

Verificação da transmissão vertical de *Neospora* spp. em equinos¹

Pedro S. Quevedo^{2*}, Luciana F.C. Avila², Andréia Saggin², Tony R. Silveira², Lorena S. Feijó², Friedrich Frey Jr³, Bruna R. Curcio⁴ e Nara Amélia R. Farias⁴

ABSTRACT.- Quevedo P.S., Avila L.F.C., Saggin A., Silveira T.R., Feijó L.S., Frey Jr F., Curcio B.R. & Farias N.A.R. 2015. [Verification of vertical transmission of *Neospora* spp. in horses.] Verificação da transmissão vertical de *Neospora* spp. em equinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 35(1):29-32. Laboratório de Parasitologia do Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS 96010-900, Brazil. E-mail: pedrosquevedo@hotmail.com

The genre protozoan *Neospora* is recognized as causing reproductive disorders and miscarriages in cattle. Among the horses little is known about the effects of infection by these protozoa. It is currently accepted that the effects of infection by *Neospora hughesi* in horses may occur in the central nervous system, and effects of *Neospora caninum* infection occur in the reproductive system of mares. The present study examined the presence of class immunoglobulin G in blood serum of a population of brood mares and their foals before colostrum ingestion. For this assignment was employed indirect immunofluorescence assay (IFA) using as antigen tachyzoites of *Neospora caninum*, the initial dilution employed in sera of the mares was 1:50 and dilution in the serum of foals was 1:16. Were assisted 78 deliveries and all foals had their blood serum collected immediately after birth. The presence of antibodies against *Neospora* spp. found in mares was 50 (64%) and 32 (41%) foals were positive. Of the 50 mares that had antibodies to *Neospora* spp. 24 generated positive foals. Among the 28 mares unreacted eight gave birth to foals positive. Having the results we can conclude that vertical transmission occurred *Neospora* spp. researched in horses.

INDEX TERMS: *Neospora* spp., protozoa, reproductive diseases, tachyzoites, indirect immunofluorescence (IFAT), horses.

RESUMO.- O gênero protozoário *Neospora* é reconhecido como causador de desordens reprodutivas e abortos em bovinos. Entre os equinos pouco se sabe sobre os efeitos da infecção por estes protozoários. Atualmente é admitido que os efeitos da infecção por *Neospora hughesi* em equinos possam ocorrer no sistema nervoso central e, os efeitos provocados pela infecção por *Neospora caninum* recaiam sobre o sistema reprodutor de éguas. O presente trabalho verificou a presença de imunoglobulinas da classe G no soro sanguíneo de uma população de éguas

de cria e, em seus respectivos potros antes da ingestão do colostro. Para execução deste trabalho foi empregada técnica de imunofluorescência indireta (RIFI), utilizando como antígeno taquizoítos de *Neospora caninum*, a diluição inicial dos soros das éguas foi de 1:50 e a diluição do soro dos potros empregada foi de 1:16. Foram assistidos 78 partos e todos os potros tiveram seu soro sanguíneo coletado imediatamente após o nascimento. A pesquisa de anticorpos contra *Neospora* spp. apontou que 50 (64%) éguas e 32 (41%) potros foram positivos. Das 50 éguas que apresentaram anticorpos contra *Neospora* spp. 24 geraram potros positivos. Entre as 28 éguas que não reagiram, oito deram a luz a potros positivos. De posse dos resultados encontrados podemos concluir que ocorreu a transmissão vertical de *Neospora* spp. nos equinos pesquisados.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Neospora* spp., protozoários, doenças reprodutivas, taquizoítos, reação de imunofluorescência indireta (RIFI), equinos.

¹ Recebido em 24 de junho de 2014.

Aceito para publicação em 23 de janeiro de 2015.

² Pós-Graduando em Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário s/n, Pelotas, RS 96010-900, Brasil. *Autor para correspondência: pedrosquevedo@hotmail.com

³ Médico Veterinário Autônomo, Rua Flores da Cunha 53, sala 31, Bagé, RS 96400-350, Brasil.

⁴ Docente do Curso de Medicina Veterinária, UFPel, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS 96010-900.

INTRODUÇÃO

O gênero *Neospora* foi identificado no final do século passado, quando *Neospora caninum* foi incriminado como agente causador de encefalomielite em cães (Bjerkas et al. 1984, Dubey et al. 1988). Os integrantes deste gênero são pertencentes ao filo Apicomplexa semelhante a *Toxoplasma gondii*, tendo como característica principal uma estrutura que confere ao protozoário a capacidade de internalizar células hospedeiras, denominada complexo apical (Bjerkas et al. 1984, Dubey et al. 1988a, Dubey et al. 1996, Dubey et al. 2003). *Neospora* spp. está contido na família Sarcocistidae, tem como uma de suas características a formação de cistos em hospedeiros intermediários (Coberllini et al. 2000, Dubey & Lindsay 1996). *N. caninum* tem um ciclo de vida heteroxeno, cães (*Canis familiaris*) e coiotes (*Canis latrans*) atuam como hospedeiros definitivos (McAllister et al. 1998, Lindsay et al. 1999, Gondim et al. 2004, Gondim, 2006). O hospedeiro definitivo de *N. hughesi* não é conhecido até o presente (Wobeser et al. 2009).

A soroprevalência de *Neospora* spp. em equinos já foi relatada em diferentes áreas do mundo (Dubey et al. 1999, Vardeleon et al. 2001, Pitel et al. 2003, Kligler et al. 2007, Moura et al. 2013). Sabe-se que *Neospora caninum* é considerado a principal causa de abortamento para bovinos em algumas regiões do planeta (Barr et al. 1990). O aborto é o único indício verificado em rebanhos contaminados (Dubey & Lindsay 1996). Diferente do constatado em bovinos, pouco se sabe sobre a importância de *Neospora* spp. para equinos (Pitel et al. 2003). Relatos dão conta que duas são as espécies de protozoários do gênero *Neospora* capazes de infectar equinos, *N. caninum* e *N. hughesi* (Marsh et al. 1998, Wobeser et al. 2009, Toscan et al. 2010).

N. hughesi tem sido incriminado como causador de enfermidade neurológica (Kligler et al. 2007, Wobeser et al. 2009). Distúrbios reprodutivos em éguas estão sendo associados à infecção por *N. caninum* (Villalobos et al. 2006).

O longo período gestacional das éguas e o elevado valor de seus produtos requerem dos criadores e técnicos constante atenção. Para minimizar perdas embrionárias, mortes fetais e ainda o nascimento de produtos inviáveis, pesquisas relacionando *Neospora* spp. a possíveis problemas reprodutivos em cavalos se fazem necessárias (Pitel et al. 2003, Villalobos et al. 2006).

No presente trabalho foram testados soros de éguas em idade reprodutiva, submetidas a manejo semi-intensivo, afim de verificar a presença de anticorpos contra *Neospora* spp., e a transmissão transplacentária do protozoário.

MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos éticos

O projeto foi analisado pela Comissão Ética em Experimentação Animal (CEEA), da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), processo nº 23110.004837/2012-28, e obteve parecer favorável a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Coleta de amostras de soro

Amostras de soro foram colhidas a partir de 78 éguas Puro Sangue Inglês e seus potros recém-nascidos em um Haras localizado no Sul do Brasil. Os animais foram examinados rotineiramente

por um veterinário e todos os nascimentos foram testemunhados. A coleta de sangue dos potros foi realizada imediatamente após o nascimento, portanto, antes da ingestão de colostro e, das éguas em média um mês antes do parto, por venopunção da jugular. Após a coleta, o sangue total foi centrifugado a 2500rpm durante 10 minutos para retração do coágulo e obtenção do soro, o qual foi armazenado a -20°C até ser testado.

Cultivo de *Neospora caninum* e confecção do antígeno para realização da técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A pesquisa de imunoglobulina G (IgG) anti-*Neospora* spp. foi realizada com teste indireto, reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) (Conrad et al. 1993). Taquizoitos de *Neospora caninum* da cepa padrão NC-1 foram utilizados como antígeno, cultivados em células Vero em meio RPMI, enriquecido com soro fetal de bovino 10%, L-glutamina, piruvato, penicilina e estreptomicina. Para confecção das lâminas sensibilizadas o cultivo celular previamente inoculado com taquizoitos de *N. caninum*, era removido das garrafas de cultivo em capela de fluxo laminar e acondicionado em tubos do tipo Falcon. O material era então submetido a centrifugação a rotação de 1500rpm durante 10 minutos, o sobrenadante era removido com auxílio de pipeta de Pasteur e o *pellet* ressuspenso em tampão fosfato salino (PBS) (Vardeleon et al. 2001). O conteúdo homogeneizado ressuspenso em PBS, era submetido a contagem em câmara de Neubauer espelhada. Convencionou-se que o material utilizado para confecção de lâminas sensibilizadas deveria ter contagem entre 500 e 1000 taquizoitos por microlitro (taq./ μ L). A solução era então dispensada em lâminas rígidas de teflon, próprias para RIFI, na quantidade de 10 μ L por orifício (Vardeleon et al. 2001). O material foi seco em temperatura ambiente e, posteriormente, fixado em metanol a 100% e armazenado em -20°C até o momento de ser utilizado.

Amostras controle

Para realização da reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) foram utilizados controles positivo e negativo em todas as lâminas. Estas amostras foram previamente testadas por Ensaio de Imunoabsorbância Ligado a Enzima (ELISA). A técnica utilizou como antígeno proteína recombinante NcSRS2, presente a superfície da membrana de *N. caninum*, amplificada em *Pichia pastoris*. (Pinheiro et al. 2013). Os controles positivos obtidos por ELISA apresentaram fluorescência total visível. Os controles negativos não floresceram.

Deteção de anticorpos pela técnica de RIFI

Para execução da RIFI foi utilizado anti-IgG equino conjugado com fluoresceína (SIGMA®) que atua como anticorpo secundário na reação. O conjugado comercial foi utilizado diluído na proporção de 1:64 em solução de Azul de Evans diluído em PBS na proporção de 1:10. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência, aumento 400x, modelo BX-FLA Olympus®. As amostras testadas foram consideradas positivas quando os taquizoitos apresentaram fluorescência periférica total. Foram considerados não reagentes ou negativos quando a fluorescência foi apical ou ausente (Pare et al. 1995).

Para as éguas foi utilizado um ponto de corte de 1:50 (Villalobos et al. 2006, Antonello et al. 2012, Moura et al. 2013) como triagem, enquanto os potros foram considerados positivos quando reagentes em diluição de 1:16 (Locatelli-Dittrich et al. 2006, Antonello et al. 2012).

RESULTADOS

Entre as 78 éguas coletadas 50 apresentavam anticorpos contra *Neospora* spp. na diluição 1:50, correspondendo a 64% da população de éguas em idade reprodutiva. Os animais que acusaram presença de anticorpos para *Neospora*

Quadro 1. Distribuição numérica das éguas que apresentaram IgG contra *Neospora* spp.

Titulação	Numero de éguas reagentes (%)
50	12/78 (15,3%)
100	22/78 (28,2%)
200	11/78 (14,1%)
400	5/78 (6,4%)
800	0

spp., na diluição inicial, tiveram seus soros diluídos para verificar a presença de IgG até a diluição máxima de 1:800. A distribuição das éguas reagentes conforme a titulação de anticorpos IgG foi de 12 em 1:50 (15,3%), 22 em 1:100 (28,2%), 11 em 1:200 (14,1%), 5 em 1:400 (6,4%) e nenhum soro reagente em diluição 1:800, estes resultados são melhor compreendidos no Quadro 1.

A pesquisa de anticorpos da classe G contra *Neospora* spp. nos potros foi realizada na diluição 1:16. Dos 78 animais pesquisados 32 (41%) foram reagentes, destes 24 eram produtos de fêmeas positivas. Quando comparado o status sorológico das éguas com os potros, a leitura dos resultados apontou que das 50 éguas soropositivas, 24 deram a luz a potros positivos (48%), enquanto das 28 éguas soronegativas, oito foram genitoras de potros positivos (28,5%).

DISCUSSÃO

O potencial abortivo da infecção por *Neospora* spp. em equinos ainda deve ser elucidado, mas existem fortes indícios relacionando a presença de anticorpos em éguas com falhas reprodutivas (Villalobos et al. 2006). O percentual de éguas reagentes que encontramos (64%) indica o íntimo contato de *Neospora* spp. com a população estudada. Diferente de nossos resultados, em levantamentos sorológicos realizados nos estados do Paraná e Santa Catarina, os valores encontrados apontaram uma prevalência muito menor de *Neospora* spp. nas populações pesquisadas, 14,4% e menos de 5%, respectivamente. Estes estudos tiveram como alvo animais de tração urbanos ou oriundos de áreas rurais, mas ainda assim, indicam que há, nessas condições, contato de equinos com este gênero de protozoários (Villalobos et al. 2012, Moura et al. 2013).

Pesquisas de anticorpos contra *Neospora* spp., tendo como alvo éguas em idade reprodutiva em diversas regiões do mundo convergem no mesmo sentido, embora apresentem números diferentes quanto ao percentual de animais reagentes, indicam o contato de equinos com este gênero protozoário (Dubey et al. 1999, Vardeleon et al. 2001, Pitel et al. 2003, Kligler et al. 2007, Antonello et al. 2012).

A maior parte destes trabalhos utiliza testes de Imunofluorescência indireta (RIFI) ou ensaio por imunoadsorção ligado a enzima (ELISA) para detectar anticorpos contra *Neospora* spp., sendo o segundo método, o de preferência para estudos epidemiológicos com grande número de amostras (Lasri et al. 2004). O emprego do teste de aglutinação, também já foi realizado para pesquisa de anticorpos contra *N. caninum* em soro sanguíneo de equinos (Dubey et al. 1999). Quanto a RIFI, foi inicialmente desenvolvida para detectar anticorpos para *N. caninum* em cães e, fatores como o conjugado e o padrão de fluorescência merecem atenção quando

se avalia a especificidade deste teste sorológico (Dubey et al. 1988a). Em pesquisas de anticorpos contra *N. hughesi* em equinos, técnica de RIFI oferece a segurança de não apresentar reação cruzada com *Sarcocystis neurona*, o principal agente causador de mieloencefalite protozoária equina (MEP) (Vardeleon et al. 2001). Todavia, a RIFI não permite diferenciar se o animal possui anticorpos contra *N. hughesi* ou *N. caninum*, devido semelhanças antigênicas e por esta técnica utilizar o taquizoito total como antígeno (Gondim et al. 2009). De qualquer forma a nossa pesquisa de anticorpos (IgG) para *Neospora* spp., foi realizada pela técnica de RIFI, considerando seus aspectos positivos e fatores limitantes. No soro sanguíneo das éguas verificamos número de reagentes superior ao encontrado nos seus respectivos produtos, imediatamente após o nascimento. Foi observado por tanto, maior prevalência entre as éguas que nos seus potros, semelhante ao já relatado (Antonello et al. 2012).

A presença de imunoglobulinas da classe G contra *Neospora* spp. em potros, antes de ingerirem colostro, permite-nos afirmar que ocorre o contato do protozoário com o sistema imunológico do potro ainda em sua vida intrauterina. Tal fato é explicado pela conformação da placenta das éguas, epiteliocorial difusa, que inviabiliza a transferência de imunoglobulinas maternas para a circulação fetal (Churri et al. 2010). Logo, os anticorpos presentes no soro dos potros são produzidos em seus organismos, sendo assim a transmissão vertical é uma rota de disseminação de *Neospora* spp. em equinos (Antonello et al. 2012).

Do total de potros pesquisados, 32 apresentaram níveis detectáveis IgG anti-*Neospora* spp., antes da ingestão de colostro, destes, oito eram oriundos de éguas não reagentes. Este fato pode ser atribuído a eventuais flutuações dos títulos de anticorpos no soro das éguas durante o período gestacional (Antonello et al. 2012).

Portanto, as éguas que não reagiram na RIFI, provavelmente foram infectadas por *Neospora* spp., mas seus níveis de anticorpos não foram detectáveis pela técnica na diluição utilizada, na ocasião em que seus soros foram testados (Locatelli-Dittrich et al. 2006, Antonello et al. 2012).

Cumpramos salientar, que éguas soropositivas nem sempre geram potros congenitamente infectados, este fato também pode ser atribuído entre outros fatores, ao tipo de placentação (Locatelli-Dittrich et al. 2006). Como em todo desafio exógeno, fatores referentes ao protozoário e ao hospedeiro devem ser considerados à compreensão da transmissão vertical. Entre os fatores vinculados a relação parasita-hospedeiro podem ser elencados a gravidade da parasitemia estabelecida, fase da gestação em que ocorreu a infecção ou reativação, se as fêmeas gestantes foram exposta a uma primo-infecção e o status imunológico do potro (Toscan et al. 2010).

Um aspecto que deve ser ressaltado é que o contato de equinos com cães e/ou bovinos é apontado como fator de risco para a infecção por *Neospora* spp., indicando que a transmissão horizontal também pode ser importante nessa espécie (Moura et al. 2013).

A neosporose bovina provoca abortos em gestações alternadas, evidenciando que a transmissão vertical ocorre de forma intermitente nesta espécie (Moen et al. 1995). A transmissão vertical de *N. caninum* em bovinos comporta-se

de maneira diferente entre progenitoras infectadas congenitamente (forma vertical) e infectadas após o nascimento (forma horizontal) (McAllister, 2001). É esperado que estes aspectos referentes as formas de transmissão da neosporose bovina sejam também observado em equinos, explicando assim a geração de animais negativos a partir de fêmeas infectadas por *Neospora* spp. (Toscan et al. 2010). Ainda considerando a similaridade referente ao comportamento da infecção em bovinos e equinos devemos ponderar a época e via de infecção que estas éguas foram submetidas, visto que, a exposição primária de vacas adultas não gestantes parece não causar infecção permanente ou, é capaz de incitar uma resposta imune eficaz, que pode prevenir a transmissão transplacentária em futuras gestações (McAllister 2001).

A frequência elevada de anticorpos contra *Neospora* spp. encontrada, nas éguas de cria desta pesquisa, pode servir de alerta e justificar a necessidade da realização de monitoramento sorológico de rebanhos e tropilhas susceptíveis. Mais estudos devem ser conduzidos para identificar as possíveis interferências neurológicas em potros ou reprodutivas em éguas, bem como, se existe diferença clínica de acordo com a via de transmissão de *Neospora* spp. a qual o equino é submetido.

Agradecimentos.- A professora Fernanda Vogel, do Departamento de Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), por ceder gentilmente material indispensável a execução deste trabalho e esclarecer os mais diversos questionamentos.

REFERÊNCIAS

- Antonello A.M., Pivoto F.L., Camillo G., Braunig P., Sangioni L.A., Pomper-mayer E. & Vogel F.S.F. 2012. The importance of vertical transmission of *Neospora* spp. in naturally infected horses. *Vet. Parasitol.* 187:367-370.
- Barr B.C., Anderson M.L., Blanchard P.C., Daft B.M., Kinde H. & Conrad P.A. 1990. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. *Vet. Pathol.* 27:354-361.
- Bjerkas I., Mohn S.F. & Presthus J. 1984. Unidentified cyst-forming sporezoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenkd.* 70:271-274.
- Chucri T.M., Monteiro J.M., Lima A.R., Salvadori M.L.B., Kfoury Júnior J.R. & Miglino M.A. 2010. A review of immune transfer by the placenta. *J. Reprod. Immunol.* 87:14-20.
- Conrad P.A., Barr C., Sverlow K.W., Anderson M., Daft B., Kinde H., Dubey J.P., Munson L. & Ardans A. 1993. *In vitro* isolation and characterization of *Neospora* spp. from aborted bovine fetuses. *Parasitol.* 106(3):239-249.
- Corbellini L.G., Driemeier D., Cruz C. & Dias M.M. 2000. Aborto bovino por *Neospora caninum* no Rio Grande do Sul. *Ciência Rural* 30(5):863-868.
- 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. Med. Assoc.* 192: 1269-1285.
- Dubey J.P., Hattel A.L., Lindsay D.S. & Topper M.J. 1988a. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193:1259-1263.
- Dubey J.P. & Lindsay D.S. 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 67(1/2):1-59.
- Dubey J.P., Venturini M.C., Venturini L., McKinney J. & Pecoraro M. 1999. Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses from Argentina. *Vet. Parasitol.* 86:59-62.
- Dubey J.P. 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.* 41:1-162.
- Gondim L.F.P., McAllister M.M., Pitt W.C. & Zemlicka D.E. 2004. Coyotes (*Canis latris*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 34:159-161.
- Gondim L.F.P. 2006. *Neospora caninum* in wildlife: a review. *Trends in Parasitology* 22(6):247-252.
- Gondim L.F., Lindsay D.S. & McAllister M.M. 2009. Canine and bovine *Neospora caninum* control sera examined for cross-reactivity using *Neospora caninum* and *Neospora hughesi* indirect fluorescent antibody tests. *J. Parasitol.* 95:86-88.
- Kligler E.B., Shkap V., Baneth G., Mildenberg Z. & Steinman A. 2007. Seroprevalence of *Neospora* spp. among asymptomatic horses, aborted mares and horses demonstrating neurological signs in Israel. *Vet. Parasitol.* 148:109-113.
- Lasri S., 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.
- Lindsay D.S., Dubey J.P. & Duncan R.B. 1999. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum* (Rapid communication). *Vet. Parasitol.* 82:327-333.
- Locatelli-Dittrich R., Dittrich J.R., Richartz R.R.T.B., Gasino Joineau M.E., Antunes J., Pinckney R.D., Deconto I., Hoffmann D.C.S. & Thomaz-Soccol V. 2006. Investigation of *Neospora* spp. and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Paraná state, southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 135(3/4):215-221.
- Marsh A.E., Barr B.C., Packham A.E. & Conrad P.A. 1998. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). *J. Parasitol.* 84(5):983-991.
- 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. 2001. Do cows protect fetuses from *Neospora caninum* transmission? *Trends in Parasitology* 17(1):6.
- Moen A.R., Wouda W. & Van Werven T. 1995. Clinical and sero-epidemiological follow-up study in four dairy herds with an outbreak of *Neospora* abortion. *Dutch Society for Veterinary Epidemiology and Economics*, p.93-103.
- Moura A.B., Silva M.O., Farias J.A., Vieira-Neto A., Souza A.P., Sartor A.A., Fontque J.H. & Bunn S. 2013. *Neospora* spp. antibodies in horses from two geographical regions of the state of Santa Catarina, Brazil. *Revta Bras. Parasitol. Vet.* 22(4):597-601.
- Paré J., Hietala S.K. & Thurmond M.C. 1995. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* spp. infection in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7(2):273-275.
- Pinheiro A.F., Borsuk S., Berne M.E.A., Pinto L.S., Andreotti R., Roos T., Roloff B.C. & Leite F.L. 2013. Expression of *Neospora caninum* NcSR2 surface protein in *Pichia pastoris* and its application for serodiagnosis of *Neospora* infection. *Pathogens and Global Health* 107(3):116-121.
- Pitel P.H., Romand S., Pronost S., Foucher N., Gargala G., Maillard K., Thulliez P., Collobert-Laugier C., Tainturier D., Fortier G. & Ballet J.J. 2003. Investigation of *Neospora* spp. antibodies in aborted mares from Normandy, France. *Vet. Parasitol.* 118:1-6.
- Toscan G., Cadore G.C., Pereira R.C.F., Silva G.B., Cezar A.S., Sangioni L.A., Oliveira L.S.S. & Vogel F.S.F. 2010. Neosporose equina: ocorrência de anticorpos anti-*Neospora* spp. e associação entre status sorológico de éguas e de suas crias. *Pesq. Vet. Bras.* 30(8):641-645.
- Vardeleon D., Marsh A.E., Thorne J.G., Loch W., Young R. & Johnson P.J. 2001. Prevalence of *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from various geographical locations. *Vet. Parasitol.* 95:273-282.
- Villalobos E.M.C., Ueno T.E.H., Souza S.L.P., Cunha E.M.S., Lara M.C.C.S.H., Gennari S.M. & Soares R.M. 2006. Association between the presence of serum antibodies against *Neospora* spp. and fetal loss in equines. *Vet. Parasitol.* 142(3/4):372-375.
- Villalobos E.M.C., Furman K.E., Lara M.C.C.S.H., Cunha E.M.S., Finger M.A., Busch A.P.B., Barros Filho I.R., Deconto I., Dornbusch P.T. & Biondo A.W. 2012. Detection of *Neospora* spp. antibodies in cart horses from urban areas of Curitiba, southern Brazil. *Revta Bras. Parasitol. Vet.* 21(1):68-70.
- Wobeser B.K., Godson D.L., Rejmanek D. & Dowling P. 2009. Equine protozoal myeloencephalitis caused by *Neospora hughesi* in an adult horse in Saskatchewan. *Can. Vet. J.* 50(8):851-853.