

Abortamento por *Neospora caninum* em bovinos de leite no sul de Santa Catarina, Brasil

Abortion Due to *Neospora caninum* in Dairy Cattle in Southern Santa Catarina State, Brazil

Leonardo Silva da Costa¹, Hilda Fátima Jesus Pena², Jéssica Aline Withoef¹, Thierry Grima de Cristo¹, Isadora Cristina Melo¹, Solange Oliveira², Anderson Barbosa de Moura³ & Renata Assis Casagrande¹

ABSTRACT

Background: Neosporosis is a cosmopolitan disease known as the main infectious cause of abortion in cattle, reported in several states in Brazil. The transplacental transmission in cattle is responsible for perpetuating the disease in the herd. In the state of Santa Catarina, previous studies on this protozoan in cattle are mostly serological surveys. To increase information about this reproductive disorder, this work describes the diagnosis of abortions due to *Neospora caninum* in dairy cattle from state of Santa Catarina and the follow-up for 4 years in a farm affected by neosporosis.

Cases: From 2015 to 2019, necropsy was performed on 10 aborted bovine fetuses, between fifth and eighth month of pregnancy, with 1 fetus aborted in 2015, 3 in 2016, 2 in 2017 and, 4 in 2019, all originating from the same dairy property in the southern region of state of Santa Catarina. No macroscopic lesions were found. Histopathology revealed mild to moderate multifocal mononuclear necrotizing encephalitis in 5 fetuses, and multifocal mild mononuclear myositis and myocarditis in 4 and 3 fetuses, respectively. Polymerase Chain Reaction (PCR) using primers based on the Nc-5 gene was positive for *N. caninum* in five fetuses. Three visits were performed in the farm for epidemiological evaluation and blood samples collection for IgG antibodies anti-*N. caninum* (IFAT). The total herd was 170 Jersey, Holstein and crossbred cattle, raised in a semi-confined system with mechanical milking system. Since 2014, there has been a significant increase in abortions cases, approximately 20 cows had abortions; in the year 2015, approximately 10; in 2016, less than 5; in 2017, 4 cows aborted; in 2018, 11 abortions and, in 2019, there were 4 abortions. An increase in the rate of return to estrus was also reported, and both primiparous and multiparous cows had reproductive disorders. Abortions were recorded throughout the year and occurred predominantly between the fourth and sixth month of pregnancy. In 2016, an Indirect Immunofluorescence Reaction (IFAT) was performed on sera from 26 cows (13 with a history of reproductive disorders and another 13 without disorders). Of these, 50.0% (13/26) were seropositive, with titers ranging from 100 to 1600 (cutoff ≥ 100). The Enzyme Immunoassay (ELISA) of the entire herd was carried out in 2017, with 26.54% (43/162) of seropositivity, 8.02% (13/162) suspect, and 30.4% (17/56) had reproductive disorders. It was observed that only animals born on the property were used for replacement, there was less possibility of direct contact between dogs on the property with milking facilities, placental and fetal remains, properly disposing of these, incinerating or burying. Thirty animals were discarded from the property, 25 of which had reproductive disorders. All young female daughters of seropositive cows remained on the property for replacement. During the evaluation period, all dogs were eliminated.

Discussion: In this study, the diagnosis of neosporosis was made through epidemiology, histopathological lesions characterized by mononuclear encephalitis, myocarditis and myositis, and detection of the agent by PCR, associated with serological techniques. The lesions observed are indicative of *N. caninum* infection and are compatible with lesions observed in other studies. Serological screening is important to complement the diagnosis of abortion by *N. caninum* and to help control the agent in herds. From this report it is concluded that *N. caninum* is an important agent of reproductive disorders in cattle in the southern region of Santa Catarina, the different serological analyzes showed a good screening index for the inclusion of control strategies. In addition, the monitoring of reproductive rates of affected properties becomes necessary over the years, allowing better observation of control strategies.

Keywords: reproductive disorder, fetal death, protozoan, parasitology.

Descritores: distúrbio reprodutivo, morte fetal, protozoário, parasitologia.

DOI: 10.22456/1679-9216.116816

Received: 5 July 2021

Accepted: 17 September 2021

Published: 15 November 2021

¹Laboratório de Patologia Animal & ³Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias, Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, SC, Brazil. ²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil. CORRESPONDENCE: R.A. Casagrande [renata.casagrande@udesc.br]. Av. Luiz de Camões n. 2090. CEP 88520-000 Lages, SC, Brazil.

INTRODUÇÃO

A neosporose é uma enfermidade infecciosa cosmopolita, causada pelo protozoário *Neospora caninum* [7,15]. A forma de transmissão desse protozoário aos bovinos é horizontal, através do contato com fezes de cães com oocistos do parasito, ou vertical quando há infecção transplacentária, sendo essa a via mais importante, contribuindo para a permanência da infecção nos rebanhos [7,15]. Fetos podem morrer no útero, serem reabsorvidos, mumificar, nascerem mortos, nascerem vivos, mas doentes, ou clinicamente normais, porém, infectados [1]. A idade da fêmea, ordem de parto e histórico de abortamento geralmente não afetam a taxa de infecção congênita, porém é relatado que a transmissão vertical é mais frequente em vacas jovens [8].

No Estado de Santa Catarina, os estudos sobre este protozoário são, em sua maioria, análises sorológicas de rebanhos e fatores associados à infecção [9,13,16,19]. Há apenas um estudo descrevendo a análise molecular e imuno-histoquímica de fetos abortados por *N. caninum* [14]. Tendo em vista a importância produtiva e econômica desse protozoário para a bovinocultura, e pouca pesquisa atual dedicada a esse distúrbio na região em estudo, este trabalho tem por objetivo relatar a primeira descrição de neosporose como causa de abortamento em bovinos leiteiros no sul do estado de Santa Catarina, descrevendo o acompanhamento de uma propriedade por um período de 4 anos.

CASOS

Entre setembro de 2015 e setembro de 2019, foram encaminhados para avaliação anatomopatológica 10 fetos bovinos, todos provenientes de uma mesma propriedade de bovinocultura de leite no Município de São Ludgero, região sul de Santa Catarina, onde foi relatada grande quantidade de abortamentos. Os fetos avaliados foram compostos por 6 machos e 4 fêmeas, com idades gestacionais variando de 3 a 8 meses, remetidos em diferentes meses dos anos de acompanhamento (Tabela 1).

Amostras de placenta, encéfalo, pulmões, coração, timo, pálpebra, diafragma, músculo esquelético, fígado, abomaso, baço e rins foram coletadas e acondicionadas em formalina tamponada a 10%, incluídas em blocos de parafina e processadas rotineiramente pela técnica de hematoxilina e eosina (HE)¹. Fragmentos de encéfalo foram coletados em microtubos e analisados pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a detecção de *N. caninum* e *Toxoplasma gondii*, utilizando como alvo primers baseados no gene Nc-5 [17] e no fragmento repetitivo REP-529 [11], respectivamente.

Tabela 1. Fetos bovinos enviados à análise anatomopatológica entre setembro de 2015 e setembro de 2019 provenientes de uma propriedade de bovinocultura de leite com abortamentos por *Neospora caninum*.

Feto	Mês de envio	Idade gestacional	Sexo
2015			
1	Setembro	6 meses	Fêmea
2016			
2	Junho	8 meses	Fêmea
3	Agosto	7 meses	Macho
4	Agosto	5 meses	Fêmea
2017			
5	Outubro	6 meses	Macho
6	Outubro	7 meses	Macho
2019			
7	Abril	4 meses	Macho
8	Setembro	6 meses	Fêmea
9	Setembro	5 meses	Macho
10	Setembro	3 meses	Macho

Foram realizadas 3 visitas à propriedade para avaliação das condições epidemiológicas e coleta de sangue para análise sorológica. A primeira visita ocorreu em fevereiro de 2016 na qual realizou-se coleta de sangue de 26 vacas, todas em lactação, sendo 13 com histórico de distúrbios reprodutivos (aborto e/ou retorno ao cio) e outras 13 sem desordens, além de sangue de 2 cães da propriedade. As amostras de soro de todos os animais foram analisadas por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para pesquisa de IgG contra *N. caninum* [5] utilizando como antígeno taquizoítos da cepa NC1². Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram reação na diluição 1:100 (bovinos) e 1:50 (caninos), as quais foram diluídas seriadamente na base dois, até a diluição máxima reativa final para a titulação. Soros-controle positivo e negativo previamente conhecidos foram utilizados.

A segunda visita foi realizada em novembro de 2017, na qual foram coletadas amostras de sangue de todo o plantel de fêmeas, composto por 162 animais (37 bezerras e 125 vacas), além de um canino. Essas amostras foram submetidas a ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos específicos contra *N. caninum* (Kit³ Civtest Bovis). Amostras com padrão S/P < 6% foram consideradas negativas; padrão S/P > 6% e < 10% suspeitas; padrão S/P > 10% positivas. A terceira visita ocorreu em julho de 2019 para realização de uma nova análise epidemiológica, evidenciando a situação dos distúrbios reprodutivos apresentados e avaliando medidas de controle e prevenção da doença.

A propriedade tem por atividade a bovinocultura de leite com sistema de ordenha mecânica canalizada, com plantel de aproximadamente 170 bovinos da raça Jersey, Holandês e Jersolando em sistema semiconfinado, com alimentação à base de silagem de milho, concentrado e pastagens cultivadas. De acordo com o produtor, desde o ano de 2014 houve um aumento significativo no número de abortos, sendo que, em 2014, de 70 vacas prenhes, aproximadamente 20 (28,6%) abortaram; no ano de 2015, aproximadamente 10 (14,29%); no ano de 2016 menos de 5 (< 7,14%); no ano de 2017, 4 vacas abortaram (5,71%); no ano de 2018, foi observado que 11 vacas abortaram (15,71%) e, em 2019, ocorreram 4 abortamentos (5,71%). Os abortos eram registrados durante todo o ano, com maior intensidade no verão, e, predominantemente, entre o quarto e o sexto mês de gestação. Não era dado um destino adequado aos restos fetais e placentários, sendo que esses se decompunham no meio ambiente. A propriedade possui piquete maternidade.

Também foi relatado um aumento da taxa de retorno ao cio, que ocorria o ano todo, sendo que aproximadamente 50% das vacas foram inseminadas por até 5 vezes para obter uma cria. Tanto vacas primíparas quanto múltiparas apresentavam distúrbios reprodutivos. No manejo reprodutivo, eram utilizados inseminação artificial e repasse com touro, e todas as fêmeas de reposição eram nascidas na propriedade. As vacas eram vacinadas a cada 3 meses para *Leptospira* sp. e, anualmente, para os vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR). Realizavam-se também exames periódicos para brucelose e tuberculose, com resultados negativos.

Na avaliação macroscópica dos fetos foram observadas apenas lesões inespecíficas, como edema subcutâneo por toda extensão toracoabdominal; além disso, os fetos 7 e 10, abortados no terceiro e quarto mês de gestação, respectivamente, apresentavam ressecamento e desidratação difusa de todos os tecidos, alterações compatíveis com mumificação fetal.

Na avaliação histopatológica, o encéfalo demonstrou áreas de gliose e necrose do neurópilo, circundada por infiltrado de linfócitos e plasmócitos focal a multifocal, discreto a moderado, caracterizando encefalite necrotizante mononuclear, em cinco fetos (Figura 1A). Na musculatura esquelética e cardíaca havia infiltrado de linfócitos e plasmócitos em miofibras ou em miocárdio, multifocal discreto, caracterizando miosite e miocardite mononucleares, em 4 e 3 fetos, respectivamente (Figura 1B). A PCR para *N. caninum* foi positiva em 5 fetos (Tabela 2) e todos foram negativos para *T. gondii*.

Tabela 2. Resultados de análises histopatológica e molecular de fetos bovinos abortados em uma propriedade de bovinocultura de leite acometida por *Neospora caninum*.

Feto	Lesões Histopatológicas			PCR
	Encéfalo	Músculo	Coração	<i>N. caninum</i>
1	+	-	-	positivo
2	-	-	-	negativo
3	+	+	-	negativo
4	+	+	+	positivo
5	+	-	-	positivo
6	+	-	+	negativo
7	-	-	-	negativo
8	-	+	-	positivo
9	-	+	+	positivo
10	-	-	-	negativo
Total	5	4	3	5

Intensidade de lesão: (+) discreta; (-) ausente.

Os resultados da RIFI revelaram que 50% (13/26) das vacas avaliadas foram soropositivas para *N. caninum*, com títulos variando de 100 a 1600, sendo que 8 soropositivas (61,53%) apresentavam histórico de transtornos reprodutivos, e 5 não possuíam alterações (38,47%) [Tabela 3]. As vacas soropositivas que apresentavam histórico de problemas reprodutivos tiveram variações quanto à idade e à ordem de parto. Três tinham 2,5 anos, eram primíparas, abortaram a primeira cria e estavam prenhes; 3 apresentavam aproximadamente 5 anos, com uma abortando nas primeira e terceira gestações; outra, nas segunda e quarta e a outra abortou apenas na terceira gestação. Os outros 2 animais soropositivos com transtornos reprodutivos tinham 7 e 9 anos de idade, com 2 partos seguidos de 2 abortos e 3 partos seguidos de 2 abortos, respectivamente. As 5 vacas soropositivas e sem histórico de desordens reprodutivas tinham entre 2 e 11 anos com diferentes ordens de parto.

Os resultados de ELISA identificaram 26,54% (43/162) do rebanho como reagente para *N. caninum* e 8,02% (13/162) como suspeito (Tabela 4). Dos animais que apresentaram reação na análise, 30,4% (17/56) apresentaram distúrbio reprodutivo, sendo que 70,6% (12/17) abortaram e tiveram vários episódios de retorno ao cio, 17,6% (3/17) possuíam entre 5 e 15 retornos ao cio sem prenhez, e 11,8% (2/17) abortaram sem histórico de retorno ao cio. Ainda, 76,47% (13/17) eram múltiparas com idade variando de 3 a 7 anos, com 7 vacas abortando 1 vez, e 4 abortando 2 vezes.

As primíparas perfizeram os 23,53% (4/17) restantes, com idade entre 2 e 3 anos, 3 com 1 aborto e 1 com múltiplos retornos ao cio sem prenhez.

Dos animais que eram reagentes e não apresentaram histórico de abortamento, 15,38% (6/39) eram bezerras de até 12 meses; 25,64% (10/39) eram novilhas de 14 a 24 meses; 23,07% (9/39) eram primíparas variando de 2 anos a 2 anos e 8 meses e 35,89% (14/39) eram múltíparas com idade de 3 a 12 anos. Os 2 cães da propriedade que foram avaliados na primeira análise apresentaram sorologia negativa para *N. caninum*. Na segunda coleta, esses 2 cães não residiam mais na propriedade e o cão avaliado na segunda análise também não apresentou reação no teste. Os cães desta propriedade circulavam livremente entre os bovinos, ambientes de ordenha e manejo de animais, com livre acesso às pastagens e às fontes de água (Figura 2A e 2B). Outras propriedades

vizinhas também possuíam cães que eventualmente adentravam na propriedade, e, por localizar-se em uma região de mata Atlântica, carnívoros selvagens também frequentemente eram avistados nas imediações da propriedade.

As estratégias de controle que estão sendo adotadas são a reposição apenas com animais nascidos na propriedade e o impedimento do contato direto entre cães da propriedade com instalações de ordenha e restos placentários e fetais, destinando estes de forma adequada, incinerando ou enterrando, ou seja, tais tecidos não são mais deixados no ambiente em decomposição. Houve o descarte de 30 bovinos da propriedade, sendo que 25 apresentavam distúrbios reprodutivos. Todas as fêmeas jovens, filhas de vacas soropositivas, continuaram na propriedade para reposição do lote de vacas em lactação. Durante o período avaliado, todos os cães foram retirados da propriedade.

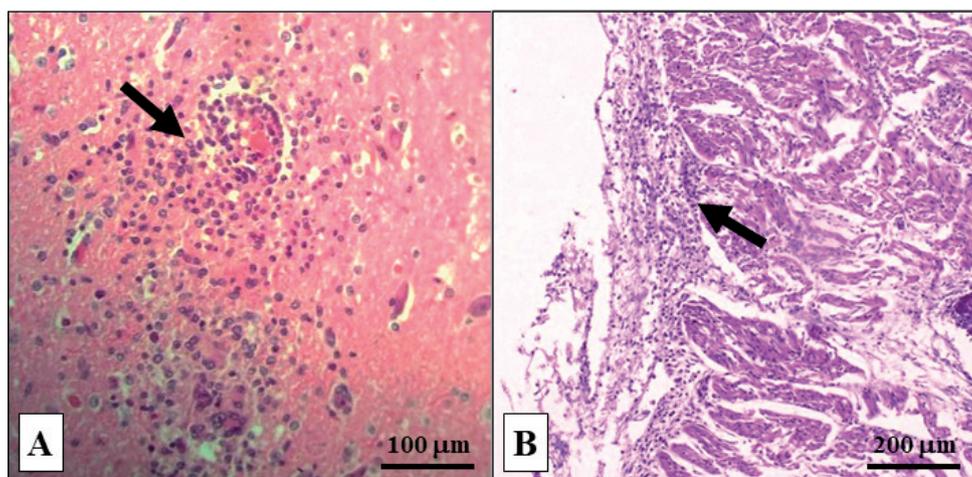


Figura 2. Abortamento em bovinos por *Neospora caninum* em uma propriedade de bovinos leiteiros. A- Encefalite necrotizante mononuclear focal discreta (seta) [HE; 10x]. B- Miocardite linfoplasmocitária multifocal discreta (seta) [HE; 4x].



Figura 2. Abortamento em bovinos por *Neospora caninum* em uma propriedade de bovinos leiteiros. A- Cão da propriedade com livre acesso às instalações de ordenha. B- Cães da propriedade com acesso às pastagens dos bovinos.

Tabela 3. Vacas leiteiras soropositivas com e sem histórico de distúrbios reprodutivos, provenientes de uma propriedade de bovinocultura de leite com abortamentos por *Neospora caninum*, de acordo com o título de anticorpos observado na Reação de Imunofluorescência Indireta (ponto de corte ≥ 100).

Distúrbio reprodutivo	Título de anticorpos anti- <i>N. caninum</i>					Negativo	Total
	100	200	400	800	1600		
Aborto e/ou retorno ao cio	1	4	2	1	0	5	13
Sem transtornos reprodutivos	2	1	0	1	1	8	13
Total	3	5	2	2	1	13	26

Tabela 4. Vacas leiteiras avaliadas por ELISA para *Neospora caninum* segundo a reatividade e a apresentação de distúrbios reprodutivos, provenientes de uma propriedade de bovinocultura de leite com abortamentos por neosporose.

Distúrbio reprodutivo	ELISA			Total
	Não reagente S/P (0%)	Reagente suspeito S/P (6 a 10%)	Reagente S/P (>10%)	
Aborto e/ou retorno ao cio	17	4	13	34
Sem transtornos reprodutivos	89	9	30	128
Total	106	13	43	162

DISCUSSÃO

Este relato descreve a infecção por *Neospora caninum* em vacas de leite no sul do estado de Santa Catarina. No Brasil, é considerado importante agente abortivo em bovinos [2,6,18]. No entanto, de acordo com a literatura consultada, esse é o segundo relato de abortamento por *N. caninum* em bovinos no estado catarinense [14]. Em um estudo de soroprevalência para *N. caninum* em vacas leiteiras na região oeste de SC observou-se uma ocorrência de 7,7% (23/299) de animais soropositivos [13]. Em outro estudo em vacas leiteiras do município de Lages/SC, encontrou-se 23,1% (86/373) com titulação contra *N. caninum* positiva [16]. Já na região serrana do estado, uma pesquisa determinou uma prevalência de 13,81% (70/507) [19].

No presente estudo, o diagnóstico de neosporose foi realizado por meio de avaliação epidemiológica, lesões histológicas e detecção do agente por PCR associados ao monitoramento sorológico. As lesões histológicas (encefalite, miocardite e miosite mononuclear) observadas em 7 dos 10 fetos analisados são indicativas da infecção por *N. caninum* e são compatíveis com lesões observadas em outros estudos [2,6,18]. A triagem sorológica é importante para complementar o diagnóstico de abortamento por *N. caninum* e para auxiliar no controle do agente nos rebanhos [10,15]. Para isso, as técnicas sorológicas mais utilizadas são RIFI e ELISA [3,4,15]. No presen-

te trabalho, utilizaram-se as 2 técnicas em diferentes períodos, para o rastreamento sorológico. Para avaliar o nível de anticorpos específicos contra este patógeno no rebanho, indica-se no mínimo a avaliação de 10 animais entre os que apresentam distúrbios reprodutivos e os saudáveis [15]. Neste trabalho, a quantidade de amostras foi considerada adequada para rastreamento sorológico na primeira análise por RIFI, e, na análise por ELISA, todos os animais foram avaliados, permitindo a completa análise do rebanho e auxiliando no controle direto deste distúrbio na propriedade.

No presente levantamento, a maioria dos abortamentos ocorreu entre o quarto e o sexto meses de gestação. Estes achados são compatíveis com os descritos por Sager *et al.* [20] que descrevem maior frequência entre o quinto e o sétimo meses de gestação, assim como Orlando *et al.* [18] entre o quinto e sexto, embora o abortamento possa ocorrer em qualquer período da gestação [4,15]. Foi observado que vacas multíparas, com mais de 3 anos, foram as mais acometidas, havendo maior frequência de soropositividade nesta faixa etária. Estudos de soroprevalência para *N. caninum* demonstram que fêmeas bovinas acima de 24 meses apresentam maior soropositividade, sugerindo que a idade é um importante fator associado [13,14,19].

O contato direto entre cães e bovinos em instalações ou pastagens, desempenha importante papel na transmissão e manutenção do protozoário nos rebanhos. Um estudo realizado no oeste de Santa Catarina constatou

que, em propriedades que possuíam apenas um cão, havia menor probabilidade de transmissão de *N. caninum* aos bovinos [13]. No presente relato, os cães da propriedade tinham contato com os bovinos, mas foram negativos na sorologia. A associação entre o estado sorológico dos bovinos e a presença de cães soropositivos também já foi descartada anteriormente [12]. Um estudo sorológico avaliou a soroprevalência em vacas de leite e cães e constataram que a presença de cães positivos não afetou a prevalência do agente nos bovinos [16].

Nas estratégias de controle, adotadas no presente estudo, foi observado que as principais mudanças instituídas foram o descarte de algumas das vacas com distúrbios reprodutivos e a remoção de todos os cães da propriedade. São métodos eficazes no controle porque estão relacionados à interrupção do ciclo de transmissão de *N. caninum* [8]. Além disso, houve mudanças no destino de restos fetais e placentários, que é uma prática recomendada no controle de tal distúrbio reprodutivo [8,10]. No entanto, todas as fêmeas filhas de vacas soropositivas permaneceram como animais de reposição na propriedade, o que é contraindicado por favorecer a manutenção da infecção pelo protozoário no rebanho, visto que vacas soropositivas, mesmo sem apresentar sinais clínicos, podem continuar sendo portadoras do agente [15] e transmiti-lo de forma vertical.

Através deste estudo, pode-se concluir que *N. caninum* é um importante agente causador de abortamento, levando a perdas econômicas na produção leiteira e prejudicando a manutenção do plantel, indicando que surtos de abortamentos e fatores predisponentes devem ser melhor investigados. O acompanhamento anual evidenciou a perpetuação e manutenção do protozoário no rebanho, destacando a importância de medidas de controle eficazes.

MANUFACTURERS

¹Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda. Diadema, SP, Brazil.

²Imunodot Diagnósticos Ltda. Jaboticabal, SP, Brazil.

³Hipra Saúde Animal Ltda. Porto Alegre, RS, Brazil.

Funding. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC, 05/2018 - Nº: 2019TR702) and by Programa de Apoio à Pós-Graduação maintained by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROAP/CAPES, Finance code 001).

Ethical approval. The procedures used in the research were approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of the Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), registered under the protocol number 5990060819 (ID 001000).

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Anderson M.L., Andrianarivo A.G. & Conrad P.A. 2000. Neosporosis in cattle. *Animal Reproduction Science*. 60: 417-431.
- 2 Antoniassi N.A., Juffo G.D., Santos A.S., Pescador C.A., Corbellini L.G. & Driemeier D. 2013. Causas de aborto bovino diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS de 2003 a 2011. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 33(2): 155-160.
- 3 Camillo G., Cadore G., Cezar A.S., Toscan G., Braunig P., Sangioni L.A. & Vogel F.S. 2010. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos de leite do sudoeste do estado do Paraná. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 62(6): 1511-1513.
- 4 Cerqueira-Cézar K.C., Calero-Bernal R., Dubey J.P. & Gennari S.M. 2017. Tudo sobre neosporose no Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 26(2): 253-279.
- 5 Conrad P.A., Sverlow K., Anderson M., Rowe J., Bondurant R., Tuter G., Breitmeyer R., Palmer C., Thurmond M., Adams A., Dubey J.P., Duhamel G. & Barr B. 1993. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 5: 572-578.
- 6 Corbellini L.G., Pescador C.A., Frantz F., Wunder E., Steffen D., Smith D.R. & Driemeier D. 2006. Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection: importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil. *Veterinary Journal*. 172(1): 114-120.
- 7 Dubey J.P. 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean Journal of Parasitology*. 41(1): 1-16.
- 8 Dubey J.P., Schares G. & Ortega-Mora L.M. 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*. 20(2): 323-367.

- 9 Fávero J.F., Silva A.S., Campigotto G., Machado G., Barros L.D., Garcia J.L., Vogel F.F., Mendes R.E. & Stefani L.M. 2017. Risk factors for *Neospora caninum* infection in dairy cattle and their possible cause-effect relation for disease. *Microbial Pathogenesis*. 110: 202-207.
- 10 Guido S., Katzer F., Nanjiani I., Milne E. & Innes E.A. 2016. Serology-Based Diagnostics for the Control of Bovine Neosporosis. *Trends in Parasitology*. 32(2): 131-143.
- 11 Homan W.L., Vercammen M., Braekeleer J. & Verschueren H. 2000. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *International Journal for Parasitology*. 30(1): 69-75.
- 12 Locatelli-Dittrich R., Machado Jr.P.C., Fridlund-Plugge N., Richartz R.R.T.B., Montiani-Ferreira F., Patrício L.F.L. Carvalho Patrício M.A., Joineau M.G. & Pieppe M. 2008. Determinação e correlação de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos e cães do Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 17: 191-195.
- 13 Lorenzett M.P., Lucca N.J., Henker L.C., Machado G., Gomes D.C., Mendes R.E., Driemeier D. & Casagrande R.A. 2016. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros no estado de Santa Catarina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. 38(3): 243-249.
- 14 Macedo C.A.B., Macedo M.F.S.B., Miura A.C., Taroda A., Cardim S.T., Innes E.A., Katzer F., Cantón G.J., Chianini F., Headley S.A. & Garcia J.L. 2017. Occurrence of abortions induced by *Neospora caninum* in dairy cattle from Santa Catarina, southern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 26(3): 292-298.
- 15 McAllister M.M. 2016. Diagnosis and control of bovine neosporosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 32(2): 443-463.
- 16 Moura A.B., Souza A.P., Sartor A.A., Bellato V. & Teixeira E.B. 2012. *Neospora caninum* antibodies in dairy cattle of Lages Municipality, Santa Catarina State, Brazil. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 44: 117-122.
- 17 Müller N., Zimmermann V., Hentrich B. & Gottstein B. 1996. Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*. 34(11): 2850-2852.
- 18 Orlando D.R., Costa C.R., Soares B.A., Nascimento L.C., Oliveira N.C.S. & Varaschin M.S. 2013. Abortos por *Neospora caninum* em bovinos do sul de Minas Gerais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 33(11): 1332-1338.
- 19 Padilha M.A.C., Wasen G., Souza A.P., Milczewski V., Luz T.V.B., Sartor A.P., Farias J.A. & Moura A.B. 2017. *Neospora caninum*: seroprevalence in beef cattle in the mountainous region of Santa Catarina, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*. 38: 273-281.
- 20 Sager H., Fischer I., Furrer K., Strasser M., Waldvogel A., Boerlin P., Audigé L. & Gottstein B.A. 2001. Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. *Veterinary Parasitology*. 102: 1-15.