

**Emprego do kit portátil rápido elisa para pesquisa de *neospora caninum* em bovinos leiteiros de pequenas propriedades rurais****Use of the rapid elisa portable kit for researching *neospora caninum* in milk cattle of small rural properties**

DOI:10.34117/bjdv6n10-674

Recebimento dos originais: 28/09/2020

Aceitação para publicação: 29/10/2020

**Ricati Lima Majewski**

Graduando em Med. Veterinária

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim, RS

Av. Sete de Setembro, 1621 - Fátima, Erechim - RS, 99709-910

ricatimajewski@yahoo.com.br

**Bárbara Cappelletto Barbosa Nunes**

Graduanda em Med. Veterinária

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim, RS

Av. Sete de Setembro, 1621 - Fátima, Erechim - RS, 99709-910

barbaraa.cbn@gmail.com

**Patricia Tussi**

Graduanda em Med. Veterinária

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim, RS

Av. Sete de Setembro, 1621 - Fátima, Erechim - RS, 99709-910

ptussi@uricer.edu.br

**Marta Grumann**

Mestre em Bioexperimentação

Universidade de Passo Fundo - UPF

Av. Brasil Leste, 285 - São José, Passo Fundo - RS, 99052-900, RS

vpdiagnostico.com.br

**Marina Menoncin Weschenfelder Rohenkohl**

Mestre em Ciência Animal

Universidade Federal de Pelotas - NUPEEC/UFPEL

Capão do Leão - RS, 96160-000

marinarohenkohl@uricer.edu.br

**Geciane Toniazco Backes**

Doutora em Ciências

Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ,

Av. Pedro Calmon, 550 - Rio de Janeiro - RJ, 21941-901

gtoniazco@uricer.edu.br

**Mauro Antônio de Almeida**

Mestre em Agronegócios

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Av. Paulo Gama, 110 - Farroupilha, Porto Alegre - RS, 90040-060

maurodealmeida@uricer.edu.br

**Daniela dos Santos de Oliveira**

Doutora em Engenharia de Alimentos

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim, RS

Av. Sete de Setembro, 1621 - Fátima, Erechim - RS, 99709-910

danielaoliveira@uricer.edu.br

**RESUMO**

A neosporose em bovinos de leite é uma doença parasitária economicamente importante, pois está relacionada a perdas reprodutivas, morte embrionária e aborto no primeiro e segundo trimestres de gestação, ocasionando grandes prejuízos ao sistema produtivo. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi pesquisar a presença de *Neospora caninum* em bovinos leiteiros de pequenas propriedades rurais empregando um kit portátil rápido ELISA. Foram realizadas análises de amostras de leite *in natura* com suspeita de contaminação de neosporose. Para tanto, foram coletadas 10 amostras de leite, de 10 diferentes vacas leiteiras das raças Jersey e Holandesa, de 4 diferentes propriedades de dois municípios do Alto Uruguai Gaúcho. As amostras foram identificadas e acondicionadas em frascos individuais, esterilizados e transportadas sob refrigeração até o laboratório. Estas amostras foram submetidas ao Teste ELISA com kit portátil rápido. Das 10 amostras avaliadas duas resultaram positivas, quatro suspeitas e quatro foram negativas. Por ser um kit portátil e um teste rápido, torna-se prática a identificação do parasita na aquisição de novos animais, evitando perdas econômicas na bovinocultura leiteira.

**Palavras-chave:** Doença parasitária, Leite, Economia, Método rápido.**ABSTRACT**

Neosporosis in dairy cattle is an economically important parasitic disease, as it is related to reproductive losses, embryonic death and abortion in the first and second trimesters of pregnancy, causing great damage to the productive system. In this sense, the objective of this work was to investigate the presence of *Neospora caninum* in dairy cattle from small rural properties using a from ELISA test with a rapid portable kit. Analyzes of fresh milk samples were carried out with suspected neosporosis contamination. For this purpose 10 milk samples were collected, from 10 different dairy cows of the Jersey and Holstein breeds, from 4 different properties two gaúcho municipalities in Alto Uruguai. The samples were identified and packed in individual bottles, sterilized and transported under refrigeration to the laboratory. These samples were submitted to the ELISA test with a rapid portable kit. Of the 10 samples evaluated, two were positive, four were suspicious and four were negative. As it is a portable kit and a rapid test, it becomes practical to identify the parasite in the acquisition of new animals, avoiding economic losses in dairy cattle

**Keywords:** Parasitic disease, Milk, Economy, Rapid method.**1 INTRODUÇÃO**

A neosporose é uma doença parasitária economicamente importante, está relacionada com perdas reprodutivas, morte embrionária e aborto no primeiro e segundo trimestres de prenhez. O

agente etiológico é o *Neospora caninum*, um protozoário intracelular do *Phylum Apicomplexa* (DUBEY, 1999; PAZ et al., 2019). Tal protozoário foi identificado pela primeira vez no ano de 1988, em filhotes de cães com encefalomielite. O *N. caninum* é um coccídio intracelular, encontrado na forma de cistos e taquizoítos. Inicialmente este parasita foi confundido com o *Toxoplasma gondii*, microrganismo causador da toxoplasmose. No entanto, Dubey et al. (1988) que o identificaram como um novo gênero e espécie, facilitando e otimizando os posteriores estudos a partir de então.

Segundo Haddad et al. (2005) e Reichel et al. (2013), as principais perdas econômicas incorridas pelas infestações por neosporose estão relacionadas aos custos dos fetos abortados, à diminuição da produtividade das vacas, aos atrasos na concepção, às reduções na produção de leite e às despesas veterinárias, incluindo diagnósticos e terapêuticas elevadas. A neosporose foi relatada em todos os estados brasileiros e causou perdas substanciais para os produtores de bovinos (CÉZAR-CERQUEIRA et al., 2017).

Nascimento et al. (2014) e Fávero et al. (2017), relatam que no Paraná e em Santa Catarina, num período estimado de 3 anos, entre 2014 e 2017, a prevalência de *Neospora caninum* nas propriedades rurais foi de aproximadamente 30%. No Rio Grande do Sul a prevalência entre animais em lactação varia de 17 a 60% (COBERLLINI et al., 2006; FRANDOLOSO et al., 2008). Ragozo et al. (2003), destacam maior incidência de neosporose em bovinos leiteiros do que em bovinos de corte. Isto se deve, possivelmente, pelo fato das vacas estarem mais próximas dos cães e submetidas ao estresse do manejo diário considerado relativamente alto (MOORE, 2005). De acordo com Vogel et al. (2006) esta doença apresenta ameaças sanitárias e econômicas.

O noroeste do Rio Grande do Sul, região do presente estudo, é a principal área produtora de leite do Estado. Seu rendimento é de 3.093.412 L anualmente (IBGE, 2017), logo, quaisquer reduções na eficiência reprodutiva resultam em perdas econômicas substanciais nesse setor, portanto, são necessários estudos das causas das doenças reprodutivas e das perdas resultantes delas.

Destaca-se que os principais fatores de risco associados à neosporose nas fazendas leiteiras são a disfunção reprodutiva existente, animais senescentes em proximidade com o rebanho, condições climáticas favoráveis à formação de oocistos, introdução de animais não diagnosticados e práticas inadequadas de biossegurança e a presença de cães nas propriedades (DUBEY et al., 2007; FÁVERO et al., 2017).

Sabe-se que os hospedeiros definitivos de *N. caninum* são os canídeos, incluindo cão doméstico (*Canis familiaris*), coiotes (*Canis latrans*), dingos (*Canis lupus dingo*) e lobos cinzentos (*Canis lupus*), essas espécies excretam oocistos de *N. caninum* (GONDIM et al., 2004; DUBEY et al., 2011). A infecção do hospedeiro definitivo ocorre pela ingestão de carcaças de hospedeiros intermediários infectados, desenvolvendo uma infecção intestinal. O parasita se reproduz no intestino

do hospedeiro e os oocistos são eliminados pelas fezes. Em um período de três dias ocorre a esporulação dos oocistos, sendo estes altamente resistentes, mantendo-se viáveis no ambiente por um longo período de tempo até serem ingeridos pelos hospedeiros intermediários, onde irão desencistar e ocupar tecidos, levando a uma infecção sistêmica (FRANDOLOSO et al., 2008).

Os animais das espécies bovina, ovina, equina e bubalina são hospedeiros intermediários abrigando cistos em seus tecidos (DUBEY & SCHARES, 2011). Eles são infectados pelo contato com implementos agrícolas, água e alimentos contaminados com fezes de canídeos soropositivos (DUBEY et al., 2007). O parasita é transmitido através do rebanho, pela chamada transmissão vertical e horizontal (GONDIM et al., 2004). A transmissão vertical é a mais importante em termos de manutenção de doenças (NASCIMENTO et al., 2014), uma vez que é intergeracional (DUBEY et al., 2007).

Não há um tratamento eficaz para a enfermidade, somente controle da introdução da infecção com a realização de testes diagnósticos e atestados negativos da doença de animais oriundos de outras propriedades. Pode adotar-se também práticas de manejo que interrompam o ciclo de transmissão do *N. caninum*, evitando a interação de cães com o rebanho, prevenindo a contaminação fecal de água e alimentos. Para prevenir a infecção dos cães, deve-se evitar que os mesmos consumam restos placentários, bezerros natimortos, carne e vísceras de vacas e bezerros mortos e ainda, o consumo de carcaças bovinas (NASCIMENTO et al., 2014).

Vários métodos laboratoriais, como histopatologia, imunologia, procedimentos moleculares e bioensaios estão disponíveis para detecção de infecção por *N. caninum* em animais. Entre os métodos sorológicos, a técnica ELISA é adequadamente confiável em termos de definição de títulos específicos de anticorpos para *N. caninum*, possui alta aplicabilidade para estudos epidemiológicos, devido à sua relativa alta velocidade (DUBEY et al., 2007; GUIDO et al., 2016).

Schares, Barwald e Staubach (2003) relataram que a precisão do exame do leite a granel é semelhante a ensaios sorológicos. E alguns kits comerciais ELISA estão disponíveis para detecção de anticorpo específico para *N. caninum* no leite bovino, bem como leite a granel. O exame do leite a granel pode, portanto, ser realizado para avaliar níveis de anticorpos contra *N. caninum* em propriedades de produção de leite (HURKOVA, HALOVA & MODRY, 2005). Neste contexto, o objetivo deste trabalho visa estimar a soroprevalência da neosporose e o risco de infecção em amostras de leite de bovino de pequenas propriedades rurais do Alto Uruguai Gaúcho empregando um kit portátil ELISA de forma rápida e eficiente.

## 2 METODOLOGIA

Para o presente estudo foram coletadas 10 amostras de leite, de 10 diferentes vacas leiteiras desprezando os três primeiros jatos. Estes animais eram das raças Jersey e Holandesa de quatro diferentes propriedades de dois municípios do Alto Uruguai Gaúcho. No momento da coleta foi solicitado os registros relacionados ao manejo reprodutivo do plantel.

As amostras foram devidamente acondicionadas em frascos individuais esterilizados, identificadas, conforme o número do animal e proprietário, e transportadas sob refrigeração em caixa isotérmica até o laboratório de Microbiologia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - Campus Erechim. Para realização do teste de identificação de *N. caninum* em bovinos leiteiros de pequenas propriedades rurais foi empregando o kit ImmunoComb portátil DOT-ELISA cedido pela BIOGAL<sup>®</sup> (Israel). Este kit identifica a presença de anticorpos IgG de *N. caninum*, no soro ou leite, e de anticorpo IgG de *N. caninum* no sangue total, plasma/soro ou leite de bovinos, fornecendo resultados em cerca de 38 minutos.

De acordo com a BIOGAL<sup>®</sup>, o kit se baseia no princípio Imuno ensaio em fase sólida, DOT-ELISA contendo 2 componentes principais: um cartão plástico ImmunoComb em formato de pente com 12 dentes sendo que cada um testa uma amostra e cada dente está adsorvido em um ponto do antígeno purificado de *N. caninum* e uma placa reveladora contendo reagentes para o teste.

Os ensaios foram realizados seguindo instruções de uso do fornecedor ImmunoComb BOVINE NEOSPORA Kit de teste para determinação de anticorpos IgG de *N. caninum* no soro ou leite.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta informações sobre os métodos de reprodução adotados por cada propriedade e os resultados de identificação dos animais reagentes, não-reagentes e suspeitos ao teste de ELISA para identificação de *N. caninum* em amostras de leite bovino. O emprego do kit ImmunoComb portátil DOT-ELISA possibilitou identificar três amostras na propriedade A classificadas como suspeitas. Na propriedade B, uma caracterizou-se como suspeita e duas foram negativas. Em relação a propriedade C, obteve-se, uma amostra negativa, uma positiva e uma suspeita, e na D, uma amostra resultou como negativa e uma positiva.

A partir da análise dos registros relacionados ao manejo reprodutivo (Tabela 1), constatou-se que todas propriedades fazem inseminação artificial, exceto a propriedade A que prioriza a monta natural realizando a inseminação artificial em casos de repetições de cio, não tendo registros do índice de abortos. Na propriedade B ocorreram poucos casos de aborto e repetição de cios, sem ter um número exato de cada animal, os animais submetidos ao teste apresentaram-se sadios. A propriedade

C apresentou todos os protocolos de vacinas, porém não possui dados sobre abortos e repetições de cio em seu rebanho. A propriedade D também não apresenta registros referentes a abortos e repetições de cio. Estas informações são referentes ao período de fevereiro a outubro de 2019.

Estes resultados são importantes para a região do Alto Uruguai Gaúcho, pois das propriedades estudadas duas apresentaram resultados positivos e as outras duas apresentam resultados suspeitos para animais contaminados com *N. caninum*. Sendo a neosporose uma doença contagiosa e de fácil transmissão, todas as propriedades deveriam realizar testes diagnósticos como método de prevenção. Entre as causas mais prováveis da disseminação da doença, encontra-se a ingestão, pelos animais domésticos da propriedade (cães e gatos, principalmente), de partes das carcaças de animais mortos ou mesmo das vísceras contaminadas. Como método de controle, após a morte de animais na propriedade, especialmente se apresentam diagnóstico positivo para neosporose, deve-se enterrá-los e cobrir o local com cal virgem (CONAMA, 1993) ou incinerar as carcaças (Martins et al., 2018) evitando o consumo e posterior recontaminação.

Tabela 1 – Métodos de reprodução e identificação dos animais reagentes, não-reagentes e suspeitos ao teste de ELISA para *N. caninum* em bovinos.

Propriedade	Reprodução	Identificação do Animal*	Identificação de <i>N. caninum</i>		
			Não-reagentes	Suspeito	Reagentes
A	Monta Natural	3		X	
	Inseminação Artificial	4		X	
B	Inseminação Artificial	5		X	
		6	X		
		7	X		
C	Inseminação Artificial	8	X		
		9		X	
		10			X
D	Inseminação Artificial	11	X		
		12			X

\* 1 e 2 referem-se as amostras controle.

Os animais de número 3, 4 e 9, classificados como suspeitos e os de número 10 e 12 com neosporose confirmada (Tabela 1), representam 50% das amostras analisadas e conforme relato dos proprietários estes foram comprados para reposição de plantel. Desta forma, na compra de animais de reposição existe risco de adquirir animais infectados por *N. caninum*. Nestes casos, a análise do leite ou soro com o kit portátil ELISA DOT-ELISA, antes da aquisição evitaria a disseminação da doença.

Byrem et al. (2012), avaliaram a performance de um kit comercial ELISA (Neospora Ab Test, IDEXX) para a detecção de anticorpos de *Neospora caninum* em amostras de leite integral e desnatado e observaram que a soroprevalência geral determinada pelo ELISA foi de 18,3%. Os autores consideraram o teste IDEXX Neospora Ab adequado para a análise de leite e uma ferramenta de triagem em programas de controle da neosporose. Gharekhani e Yakhchali (2019), investigaram a presença de anticorpos contra *N. caninum* em amostras de leite usando ELISA kit (ID Screen® Neosporosis) na província de Hamedan, no oeste do Irã. De todos os animais examinados, 24,8% dos bovinos eram soropositivos para *N. caninum*. Estes resultados são similares aos encontrados no presente estudo, que detectou 20% das amostras positivas.

Como não existe um tratamento curativo dos animais contaminados, aplicam-se medidas preventivas para diminuir a disseminação da doença no rebanho. Lefkaditis et al. (2020), recomendam a quarentena e testagem sorológica para substituição do rebanho, bem como de animais de reposição, podendo decidir pela remoção de vacas infectadas ou sua progênie do rebanho; eliminar alimentos e materiais empregados na alimentação contaminados com fezes de cães e outros potenciais hospedeiros definitivos; realizar o controle regular do suprimento de água; fazer o controle regular de roedores para eliminar um potencial reservatório de *N. caninum* no manejo dos animais e no processo reprodutivo (por exemplo, o cuidado na transferência de embriões de mães infectadas para receptores não infectados pode impedir a transmissão transplacentária endógena do parasita, inseminação artificial de mães soropositivas com sêmen de touros de corte).

O teste ELISA em amostras de leite oferece uma alternativa atraente para diagnóstico da infecção por *N. caninum*, pois pode ser conveniente e economicamente incorporado aos programas que coletam e testam rotineiramente amostras de leite de vacas leiteiras individuais. Alguns kits ELISA, disponíveis no mercado, foram previamente validados para uso em leite integral (Schaes et al., 2004, 2005) ou desnatado (Varcasia et al., 2006; González-Warleta et al., 2011).

Outro dado importante a ser destacado para o uso de amostras de leite na implementação de programas de testes para identificação de *N. caninum*, empregando o teste ELISA é que os anticorpos podem ser detectados em todas as fases da lactação (Byrem et al., 2012).

**4 CONCLUSÃO**

O emprego do kit ImmunoComb portátil DOT-ELISA (BIOGAL®) em amostras de leite, mostrou ser uma alternativa rápida, eficiente e econômica para diagnosticar a incidência da neosporose em rebanhos leiteiros na região do Alto Uruguai Gaúcho. Desta forma, pode ser recomendada a aplicação deste kit para avaliações reprodutivas de rebanhos e, principalmente na aquisição de animais para reposição do plantel, auxiliando o diagnóstico, a percepção e a incidência de neosporose nas propriedades.

**AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a empresa VP Diagnóstico por ceder o kit ImmunoComb portátil DOT-ELISA da marca BIOGAL®.

**REFERÊNCIAS**

- CÉZAR-CERQUEIRA, K. C.; CALERO-BERNAL, R.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. All about neosporosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.26, n. 3, p.253-279, 2017.
- COBERLLINI, L. G.; SMITH D. R.; PESCADOR C. A.; SCHMITZ, M.; CORREA, A.; STEFFEN, D. J.; DRIEMEIER, D. Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 74, p.130-141, 2006.
- CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº5. de 5 de agosto de 1993. Ministério do Meio Ambiente**. Brasília, Diário Oficial da União, 1993.
- DUBEY J. P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p. 349-367, 1999.
- DUBEY, J. P.; SCHARES. G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007.
- DUBEY, J. P.; DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; RAJENDRAN, C.; MISKA, K.; FERREIRA, L. R.; MARTINS, J.; KWOK, O. C. H.; CHOUDHARY, S. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v.181, n. 2-4, p.382-387, 2011.
- DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Association**, v. 191, n. 9, p. 1269-1285, 1988.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n.1-2, p.1-34, 2006.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals: the last five years. **Veterinary Parasitology**, v.180, n.1-2, p. 90-108, 2011.

FÁVERO, J. F.; DA SILVA, A. S.; CAMPIGOTTO, G.; MACHADO, G.; DE BARROS, L. D.; GARCIA, J. L.; VOGEL, F. F.; MENDES, R. E.; STEFANI, L. M. Risk factors for *Neospora caninum* infection in dairy cattle and their possible cause-effect relation for disease. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 202-207, 2017.

FRANDOLOSO, R.; KREUTZ, L. C.; ANZILIERO, D.; SPAGNOLO, J.; KUSE, N.; FIORI, C.; BARCELLOS, L. J. G.; SCORTEGAGNA, G. T. Prevalência de leucose enzoótica bovina, diarreia viral bovina, rinotraqueíte infecciosa bovina e neosporose bovina em 26 propriedades leiteiras da região Nordeste do Rio Grande do Sul. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1102-1106, 2008.

GHAREKHANI, J.; YAKHCHALI, M. *Neospora caninum* infection in dairy farms with history of abortion in West of Iran. **Veterinary and Animal Science**, v. 8, 100071, 2019.

GONDIM, L. F. P.; McALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, v. 34, p.159-161, 2004.

GONZÁLEZ-WARLETA, M.; CASTRO-HERMIDA, J.A.; CARRO-CORRAL, C.; MEZO, M. Anti-*Neospora caninum* antibodies in milk in relation to production losses in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 101(1-2), p. 58-64, 2011.

GUIDO, S.; KATZER, F.; NANJIANI, I. Serology based diagnostics for the control of bovine Neosporosis. **Trend Parasitology**, v. 32(2), p. 131–143, 2016.

HADDAD, J. P.; DOHOO, I. R.; VANLEEWEN, J. A. A review *Neospora caninum* in dairy and beef cattle - a Canadian perspective. **Canadian Veterinary Journal**, v. 46, p. 230-243, 2005.

HURKOVA, L.; HALOVA, D.; MODRY, D. The prevalence of *Neospora caninum* antibodies in bulk milk of dairy herds in the Czech Republic: A case report. **Veterinaria Medicina**, v. 50(12), p. 549–552, 2005

ImmunoComb BOVINE NEOSPORA Kit de teste para determinação de anticorpos IgG de *Neospora caninum* no soro ou leite. N° Cat. do Produto: 50BNC103/50BNC130 <https://vpdiagnostico.shop/wp-content/uploads/2020/03/Instru%C3%A7%C3%B5es-de-uso-neospora-caninum.pdf>

LEFKADITIS, M.; MPAIRAMOGLOU, R.; SOSSIDOU, A.; SPANOUDIS, K.; TSAKIROGLOU, M. *Neospora caninum*, A potential cause of reproductive failure in dairy cows from Northern Greece. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. v. 19 100365, 2020.

MARTINS, A. C.; CAMPANINI, D., CARVALHO, P. G. B.; GOSCINISCK, F. Destination of naturally and eutanasiated dead animal. **Ciência Veterinária UniFil**, v. 1, n. 2, 2018.

MOORE, D. P. Neosporosis in South America. **Veterinary Parasitology**, v.127, p. 87-97, 2005.

NASCIMENTO, E. E.; SAMMI, A. S.; DOS SANTOS, J. R.; NINO, B. DE S. L.; BOGADO, A. L. G.; TARODA, A.; VIDOTTO, O.; GARCIA, J. L. Anti-*Neospora caninum* antibody detection and vertical transmission rate in pregnant zebu beef cows (*Bos indicus*): *Neospora caninum* in pregnant beef cows (*Bos indicus*). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 37, n. 4, p. 267-260, 2014.

PAZ, G. S. da; COLHADO, B da S.; ANTON, M. M.; ROCHA, K. de S.; SILVA, D. B. da,; MORAES, C. C. G. de, LUCHEIS, S. B.; LANGONI, H. Infecção por *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Leishmania major* e *Trypanosoma cruzi* em cães do estado do Pará. **Ciência Animal Brasileira**. v. 20, p. 1-10, e-33566, 2019.

RAGOZO, A. M. A.; PAULA, V. S. O.; SOUZA, S. L. P.; BERGSMASCHI, D. P.; GENNARI, S. M. Ocorrência de anticorpos ANTI-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis estados brasileiros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, n.1, p.33-37, 2003.

SCHARES, G.; BARWALD, A.; STAUBACH, C. Regional distribution of bovine *Neospora caninum* infection in the German state of Rhineland-Palatine modeled by logistic regression. **International Journal of Parasitology**, v. 33, p. 1631–1640, 2003.

SCHARES, G.; BÄRWALD, A.; STAUBACH, C.; WURM, R.; RAUSER, M.; CONRATHS, F. J.; SCHROEDER, C. Adaptation of a commercial ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. **Veterinary Parasitology**, v.120, p. 55–63, 2004.

SCHARES, G.; BÄRWALD, A.; CONRATHS, F. J. Adaptation of a surface antigen-based ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 52, p. 45–48, 2005.

VARCASIA, A.; CAPELLI, G.; RUIU, A.; LADU, M.; SCALA, A.; BJÖRKMAN, C. Prevalence of *Neospora caninum* infection in Sardinian dairy farms (Italy) detected by iscom ELISA on tank bulk milk. **Parasitology Research**, v. 98, p. 264–267, 2006.

GONZÁLEZ-WARLETA, M.; CASTRO-HERMIDA, J.A.; CARRO-CORRAL, C.; MEZO, M. Anti-*Neospora caninum* antibodies in milk in relation to production losses in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 101(1-2), p. 58-64, 2011.