of caprine sera in 1X PBS (pH 7.2).
161 Diluted sera were inoculated into each slide well, incubated at 37°C for 30 min, and
162 washed twice in 1X PBS for 10 min. Anti-goat IgG solution conjugated with fluorescein
163 isothiocyanate was added to a 1:400 dilution in 0.002% Evans Blue (Sigma-Aldrich
164 Corp., St Louis, MO, USA) and then incubated at 37°C for 30 min, followed by 2 washes
165 with 1X PBS and 1 final wash with distilled water. After drying, slides were coverslipped
166 using glycerin solution and visualized under a fluorescence microscope. Positive controls
167 and negative controls were included in all the slides examined. Samples were considered
168 positive when total peripheral fluorescence was detected in more than 50% of the
169 tachyzoites in different fields of each well. Samples in which tachyzoites did not
170 fluorescence or that tachyzoites displayed irregular fluorescence were interpreted as
171 negative.

172

173 In-house ELISA

174 Levels of anti-*N. caninum* specific IgG antibodies were measured by an in-house
175 ELISA technique developed by Gonzalez-Warlerta et al. (2014) and modified for this
176 study by the use of lyophilized antigen of *N. caninum* in a concentration of 5×10^7
177 tachyzoites/mL. For such purpose, the antigen was used in a concentration of 10^5
178 tachyzoites per well diluted in a carbonate-bicarbonate buffer solution (0.1M, pH = 9.6).
179 A final volume of $100\mu\text{l}$ was inoculated into each well. Plates were incubated overnight
180 at 4°C . After the plates were sensitized, each well was blocked using $300\mu\text{l}$ of a bovine
181 serum albumin solution (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, USA) diluted 3% in 1X
182 phosphate buffer saline (pH=7.4) containing 0.05% Tween 20 (PBS-T). This step was
183 followed by a 2h incubation at room temperature. Plates were washed 3 times with PBS-
184 T. The sera used were diluted 1:100 in the blocking solution, adding $100\mu\text{l}$ of this dilution
185 into each corresponding plate well, and incubated for 1h at 37°C . The plates were washed
186 3 additional times with PBS-T; $100\mu\text{l}$ of G-Biotin Protein was added as the conjugate
187 (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, USA), diluted in 1:10000 PBS-T, and incubated for
188 1h at 37°C . The plates were then washed 3 times, and $100\mu\text{l}$ of ABTS Solution substrate
189 (Roche, Indianapolis, USA) was inoculated into these plates. The reaction was stopped

190 after 20 min at room temperature by adding 0.3M oxalic acid solution. ELISA plate
191 reading was performed on a spectrophotometer (Multiskan RC - Thermo Labsystems)
192 using 405nm wavelength (OD405). Optical density values were converted to percent
193 relative index (IRPC) using the following formula: $IRPC = (OD405 \text{ sample} - OD405$
194 $\text{negative control}) / (OD405 \text{ positive control} - OD405 \text{ negative control}) \times 100$. A IRPC
195 value ≥ 10 meant a positive result. Duplicate serum sets consisting of positive and
196 negative controls for *N. caninum* were used for the validation of the reactions.

197

198 *Neospora* Agglutination Test (NAT)

199 The NAT assay was used according to the guidelines provided by Romand et al.
200 (1998) with some modifications. In the present study, an antigen from *N. caninum* isolate
201 Nc-Spain 7 was used. The initial dilution of sera used was 1:25 and the final dilution was
202 1:50 (cut-off point); 96-well plates were used. These NAT plates had a U-shaped
203 background. Results were interpreted as follows: samples were considered negative if a
204 compact dot or button was formed at the bottom of the microplate well, filling more than
205 50% of this well. Samples were considered positive if an opaque mesh (web) was formed
206 in at least 50% of the microplate well. Positive controls and negative controls were added
207 to all microplates.

208

209 Data analyses

210 In order to compare the three serological assays performed in the present study, the
211 IFAT was defined as the reference test (gold standard). The following parameters were
212 calculated: Kappa coefficient (k), sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive
213 value (PPV), negative predictive value (NPV), and accuracy (ACU) (Cohen 1960; Gart
214 and Buck 1966). The k-values were interpreted according to the criteria established by
215 Landis & Koch (1977) as follows: <0, without agreement; 0.00 - 0.19, poor agreement;
216 0.20 - 0.39, weak agreement; 0.40 - 0.59, moderate agreement; 0.60 - 0.79, substantial
217 agreement; 0.80 - 1.00, almost perfect agreement.

218

219 **Results**

220

221 *Analysis of reference sera*

222 All reference sera (30 positive samples and 30 negative samples) showed 100% Se,
223 Sp, PPV, NPV, ACU, and k values equal to 1 in the ELISA and NAT, when compared to
224 the IFAT (reference technique/gold standard) (Table 1).

225

226 *Antibody search (survey) in field serum samples (seroprevalence)*

227 Seroprevalences of anti- IgG *N. caninum* antibodies in the three different serological
228 tests assessed in this study were: 3.2% (16/500) in the NAT, 4.6% (23/500) in the IFAT,
229 and 6.4% (32/500) in the ELISA. The highest prevalence was estimated in the ELISA
230 with a cut-off point at 1:100 whereas the lowest prevalence was estimated in the NAT
231 with a cut-off point at 1:50.

232

233 *Results of agreement (concordance) between serological tests*

234 The results of the agreement between the three serological tests assessed in the present
235 study and the values of Se, Sp, PPV, NVP, and ACU associated with the detection of anti-
236 *N. caninum* IgG antibodies for the 500 serum samples tested are provided in Table 2. The
237 concordance between the NAT and the ELISA when compared to the IFAT was
238 considered weak and substantial, respectively, with kappa (k) coefficients of 0.28 for the
239 NAT and 0.75 for the ELISA. When the ELISA technique was compared with the IFAT,
240 the values of 91.3% of sensitivity and 97.7% of specificity were found, with a positive
241 predictive value of 65.2% and a negative predictive value of 99.6%. The NAT, when
242 compared to the IFAT, showed a sensitivity of 26.1% and a specificity of 97.9% with a
243 positive predictive value of 37.5% and a negative predictive value of 96.5%.

244

245 **Discussion**

246 Experimental studies have shown that goats are susceptible to *N. caninum*. Abortion
247 occurs after pregnant does are inoculated with this protozoan parasite (LINDSAY et al.,
248 1995; PORTO et al., 2016). In some countries, reports of abortion and neonatal death in

249 naturally infected goats due *N. caninum* have been published (BARR et al., 1992; DUBEY
250 et al., 1996; CORBELLINI et al., 2001; ELENI et al., 2004; MORENO et al., 2012;
251 NUNES et al., 2017). Abortions occur most often in seropositive goats, and culling is
252 widely practised in eradication programs (ALTBUCH et al., 2012). Serodiagnosis is the
253 first step towards initiating any surveillance or control program for neosporosis in a goat
254 herd (GUIDO et al., 2016).

255 The diagnosis of *N. caninum* infection in production animals is usually based on
256 serology. Serological assays are important tools in clinical and epidemiological
257 investigations of this parasitic disease (ORTEGA-MORA et al., 2007). However, the
258 criteria used to interpret the results of these assays as positive or negative vary according
259 to the serological technique used and according to the diagnostician interpreting these
260 laboratory results (SILVA et al., 2007).

261 Serological surveys conducted around the globe have reported prevalences of
262 antibodies against *N. caninum* in goats ranging between 2 and 23% using the IFAT, the
263 ELISA and the NAT with different cut-off points (DUBEY & SCHARES, 2011). In the
264 present study, field samples were tested with the three techniques routinely used for the
265 detection of anti-*N. caninum* IgG antibodies, i.e. ELISA, NAT, and IFAT. We found a
266 higher seroprevalence of neosporosis in goats (6.4%) by using the ELISA assay. Our
267 findings corroborate those of previous studies about caprine neosporosis carried out by
268 Brazilian researchers in which low seroprevalences of *N. caninum* infection in goats were
269 found. In Northeastern Brazil, seroprevalences of caprine neosporosis vary between 2.9%
270 (ARRAES-SANTOS et al., 2016) and 3.3% (FARIA et al., 2007) in the IFAT assay with
271 a cut-off point of 1:50 and 15% in the IFAT assay with a cut-off point of 1:100 (UZÊDA
272 et al., 2007). Wide variation in the seroprevalence of caprine neosporosis have been
273 reported in the southeastern region of the country. In the State of São Paulo, southeast
274 Brazil, a seroprevalence of 2.7% of caprine neosporosis was reported in the IFAT assay
275 with a cut-off point of 1:50 (SANTOS et al., 2016) in contrast with a seroprevalence of
276 19.7% obtained by Modolo et al. (2008) and a seroprevalence of 17.23% found by Costa
277 et al. (2012) when using the NAT with a cut-off point of 1:25. These variations in
278 seropositivity may be due to a number of differences in each farm including herd
279 management, herd hygiene, presence of definitive hosts in the area, climate variations,
280 and environmental contamination (DUBEY & SCHARES, 2011).

281 The IFAT assay is frequently used in the serodiagnosis of *N. caninum* infection in
282 small ruminants (NAGULESWARAN et al., 2004). It has been the assay of choice for
283 the serological diagnosis of neosporosis in goats and sheep over the years mainly because
284 it was the first serological test developed for such purpose (DUBEY et al., 1988), and
285 also due to the fact that cross-reactivity with other coccidian parasites is low (DUBEY &
286 SCHARES, 2011). Therefore, we used the IFAT assay as a reference test (gold standard)
287 in our study in order to compare its diagnostic performance with the diagnostic
288 performance of other assays (NAT and ELISA). There is, however, some subjectivity in
289 interpreting results on NAT (LARSI et al., 2004). Sensitivity and specificity results of the
290 ELISA assay for field serum samples when compared with the results of the IFAT assay
291 were 91.3% sensitivity and 97.7% specificity. High background values in absorbance
292 reading and cross-reactivity between related parasites have been reported for the ELISA
293 assay depending on the method of antigen preparation (production) and polyclonal
294 antibody used in the assay (BJÖRKMAN et al., 1997). In the present study, since a
295 commercially available test and a species-specific antibody were both lacking in the
296 market, an in-house ELISA protocol using a G protein as the conjugate, which has an
297 affinity for both caprine and ovine immunoglobulins, was followed (PORTO et al., 2017).
298 Our findings show that the lyophilized tachyzoite-based ELISA is a highly sensitive assay
299 which is able to detect true negative serum samples with a negative predictive value of
300 99.6%. Antigens based on soluble extracts contain large amounts of molecules with
301 antigenic properties which are mainly intracellular. There are also the antigens from the
302 membrane surface of the parasite which are preferentially recognized by the IFAT assay
303 (LARSI et al., 2004; SILVA et al., 2007). However, in the case of *T. gondii*, the specificity
304 and sensitivity of a technique based on the recognition of intracellular antigens have been
305 challenged (LARSI et al., 2004). We do not know whether the variation in the
306 preparation/production of the antigen used in the in-house ELISA has influenced the
307 sensitivity and specificity values in the field samples. We need to compare this assay
308 with another assay in which soluble antigens are also used.

309 The low agreement between the NAT for field samples ($k=0.281$) and the reference
310 technique ($k=1.0$) may have occurred due to a difference in the time course of infection
311 and also because of variations in the amount of specific circulating antibodies, especially
312 because these are samples from experimental inoculations. There are fluctuations in the
313 levels of antibodies in chronic natural *N. caninum* infections (PACKHAM et al., 1998).

314 However, these fluctuations did not interfere in the identification of negative animals due
315 to the high values of specificity that were obtained with this technique (Sp=97.9%).

316 The sensitivity and specificity of a particular serological test can vary according to the
317 different cut-off points that are chosen (DUBEY, 2003; LARSI et al., 2004; SILVA et al.,
318 2007). Divergences in prevalences using different techniques and different cut-off points
319 have also reported in seroepidemiological studies about *T. gondii* infections in horses.
320 Aroussi et al. (2015) reported that when the MAT (modified agglutination test) and the
321 ELISA were both used, the seroprevalence had significant variations ranging between
322 13% and 90%. Dubey et al. (1990) concluded that the assessment of the prevalence would
323 not be possible until additional studies were conducted to determine the sensitivity and
324 specificity of serological tests for equine toxoplasmosis. Few studies on the
325 seroprevalence of *N. caninum* infections in goats have used the NAT assay. This assay
326 should be better evaluated in this animal species in additional studies to be conducted in
327 the future.

328 The need for a careful interpretation of the serological test chosen by the investigator
329 is essential during the diagnostic assessment of a herd and should include the analysis of
330 individual serum samples. Therefore, we suggest, based on the results of our study, that
331 the IFAT should remain the assay of choice in the study of caprine neosporosis in
332 individual serum samples. The cut-off points and guidelines provided in the present study
333 should be followed. We also recommend that, whenever possible, a combination of
334 serological assays with high sensitivity and specificity is used in seroepidemiological
335 surveys of caprine neosporosis.

336

337 **Acknowledgements**

338 The authors acknowledge CNPq (National Council for Scientific and
339 Technological Development) for financial support (Process 400405/ 2012-1). Support
340 from CYTED (Iberoamerican Science and Technology Programme for Development,
341 process 113RT0469) and Salud Veterinaria y Zoonosis Group (SALUVET, Universidad
342 Complutense de Madrid, Spain).

343

344 **References**

345 Aguado-Martinez A, Álvarez-García G, Fernández-García A, Risco-Castillo V, Arnaiz-
346 Seco I, Rebordosa-Trigueros X, Navarro-Lozano V, Ortega-Mora LM. Usefulness of
347 rNcGRA7- and rNcSAG4-based ELISA tests for distinguishing primo-infection,
348 recrudescence, and chronic bovine neosporosis. *Vet Parasitol* 2008; 157: 182-195.

349 Altbuch JA; Schofield MJ, Porter CA, Gavin WG. *Neospora caninum*: A successful
350 testing and eradication program in a dairy goat herd. *Small Rumin Res* 2012; 105: 341-
351 344.

352 Álvarez-García G, Collantes-Fernández E, Costas E, Rebordosa X, Ortega-Mora LM.
353 Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods
354 in bovine neosporosis. *Vet Res* 2003; 34: 341-352.

355 Álvarez-García G, García-Culebras A, Gutiérrez-Expósito D, Navarro-Lozano V, Pastor-
356 Fernández I, Ortega-Mora LM. Serological diagnosis of bovine neosporosis: A
357 comparative study of commercially available ELISA tests. *Vet Parasitol* 2013; 198: 85-
358 95.

359 Aroussi A, Vignoles P, Dalmay F, Wimmel L, Dardé, ML, Mercier A, Ajzenberg D.
360 Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in horse meat from supermarkets in France and
361 performance evaluation of two serological tests. *Parasite* 2015, 22:14.

362 Arraes-Santos AI, Araújo AC, Guimarães MF, Santos JR, Pena HFJ, Gennari SM,
363 Azevedo SS, Labruna MB, Horta MC. Seroprevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and
364 anti-*Neospora caninum* antibodies in domestic mammals from two distinct regions in the
365 semi-arid region of Northeastern Brazil. *Vet Parasitol* 2016; 5: 14-18.

366 Barr BC, Anderson ML, Woods LW, Dubey JP, Conrad PA. Neospora-like protozoal
367 infections associated with abortion in goats. *J Vet Diagn Invest* 1992; 4: 365-367.

368 Björkman C, Naslund K, Stenlund S, Maley SW, Buxton D, Uggla A. An IgG avidity
369 ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. *J Vet*
370 *Diag Investig* 1999; 11: 41-44.

371 Blumröder D, Schares G, Norton R, Williams DJL, Esteban-Redondo I, Wright S,
372 Björkman C, Frössling J, Risco-Castillo V, Fernández-García A, Ortega-Mora LM, Sager
373 H, Hemphill A, Maanen C, Wouda W, Conraths FJ. Comparison and standardisation of
374 serological methods for diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. *Vet*
375 *Parasitol* 2004; 120: 11-22.

376 Buxton D, Maley SW, Wright S, Thomson KM, Rae AG, Innes EA. The pathogenesis of
377 experimental neosporosis in pregnant sheep. *J Comp Pathol* 1998; 118: 267-279.

378 Buxton D, Mcallister MM, Dubey JP. The comparative pathogenesis of neosporosis.
379 *Trends in Parasitol* 2002; 18(12): 546-552.

380 Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas* 1960; 20: 37-
381 46

382 Corbellini LG, Colodel EM, Driemeier D. Granulomatous encephalitis in a neurologically
383 impaired goat kid associated with degeneration of *Neospora caninum* tissue cysts. *J Vet*
384 *Diagn Invest* 2001; 13: 416-419.

385 Costa HF, Stachissini AVM, Langoni H, Padovani CR, Gennari SM, Modolo JR.
386 Reproductive failures associated with antibodies against caprine arthritis-encephalitis
387 vírus, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in goats in the state of São Paulo, Brazil.
388 *Braz J Vet Anim Sci* 2012; 49(1): 67-72.

389 Dubey JP, Schares G. Neosporosis in animals – The last five years. *Vet Parasitol* 2011;
390 180: 90-108.

391 Dubey JP, Hartley WJ, Lindsay DS, Topper MJ. Fatal congenital *Neospora caninum*
392 infection in a lamb. *J Parasitol* 1990; 76: 127-130.

393 Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A. Newly recognized fatal
394 protozoan disease of dogs. *J Am Vet Assoc* 1988; 192: 1259-1263.

395 Dubey JP, Morales JA, Villalobos P, Lindsay DS, Blagburn BL, Topper MJ. Neosporosis-
396 associated abortion in a dairy goat. *J Am Vet Med Assoc* 1996; 208: 263-265.

397 Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. Epidemiology and Control of Neosporosis and
398 *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Vet* 2007; 20(2): 323-367.

399 Dubey JP. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J*
400 *Parasitology* 2003; 41(1): 1-16.

401 Eleni C, Crotti S, Manuali E, Costarelli S, Filippini G, Moscati L, Magnino S. Detection
402 of *Neospora caninum* in an aborted goat foetus. *Vet Parasitol* 2004; 2(123): 271-274.

403 Faria EB, Gennari SM, Pena HFJ, Athayde ACR, Silva MLCR, Azevedo SS. Prevalence
404 of anti-*Toxoplasma gondii* and anti- *Neospora caninum* antibodies in goats slaughtered

405 in the public slaughterhouse of Patos city, Paraíba State Northeast region of Brazil. *Vet*
406 *Parasitol* 2007; 149: 126-129.

407 Gart J.J., Buck A.A. 1966. Comparison of a screening test and a reference test in
408 epidemiologic studies. II. A probabilistic model for the comparison of diagnostic tests.
409 *Am J Epidemiol* 1966; 83: 593-602.

410 González-Warleta M, Castro-Hermida JA, Regidor-Cerrillo J, Benavides J, Álvarez-
411 García G, Fuertes M, Ortega-Mora LM, Mezo M. *Neospora caninum* infection as a cause
412 of reproductive failure in a sheep flock. *Vet Res* 2014; 45:88.

413 Guido S, Katzer F, Nanjiani I, Milne E, Innes EA. Serology-based diagnostics for the
414 control of bovine neosporosis. *Trends Parasitol* 2016; 32(2): 131-143.

415 Larsi S, de Meerschman F, Rettigner C, Focant C, Losson B. Comparison of three
416 techniques for the serological diagnosis of *Neospora caninum* in the dog and their use for
417 epidemiological studies. *Vet Parasitol* 2004; 123: 25-32.

418 Lindsay DS, Rippey NS, Powe TA, Sartin EA, Dubey JP, Blagburn BL. Abortions, fetal
419 death, and stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora*
420 *caninum*. *Am J Vet Res* 1995; 56(9): 1176-1180.

421 McAllister, M. Diagnosis and control of bovine neosporosis. *Vet Clin Food Anim* 2016;
422 32: 443-463.

423 Mesquita LP, Nogueira CI, Costa RC, Orlando DR, Bruhn FRP, Lopes PFR, Nakagaki
424 KYR, Peconick AP, Seixas JN, Bezerra Júnior PS, Raymundo DL, Varaschin MS.
425 Antibody kinetics in goats and conceptuses naturally infected with *Neospora caninum*.
426 *Vet Parasitol* 2013; 196: 327-333.

427 Modolo JR, Langoni H, Padovani CR, Barrozo LV, Leite BLS, Gennari SM, Stachissini
428 AVM. Avaliação da ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, em soros de
429 caprinos do estado de São Paulo, e associação com variáveis epidemiológicas, problemas
430 reprodutivos e riscos a saúde pública. *Pesqui Vet Bras* 2008; 28(12): 606-610.

431 Moreno B, Collantes-Fernández E, Villa A, Navarro A, Regidor-Cerrillo J, Ortega-Mora
432 LM. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and
433 caprine abortions. *Vet Parasitol* 2012; 187: 312-318.

434 Naguleswaran A, Hemphill A, Rajapakse RPVJ, Sager H. Elaboration of a crude antigen
435 ELISA for serodiagnosis of caprine neosporosis: validation of the test by detection of

436 *Neospora caninum*-specific antibodies in goats from Sri Lanka. *Vet Parasitol* 2004; 126:
437 257-262.

438 Nunes ACBT, Yamasaki EM, Kim PCP, Melo RPB, Ribeiro-Andrade M, Porto WJN,
439 Mota RA. Transplacental transmission of *Neospora caninum* in naturally infected small
440 ruminants from northeastern Brazil. *Pesqui Vet Bras* 2017; 37(9): 921-925.

441 OIE, Terrestrial Manual. *Chapter 1.1.5. - Principles and methods of validation of*
442 *diagnostic assays for infectious diseases*. 2013.

443 Ortega-Mora LM, Fernández-García A, Gómez-Bautista M. Diagnosis of bovine
444 neosporosis: Recent advances and perspectives. *Acta Parasitol* 2006; 51(1): 1-14.

445 Ortega-Mora LM, Gottstein B, Conraths FJ, Buxton D. Protozoal abortions in farm
446 ruminants: Guidelines for diagnosis and control. *CAB International*; 2007.

447 Packham AE, Sverlow KW, Conrad PA, Loomis EF, Rowe JD, Anderson ML, Marsh
448 AE, Cray C, Barr BC. A modified agglutination test for *Neospora caninum*:
449 Development, optimization, and comparison to the Indirect Fluorescent-Antibody Test
450 and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5(4): 467-
451 473.

452 Porto WJN, Horcajo P, Kim PCP, Regidor-Cerrillo J, Romão EA, Álvarez-García G,
453 Mesquita EP, Mota RA, Ortega-Mora LM. Peripheral and placental immune responses in
454 goats after primoinfection with *Neospora caninum* at early, mid and late gestation. *Vet*
455 *Parasitol* 2017; 242: 38-43.

456 Porto WJN, Regidor-Cerrillo J, Kim PCP, Benavides J, Silva ACS, Horcajo P, Oliveira
457 AAF, Ferre I, Mota RA, Ortega-Mora LM. Experimental caprine neosporosis: the
458 influence of gestational stage on the outcome of infection. *Vet Res* 2016; 47(29).

459 Regidor-Cerrillo J, Gómez-Bautista M, Pereina-Bueno J, Aduriz G, Navarro-Lozano V,
460 Risco-Castillo V, Fernández-García A, Pedraza-Díaz S, Ortega-Mora LM. Isolation and
461 genetic characterization of *Neospora caninum* from asymptomatic calves in Spain.
462 *Parasitology* 2008; 135: 1651-1659.

463 Reichel MP, Ellis JT. *Neospora caninum* – How close are we to development of a
464 efficacious vaccine that prevents abortion in cattle? *Int J Parasitol* 2009; 39: 1173-1787.

465 Romand S, Thulliez P, Dubey JP. Direct agglutination test for serologic diagnosis of
466 *Neospora caninum* infection. *Parasitol Res* 1998; 84: 50-53.

467 Santos CSAB, Azevedo SS, Soares HS, Higino SSS, Santos FA, Silva MLCR, Pena HFJ,
468 Alves CJ, Gennari SM. Flock-level risk factors associated with *Neospora caninum*
469 seroprevalence in dairy goats in a semiarid region of Northeastern Brazil. *Small Rumin*
470 *Res* 2013; 112: 239-242.

471 Silva DAO, Lobato J, Mineo TWP, Mineo JR. Evaluation of serological tests for the
472 diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: Optimization of cut off titers and
473 inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol* 2007; 143:
474 234-244.

475 Uzêda RS, Pinheiro AM, Fernández SY, Ayres MCC, Gondim LFP, Almeida MAO.
476 Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy goats from Bahia, Brazil. *Small Rum Res*
477 2007; 70: 257-259.

478 Varaschin MS, Hirsch C, Wouters F, Nakagari KY, Guimarães AM, Santos DS, Bezerra
479 PS, Costa RC, Peconick AP, Langoni IM. Congenital Neosporosis in Goats from the State
480 of Minas Gerais, Brazil. *Korean J Parasitol* 2012; 50(1): 63-67.

481 Williams DJL, Guy CS, McGarry JW, Tasker L, Smith F, MacEachern K, Cripps PJ,
482 Kelly DF, Trees AJ. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of
483 experimentally-induced parasitemia during gestation determines foetal survival.
484 *Parasitology* 2000; 121:347-358.

Table 1. A comparative concordance between three serodiagnostic assays using reference samples of goat sera tested for anti-*N. caninum* antibody detection

Reference Sample Panel	Total (n)	Serodiagnostic Tests					Sensitivity (CI 95%)	Specificity (CI 95%)	Positive predictive value (CI 95%)	Negative predictive value (CI 95%)	ACU (CI 95%)	k (CI 95%)
			IFAT ^R	Pos.	Neg.	Total						
Primo-infeccion Model (Experimental inoculation)												
Positive Animals	30	ELISA	Pos.	30	0	30	100% (100-100)	100% (100-100)	100% (100-100)	100% (100-100)	100% (100-100)	1,0 (P) (1,000-1,000)
Negative Animals	30		Neg.	0	30	30						
			Total	30	30	60						
			IFAT^R	Pos.	Neg.	Total						
		NAT	Pos.	30	0	30	100% (100-100)	100% (100-100)	100% (100-100)	100% (100-100)	100% (100-100)	1,0 (P) (1,000-1,000)
			Neg.	0	30	30						
Total	60		Total	30	30	60						

IFAT: indirect immunofluorescence antibody test; NAT: *Neospora* agglutination test; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; Pos: Positive; Neg: Negative; ^R: Reference test; K: Kappa coeficiente (< 0.0) No agreement; (0.0-0,19) P: poor; (0.20-0.39) W: weak; (0.40-0.59) M: moderate; (0.60–0.79) S: substantial; (0.80–1.00) P: almost perfect (Landis and Koch, 1977).

Table 2. Frequency of anti-*N. caninum* IgG antibodies in samples sera of 500 goats - A comparative concordance between three serodiagnostic assays

Serodiagnostic assays					Sensitivity (CI 95%)	Specificity (CI 95%)	Positive predictive value (CI 95%)	Negative predictive value (CI 95%)	ACU (CI 95%)	K(CI 95%)
	IFAT^R	Pos.	Neg.	Total						
ELISA	Pos.	21	11	32	91,3% (79,8-102,8)	97,7% (96,3-99,0)	65,2% (49,2-82,1)	99,6% (99-100,2)	97,4% (96-98,8)	0,750 (S) (0,620-0,880)
	Neg.	2	466	468						
	Total	23	477	500						
	IFAT^R	Pos.	Neg.	Total						
NAT	Pos.	6	10	16	26,1% (8,1-44)	97,9% (96,6-99,2)	37,5% (13,8-61,2)	96,5% (94,8-98,1)	94,6% (92,6-96,6)	0,281 (W) (0,088-0,473)
	Neg.	17	467	484						
	Total	23	477	500						
	ELISA^R	Pos.	Neg.	Total						
IFAT	Pos.	21	2	23	65,6% (49,2-82,1)	99,6% (99-100,2)	91,3% (79,8-102,8)	97,7% (96,3-99)	97,4% (96-98,8)	0,750 (S) (0,620-0,880)
	Neg.	11	466	477						
	Total	32	468	500						
	ELISA^R	Pos.	Neg.	Total						

NAT	Pos.	12	4	16	37,5% (20,7-54,3)	99,1% (98,3-100)	75% (53,8-96,2)	95,9% (94,1-97,6)	95,2% (93,3-97,1)	0,478 (M) (0,301-0,654)
	Neg.	20	464	484						
	Total	32	468	500						
	NAT^R	Pos.	Neg.	Total						
IFAT	Pos.	6	17	23	37,5% (13,8-61,2)	96,5% (94,8-98,1)	26,1% (8,1-44)	97,9% (96,6-99,2)	94,6% (92,6-96,6)	0,281 (W) (0,088-0,473)
	Neg.	10	467	477						
	Total	16	484	500						
	NAT^R	Pos.	Neg.	Total						
ELISA	Pos.	12	20	32	75% (53,8-96,2)	95,9% (94,1-97,6)	37,5% (20,7-54,3)	99,1% (98,3-100)	95,2% (93,3-97,1)	0,478 (M) (0,301-0,654)
	Neg.	4	464	468						
	Total	16	484	500						

IFAT: indirect immunofluorescence antibody test; NAT: *Neospora* agglutination test; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; Pos: Positive; Neg: Negative; ^R: Reference test; *K*: Kappa coeficiente (< 0.0) No agreement; (0.0-0,19) P: poor; (0.20-0.39) W: weak; (0.40-0.59) M: moderate; (0.60-0.79) S: substantial; (0.80-1.00) P: almost perfect (Landis and Koch, 1977).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo acrescentam novos dados sobre a patogenia e investigação diagnóstica da neosporose caprina, uma vez que as informações disponíveis na literatura ainda são escassas. A soroprevalência da infecção por *Neospora caninum* descrita em nossa área de estudo demonstra de forma indireta a circulação do agente em rebanhos caprinos, corroborando com os resultados obtidos em distintas propriedades ao redor do mundo e em outras regiões do Brasil, o que enfatiza a necessidade de implantação de medidas de controle e profilaxia voltadas ao agente nessas criações. A utilização da espécie caprina como modelo experimental se mostra promissora em substituição ao modelo bovino para desenvolvimento de novas estratégias de controle da neosporose em ruminantes. A necessidade de obtenção de isolados de *N. caninum* oriundos de caprinos naturalmente infectados é fundamental para dar continuidade aos estudos de virulência, podendo fomentar novas respostas sobre a real influência do isolado frente a resposta imunológica do hospedeiro, bem como a ocorrência de infecções em gestações subseqüentes e estimativa da taxa de transmissão vertical.

6. ANEXOS

6.1 Comprovantes de Submissão

6.1.1 Capítulo I

ScholarOne Manuscripts <https://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>

 Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

[# Home](#)

[# Author](#)

Submission Confirmation [Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Manuscript ID ABMVZ-2018-10593

Title Study of recrudescence of neosporosis in experimentally infected goats

Authors Mota, Rinaldo
KIM, POMY

Date Submitted 17-Feb-2018

[Author Dashboard](#)

1 de 2 17/02/2018 19:32



Study of recrudescence of neosporosis in experimentally infected goats

Journal:	<i>Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia</i>
Manuscript ID	ABMVZ-2018-10593
Manuscript Type:	Original Article
Keyword:	Neospora caninum, caprine, pathogeny, experimental model

SCHOLARONE™
Manuscripts

View Only

6.1.2 Capítulo 2

17/02/2018

ScholarOne Manuscripts



Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

Home

Author

Submission Confirmation

Print

Thank you for your submission

Submitted to

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

Manuscript ID

RBPV-2018-0036

Title

Serological response to Neospora caninum infection in goats and agreement between three diagnostic techniques to detect caprine neosporosis

Authors

Kim, Pomy

Melo, Renata

de Almeida, Jonatas

Silva, José

Ribeiro-Andrade, Müller

Pinheiro Júnior, José Wilton

Porto, Wagner

Mota, Rinaldo

Date Submitted

17-Feb-2018

Author Dashboard

<https://mc04.manuscriptcentral.com/rbpv-scielo>

1/2

17/02/2018

ScholarOne Manuscripts

© Clarivate Analytics | © ScholarOne, Inc., 2018. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

**Serological response to *Neospora caninum* infection in goats
and agreement between three diagnostic techniques to
detect caprine neosporosis**

Journal:	<i>Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Full Article
Keyword:	caprine neosporosis, serological screening tests, goat, <i>Neospora caninum</i>

SCHOLARONE™
Manuscripts

View Only