



PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Neosporose canina: biologia, etiologia, sinais clínicos, diagnóstico e controle

Bruna Alves Devens

Médica Veterinária - Universidade Federal de Viçosa

Mestre em Medicina Veterinária - Universidade Federal de Viçosa

Professora Universitária UNESC (Centro Universitário do Espírito Santo)

brudevens@yahoo.com.br

Resumo

Neospora caninum é um protozoário que foi reconhecido em cães em 1984, trata-se de enfermidade neurológica que foi diagnosticada em filhotes de cães, os quais apresentavam encefalomielite, miosite e paresia dos membros. Parasitos livres foram encontrados no cérebro e nos músculos dos cães, e formas encistadas no cérebro, que se assemelhavam a *Toxoplasma gondii*, porém, os testes sorológicos realizados foram negativos para o mesmo. Pouco tempo depois, tornou-se a analisar os cortes histológicos dos cães mortos em 1984, onde foi identificado um novo gênero, *Neospora*, e a nova espécie *Neospora caninum*. A determinação baseou-se pelos sinais clínicos os quais foram relacionados à paresia e paralisia dos membros pélvicos os quais não são observados na toxoplasmose. Assim como, notou-se que a espessura da parede do cisto de *N. caninum* é menos delgada que a de *T. gondii*.

Palavras-chave: cães, parasitologia, *Neospora caninum*

Canine neosporosis: biology, etiology, clinical signs, diagnosis and control

Abstract

Neospora caninum is a protozoan that was recognized in dogs in 1984, it is neurological illness which was diagnosed in dog pups, which had myositis and parturient of members. Free parasites were found in the brain and muscles of the dogs, and encysted in the brain, which is the *Toxoplasma gondii* resembled, however, the serological tests carried out were negative for the same. Shortly afterwards, became the analyze cuts histological dogs killed in 1984, where he was identified a new genre *Neospora*, and new species *Neospora caninum*. The determination based by clinical signs which were related to parturient and paralysis of members which are not deliveries practice may be observed in toxoplasmosis. As well as playing the cyst wall thickness *N. caninum* is less thin than *T. gondii*.

Keywords: dogs, parasitology, *Neospora caninum*

1. Biologia e Etiologia

A neosporose é causada por *Neospora caninum* que foi descrito por DUBEY em 1988, trata-se de um parasito intracelular obrigatório¹. É um protozoário do filo Apicomplexa, classe Sporozoea, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae, que pode infectar canídeos selvagens, domésticos, ruminantes e eqüinos². É um parasito morfologicamente semelhante a *Toxoplasma gondii*, diferindo deste pela imunogenicidade e patogenicidade³. *N. caninum* apresenta roptrias, multiplica-se por endodiogenia e possui formato ovóide, ou lunar⁴. Os parasitos são encontrados em células do sistema nervoso, macrófagos, fibroblastos, células do endotélio vascular, miócitos, células do epitélio dos túbulos renais e hepatócitos dos animais infectados⁵. Os taquizoítos possuem em sua composição amilopectina, micronema, núcleos, roptrias e grânulo denso⁶.

Os cistos teciduais são arredondados ou elípticos e têm sido encontrados, geralmente, em células do sistema nervoso, como cérebro, medula espinhal, nervos, retina e musculatura esquelética dos hospedeiros intermediários². Foram descritos cistos tissulares de *N. caninum* em cérebro e lesões multifocais de miosite não supurativa com taquizoítos em sistema nervoso, coração e musculatura esquelética de cães com neosporose⁷. No interior dos cistos encontram-se os bradizoítos, os quais são delgados, contendo as mesmas organelas dos taquizoítos⁸.

Os oocistos contêm dois esporocistos com quatro esporozoítos cada, esporulando no meio ambiente, em 24 horas⁹.

Os cães e coiotes são hospedeiros definitivos de *N. caninum*^{9,10}. Possui diversos hospedeiros intermediários, como bovino, equino, cabra, ovelha, búfalo, veado e antílope³. Tem-se o rato doméstico (*Rattus norvegicus*), a raposa e guaxinim também como hospedeiros intermediários^{11,12,13}. Cães e coiotes infectam-se ingerindo tecidos de bovinos e de outras espécies que contenham cistos, além da ingestão de oocistos esporulados livres no meio-ambiente, denominada de transmissão horizontal. A transmissão vertical ou transplacentária é a forma mais freqüente de infecção por *N. caninum*, sendo uma importante forma de manutenção do agente nos rebanhos¹⁴. A transmissão vertical também existe nos hospedeiros intermediários, neles também ocorre à transmissão horizontal pela ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos e cistos teciduais³.

As galinhas são animais cosmopolitas que podem ser usadas na alimentação dos cães. Esses animais são hospedeiros intermediários para *N. caninum*, demonstrando a sua importância epidemiológica já que confere uma distribuição ainda mais ampla do protozoário e a possibilidade de outras espécies de aves também serem naturalmente infectadas¹⁵.

A transmissão pela conjuntiva ocular é uma nova rota de infecção de *N. caninum* nessa via existe a produção sistêmica de anticorpos e alterações patológicas tanto nas vacas prenhas como no feto¹⁶. Assim como foi demonstrado um potencial da contaminação via inseminação artificial, e via

intra-uterina pelo contato do sêmen contaminado¹⁷. Um estudo realizado com camundongos demonstrou que os machos imunodeficientes mantinham os taquizoítos nos testículos e vesícula seminal, ocorrendo à transmissão venérea em fêmeas imunodeficientes e por conseqüência à transmissão transplacentária para os fetos¹⁸.

2. Sinais Clínicos

Cães de qualquer idade podem desenvolver a neosporose, pode-se manifestar de forma generalizada, com vários órgãos envolvidos, inclusive a pele, a qual se observa lesões cutâneas. Ou pelas formas mais graves que são naqueles animais jovens ou filhotes que foram congenitamente infectados, onde apresentam paresia dos membros pélvicos, a qual pode progredir para paralisia. Apresentam dificuldade na deglutição, com paralisia da mandíbula, atrofia muscular e falha cardíaca. Os sinais clínicos variam de acordo com a magnitude da lesão no sistema nervoso central e periférico³.

3. Diagnóstico

A presença de anticorpos num animal indica a exposição ao parasito ou a um parasito estritamente relacionado passível da reação cruzada, não indicando necessariamente a existência de uma infecção ativa¹⁹. O diagnóstico da neosporose baseia-se em exames histopatológicos dos fetos abortados, analisando as características das lesões dos tecidos fetais com testes de imunoperoxidase e PCR (Reação de Polimerase em Cadeia).

Realiza-se a observação microscópica das lesões dos tecidos, principalmente no cérebro, no entanto, não se considera um procedimento sensível. Os testes sorológicos utilizados com maior freqüência são ELISAs (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), imunofluorescência e imunoblot ^{20, 21,22}.

A imunofluorescência indireta foi o primeiro teste sorológico desenvolvido sendo considerada a técnica mais comumente utilizada dos diagnósticos sorológicos².

Os diferentes tipos de ELISA baseiam-se em extrato de taquizoítos, os taquizoítos inteiros, os antígenos de taquizoítos incorporados a um complexo imunoestimulante ou antígenos recombinantes²³. Há um grande número de testes sorológicos que tem sido desenvolvidos para a detecção dos anticorpos contra *N. caninum*, mas não são generalizadamente aceitos. O direcionamento na escolha do ELISA deve-se a uma análise de um número maior de soros e a sua realização em um curto espaço de tempo. Ao mesmo tempo, os ELISAs não são testes padronizados e não possuem uma titulação de corte, tornando complexa e subjetiva a interpretação dos seus resultados. O ELISA de competição, utilizando anticorpos monoclonais dirigido ao antígeno de superfície de 65 kDa do taquizoíto é um método mais específico, por usar proteínas purificadas específicas de *N. caninum*^{2,24,25}. *Neospora caninum* possui proteínas de superfície que são responsáveis pelo processo de adesão e invasão na célula hospedeira. Dentre elas tem-se a NcSRS2, que é predominante nos isolados do parasito e utilizada como antígeno para a realização do ELISA, a qual se observou uma alta sensibilidade e especificidade. Estão sendo estudados os testes de ELISAs que distinguem as infecções recentes das infecções crônicas^{26,27}.

O NAT teste de aglutinação para anticorpos anti-*N. caninum*, não exige anticorpo secundário marcado, sendo considerado de simples execução²⁸.

A detecção dos oocistos de *N. caninum* nas fezes também pode ser realizada. No entanto, por existir outros coccídeos que possuem a mesma morfologia de *Neospora*, essa metodologia torna-se complexa de ser adotada. Diante disso, a descrição por métodos moleculares do parasito nas fezes, tem sido descrito, seguindo a técnica de PCR. Porém, a sensibilidade da PCR é baixa pelo pequeno número de oocistos encontrados nas fezes dos animais. *N. caninum* e *Hammondia heydorni* apresentam oocistos morfologicamente indistinguíveis, no entanto, as técnicas de diagnóstico molecular e o seqüenciamento do DNA são utilizados na diferenciação desses dois gêneros. Assim como pode ser realizado a identificação da quantidade do DNA de *N. caninum* presente nos tecidos infectados por meio de Western Blotting ou

Immunoblotting, que são testes de alta sensibilidade e especificidade, por reconhecerem quatro imunodomínios de 17, 29, 30 e 37 kDa de *N. caninum*, porém se sabe que não são técnicas de imunodiagnóstico para serem utilizadas na rotina^{29,30,31}.

A neosporose é uma doença emergente que afeta animais em todo o mundo. Assim, é necessário um diagnóstico preciso para comprovar ou descartar a presença de *N. caninum* no animal. Além da sua importância na adoção de medidas adequadas de controle e estabelecimento da epidemiologia da infecção²¹.

3.1.Reação de Imunofluorescência Indireta

A técnica de RIFI foi a primeira técnica sorológica aplicada a neosporose e tem sido muito utilizada como prova de referência, sendo DUBEY o pioneiro nessa metodologia para *N. caninum*¹. Os taquizoítos são cultivados em células VERO (figura 1) e dessa cultura obtêm-se os antígenos para o preparo das lâminas para serem utilizados na realização da técnica de RIFI. Contudo, existe uma série de dificuldades relativas à técnica, como a subjetividade na interpretação dos resultados e a necessidade de experiência prévia do profissional para a realização da técnica e a sua leitura detalhada em microscópio de imunofluorescência^{2, 25}. O método de RIFI já foi utilizado no diagnóstico da neosporose em várias espécies animais: cães, raposas, gatos, bovinos, ovinos, caprinos, búfalos, eqüinos, roedores e primatas². A RIFI é considerada como padrão ouro, ou seja, padrão para calibrar e comparar com os novos testes adotados. É usada principalmente na detecção de anticorpos direcionados aos antígenos da superfície celular do parasito (figura 2). O método de RIFI é altamente sensível e identifica todas as amostras reagentes com o anticorpo secundário marcado com fluoresceína^{19,25}.

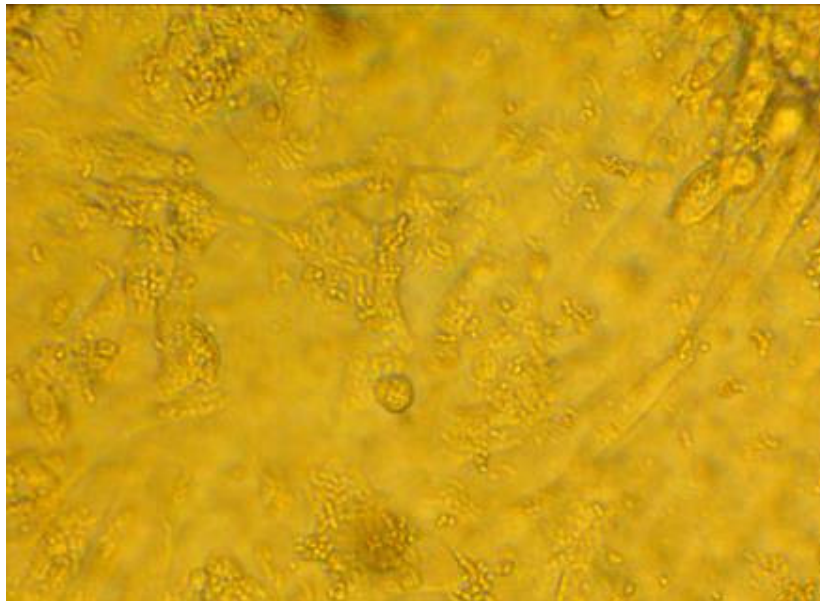


Figura 1: Cultura de células VERO (Rim de Macaco Verde Africano) para manutenção de taquizoítos de *Neospora caninum*. Aumento de 400 x em microscópio invertido. Fonte: Bruna Alves Devens-10-02-2009.

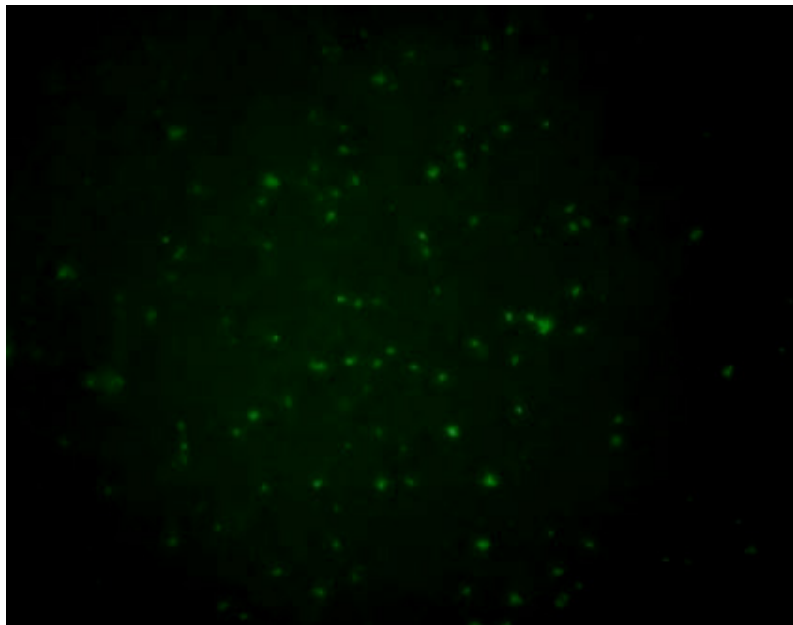


Figura 2: Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) de um cão positivo para *Neospora caninum*, aumento de 400x, microscópio de imunofluorescência. Fonte: Bruna Alves Devens:18-08-2009.

3.2. Western Blot

O método de Western Blot identifica especificamente as reações antígeno-anticorpo direcionadas às proteínas específicas. O Western Blot tem sido muito utilizado como teste confirmatório para *Neospora caninum* em muitas espécies animais, sendo considerado um teste específico. Assim, quando se associa esta técnica aos métodos de RIFI ou ELISA, a prevalência da neosporose diminui, sugerindo que a infecção é menos comum quando comparado aos resultados dos demais testes sorológicos²³. Os métodos sorológicos devem ser utilizados com cautela no diagnóstico do abortamento por *N. caninum*, sendo a confirmação realizada pela demonstração do parasito ou do seu DNA no feto, preferencialmente, em associação com a patologia característica da neosporose³².

4. Imunologia da Neosporose

A resposta a *N. caninum* é dependente de respostas imunes mediadas por citocinas pró-inflamatórias produzidas por linfócitos T CD4+ tipo 1 (Th1). Durante a infecção aguda, IL-12 é produzida por células fagocitárias infectadas, diferenciando linfócitos T CD4+ e CD8+ em subpopulações produtoras de citocinas pró-inflamatórias e estimulando células NK a produzirem IFN- γ (interferon gama), ativando macrófagos e eliminando células infectadas pelo parasito, por meio de mecanismos mediados por óxido nítrico⁵.

A importância das células T na infecção por *N. caninum* foi demonstrada quando camundongos atímicos apresentaram 100% de mortalidade antes de completar 30 dias de infecção. A maior susceptibilidade destes animais sugere que as células T têm papel chave na supressão da propagação dos taquizoítos. Em contrapartida, a adição de IL-4 em culturas de macrófagos infectados com *N. caninum* e tratados com IFN- γ aumentou a viabilidade dos taquizoítos. Conseqüentemente, o balanço de IFN- γ e IL-4 é fundamental para o controle da infecção²⁷.

A infecção natural e experimental nos animais domésticos é similar à resposta imune em camundongos, a qual foi observada principal resposta na

proteção contra *N. caninum* que foi a imunológica do tipo T helper 1 (Th1) que se caracteriza por IFN- γ e IgG, que inibem a multiplicação dos taquizoítos²⁸. Apesar dos bovinos demonstrarem sinais clínicos durante a infecção pelo *N. caninum*, os maiores problemas surgem durante a gravidez devido às mudanças no perfil das citocinas. A resposta imune predominantemente Th1 é incompatível com o sucesso da gestação³³. Para que o feto e seus anexos possam ser reconhecidos como “próprios” durante o período gestacional, há uma imunomodulação da resposta levando à expressão de citocinas para um padrão Th2 nos linfócitos T CD4+, sendo este perfil induzido principalmente pelos altos níveis de progesterona mantidos durante a gestação³⁴.

A imunomodulação da resposta a *N. caninum* é mediada por IL-10, que possui efeitos inibitórios sobre a atividade microbicida de macrófagos ativados por IFN- γ diferenciação de clones Th1, produção de IFN- γ por células NK e linfócitos T CD4+ e CD8+, além da produção de IL-12 por células acessórias, sendo altamente expressa em astrócitos advindos de cultivo primário infectados por *N. caninum*³⁵.

A fêmea é hábil a uma resposta efetiva Th1, com liberação de IL-2, IL-12 e IFN- γ que podem causar o aborto do feto no primeiro trimestre da gestação. No segundo trimestre da gestação, predomina a combinação da resposta Th2 e citocinas. A IL-10, liberada pelas células trofoblásticas do feto, diminui a taxa da produção de IFN- γ durante a infecção, o que estimula a multiplicação do parasito e infecção do feto³⁴.

A neosporose depende do equilíbrio entre a capacidade do taquizoíto em penetrar e multiplicar na célula hospedeira e a habilidade do hospedeiro na inibição do parasito. Assim, no primeiro trimestre da gestação o feto está vulnerável, pois o timo, baço e linfonodos periféricos estão em formação. Somente no terço final, que se tornam imunocompetentes e respondem ao parasito, porém esses animais nascem infectados e transmitem o parasito para as futuras gerações. A participação efetiva das diferentes classes de imunoglobulinas na resistência à infecção por *N. caninum* é incerta. Especula-se que os anticorpos tenham um papel auxiliar no controle da infecção,

participando da neutralização e destruição de taquizoítos extracelulares, podendo, assim, reduzir a disseminação do agente³⁴.

5. Controle da Neosporose

A fim de prevenir a infecção por *N. caninum* deve-se ficar atento com as medidas de controle, as quais seriam evitar que os cães contaminem o alimento e a água dos bovinos com as fezes, evitar que os cães alimentem-se com a placenta bovina, e evitar a presença dos roedores nas fazendas. Não há indicativos de agentes quimioterápicos efetivos que podem ser usados para prevenir a transmissão vertical da neosporose. Além disso, apesar dos avanços imunobioquímicos no estudo de *N. caninum*, ainda não foi elaborada uma vacina eficiente para a prevenção da doença^{36, 37}.

6. Conclusão

Ainda há muitos desafios para se chegar a vacinas efetivas contra a neosporose, é preciso uma melhor compreensão da relação do hospedeiro e parasito durante a gravidez, desenvolver modelos de animais apropriados e protocolos para testar a eficácia de futuros candidatos a vacinas e a determinação das suas implicações imunológicas na infecção congênita. Os diferentes problemas apresentados, como a expansão do espectro dos hospedeiros de *N. caninum*, a indução das reações cruzadas por protozoários afins, como *Hammondia heydorni* e *Neospora hughesi*, outras prováveis vias de transmissão do parasito e a falta de vacinas eficientes torna-se ainda mais complexo o estudo sobre a neosporose^{38,39}.

7. Referências Bibliográficas

- 1- DUBEY, J.P., CARPENTER J.L., SPEER, C.A., TOPPER M.J. AND UGGLA, A. New recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.192, p.1269 –1285, 1988.
- 2-DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; ADAMS, D.S.; GAY, J.M.; BASZLER, T.V.; BLAGBURN, B. L.; THULLIEZ, P. 1996. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. American Journal of Veterinary Research, Chicago, v.57, n.3, p.329-336.

DEVENS, B.A. Neosporose canina: biologia, etiologia, sinais clínicos, diagnóstico e controle. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 40, Ed. 145, Art. 975, 2010.

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

4-BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1497-1507, 1999.

5-HEMPHIL, A.; GOTTSTEIN, B. Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. **Parasitology Research**, Berlim, v.82, p.497-504, 1996.

6- KANG S.W.; LEE E. H.; JEAN Y.H.; CHOE S.E.; QUYEN D. V.; LEE M.S. The differential protein expression profiles and immunogenicity of tachyzoites and bradyzoites of in vitro cultured *Neospora caninum*. **Parasitology Research** v.103, p. 905-913, 2008

7-DUBEY, J.P.; DOROUGH, K.R.; JENKINS, M.C.; LIDDELL, S.; SPEER, C.A.; KWOW, O.C.H.; SHEN, S.K. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1293-1304, 1998.

8-JARDINE, J.E. The ultra structure of bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs, absence or distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. **Veterinary Parasitology**, v.62, p.231-240, 1996.

9-McALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A.; McGUIRRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.1473-1478, 1998.

10-GONDIM, L.F.; McALLISTER, M.M.; PITT, W.C.; ZEMLICKA, D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.34, n.2, p.159-161, 2004.

11-HUANG, C.C.; YANG, C.H.; WATANABE, Y.; LIAO, Y.K.; OOI, H.K. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). **Veterinary Research**. v.35, p.283-290, 2004

12-ALMERÍA, S.; FERRER, D.; PABON, M.; CASTELLA, J.; MANAS, S. Red Foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**. v.107, p.287-294, 2002.

13-LEMBERGUER, K.Y.; GONDIM, L.F.P.; PESSIER, A.P.; McALLISTER, M.M.; KINSEI, M.J. *Neospora caninum* infection in a free-ranging Raccoon (*Procyon Lotor*) with concurrent canine distemper virus infection. **The journal parasitology**, v.91, p.960-991, 2005.

14-TREES, A.J.; DAVISON, H.C.; INNES, E.A.; WASTLING, J.M. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International journal for Parasitology**, v. 29, p.1195 – 1200, 1999.

15-COSTA, K.S.; SANTOS, S.L.; UZEDA, R.S.; PINHEIRO, A.M.; ALMEIDA, M.A.O.; ARAÚJO, F.R.; McALLISTER, M.M.; GONDIM, L.F.P. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*, **International Journal for Parasitology**. v38, p. 157-159, 2008.

16-YANIZ, M.G. DE; MOORE, D.P.; ODEO, A.C.; CANO, A.; CANO, D.B.; LEUNDA, M.R.; CAMPERO, C.M. Humoral immune response in pregnant heifers inoculated with *Neospora caninum* tachyzoites by conjunctival route. **Veterinary Parasitology**. v.148, p. 213-218, 2007.

17-SERRANO, E.; FERRE, I.; OSORO, K.; ADURIZ, G.; MATEOS-SANZ, A.; MARTINEZ, A.; ATXAERANDIO, R.; HIDLGO, C.O.; ORTEGA-MORA, L.M. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. **Veterinary Parasitology** v.135, p.197-203, 2006.

DEVENS, B.A. Neosporose canina: biologia, etiologia, sinais clínicos, diagnóstico e controle. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 40, Ed. 145, Art. 975, 2010.

18-MASUDA, T.; KOBAYASHI, Y.; MAEDA R., OMATA, Y.; Possibility of *Neospora caninum* infection by venereal transmission in CB-17 scid mice. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p.130-133, 2007.

19-VARDELEON, D.; MARSH, A.E.; THORNE, J.G.; LOCH, W.; YOUNG, R.; JOHNSON, P.J. Prevalence of *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from various geographical locations. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.95, n.2-4, p.273-282, 2001.

20- WOUDA, W.; DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. **Journal Parasitology**, v. 83, p. 545-547, 1997.

21-BOGER, A.L.; HATTEL, A.L., Additional evaluation of undiagnosed bovine abortion cases may reveal fetal neosporosis. **Veterinary Parasitology**. v.113, p.1-6, 2003.

22-HOANE, J.S.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; RIBEIRO, M.G.; BORGES, A.S.; YAI, L.E.O.; AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; BONESI, G.L.; HOWE, D.K. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora spp.* infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. **Veterinary Parasitology**. v.136, p.155-159, 2006.

23-HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B. A European perspective of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 8, p. 877-924, 2000.

24-LASRI, S.; DE MEERSCHMAN, F.; RETTIGNER, C.; FOCANT, C.; LOSSON, B. Comparison of three techniques for the serological diagnosis of *Neospora caninum* in the dog and their use for epidemiological studies. **Veterinary Parasitology**. v.123, p.25-32, 2004.

25-BJÖRKMAN, C.; JOHANSSON, O.; STELUND, S.; HOLMDAHL, O.J.M.; UGGLA, A. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.208, n.9, p.1441-1444, 1996.

26-NISHIKAWA, Y.; XUANA, X; NAGASAWAA, H.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; OTSUKAB, H.; MIKAMIA, T. Monoclonal antibody inhibition of *Neospora caninum* tachyzoite invasion into host cells. **International Journal for Parasitology**, v.30 p.51- 58, 2000.

27-NISHIKAWA, Y.; INOUE, N.; MAKALA, L.; NAGASAWA, H. A role for balance of interferon-gamma and interleukin-4 production in protective immunity against *Neospora caninum* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 116, n. 3, p. 175-184, 2003.

28-CANADA, N.; MEIRELES, C.S.; CARVALHEIRA, J.; ROCHA, A.; SOUSA, S.; CORREIA DA COSTA, J.M. Determination of an optimized cut-off value for the *Neospora* agglutination test for serodiagnosis in cattle. **Veterinary Parasitology**. v.121, p-225-231, 2004.

29-PALAVICINI, P.; ROMERO, J.J.; DOLZ, G.; JIMÉNEZ, A.E.; HILL, D.E.; DUBEY, J.P. Fecal and serological survey of *Neospora caninum* in farm dogs in Costa Rica. **Veterinary Parasitology**, v.149, p.265-270, 2007.

30-SLAPETA, J.R.; MODRÝ, D.; KYSELOVÁ, I.; HOREJS, R.; LUKES, J.; KOUDELA, B. Dogs shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. **Veterinary Parasitology**. v.109, p. 157-167, 2002.

31-CAETANO DA SILVA, A.C. Diagnóstico da neosporose bovina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.13, p.29-33, 2004.

32-ANDREOTTI R.; LOCATELLI-DITTRICH, R.L.; SOCCOL, V.T.; PAIVA, F. **Diagnóstico e controle da neosporose em bovinos**. Campo Grande: Embrapa, (Documentos 136), 51p., 2003.

33-RAGHUPATHY, R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. **Immunology Today**, v. 18, n. 10, p. 478-482, 1997.

34-INNES, E; ADRIANARIVO, A.G.; BJORKMAN, C.; WILLIAMS, D.J.L.; CONRAD, P.A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in parasitology**, Oxford, v.18, n.11, p.497-504, 2002.

DEVENS, B.A. Neosporose canina: biologia, etiologia, sinais clínicos, diagnóstico e controle. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 40, Ed. 145, Art. 975, 2010.

35-PINHEIRO A. M.; COSTA, S. L.; FREIRE, S. M.; MEYER, R.; ALMEIDA, M. A.; TARDY, M.; EL BACHA, R.; COSTA, M. F. *Neospora caninum*: infection induced IL-10 overexpression in rat astrocytes in vitro. **Experimental Parasitology**, v.112, n. 3, p.193-197, 2006.

36-DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 323-367, n. 2, 2007.

37-REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. Control options for *Neospora caninum* in cattle. **New Zealand Veterinary Journal**. v.50, p.86-92, 2002.

38-INNES, E. A.; BARTLEY, P. M.; MALEY, S. W.; KATZER, F.; BUXTON D. Bovine neosporosis: pathogenesis and host immune responses. **XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Seminário de Parasitologia Veterinária dos países do Mercosul**. Curitiba, 2008.

39-GONDIM L. F. Novos desafios para o controle da neosporose. **XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Seminário de Parasitologia Veterinária dos países do Mercosul**. Curitiba, 2008.