

Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais da região Sudoeste do Estado de Mato Grosso

Inquiry of antibodies anti-*Neospora caninum* in dairy cattle, dogs and rural workers of the south-west region of Mato Grosso State

Ana Helena Benetti^{1*}; Fábio Bernardo Schein¹; Thaís Rabelo dos Santos²; Gilson Hélio Toniollo³; Alvimar José da Costa; José Roberto Mineo⁴; Janaína Lobato⁴; Deise Aparecida de Oliveira Silva⁴; Solange Maria Gennari⁵

¹Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Cuiabá – UNIC

²Centro de Pesquisas em Sanidade Animal – CPPAR, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP

³Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP

⁴Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia – UFU,

⁵Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo – USP

Recebido em 31 de Julho de 2008

Aceito em 18 de Agosto de 2009

Resumo

Considerando a importância da neosporose interferindo na produtividade animal, avaliou-se a frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras de soros de bovinos leiteiros da Região Sudoeste do Estado de Mato Grosso, Brasil, complementando-se com amostras sorológicas colhidas de cães e de humanos que conviviam nas mesmas propriedades rurais amostradas. Um total de 1.036 amostras de soros foram analisadas, sendo 932 de fêmeas bovinas leiteiras, 37 de cães e 67 de humanos, provenientes de 24 propriedades e examinados por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI). As amostras de soros humanos reagentes foram testadas novamente por *Western-blotting* para confirmação dos resultados. Anticorpos anti-*N. caninum* foram encontrados em 499 bovinos (53,5%), em pelo menos um animal positivo por propriedade, em 25 caninos (67,6%) e em sete humanos (10,5%). Não houve diferença significativa no número de bovinos positivos por faixa etária. Os resultados obtidos indicam uma ampla disseminação de *N. caninum* na região estudada.

Palavras-chave: *Neospora caninum*, soroprevalência, bovinos, caninos, humanos.

Abstract

Considering the importance of neosporosis in the animal health and production, the frequency of antibodies to *Neospora caninum* was evaluated in dairy cattle of the Southwestern region of Mato Grosso State, Brazil, in addition to serum samples obtained from dogs and humans living in the farms. A total of 1036 serum samples were analyzed, from which 932 were from dairy bovine females, 37 from dogs and 67 from humans, from 24 farms and examined by the indirect fluorescent antibody test (IFAT). Reactive human serum samples were retested by *Western-blotting* to confirm the results. Antibodies to *N. caninum* were found in 499 cattle sera (53.5 %), with at least one positive in each farm, 25 dog sera (67.6 %) and seven human sera (10.5 %). There was no significant difference in the number of positive cattle sera according to age group. The results indicate a wide dissemination of *N. caninum* in the studied region.

Keywords: *Neospora caninum*, seroprevalence, cattle, dog, human.

*Autor para correspondência: Ana Helena Benetti
Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Cuiabá – UNIC,
Av. Beira Rio 3100, Jardim Europa, CEP 78015-480 Cuiabá - MT, Brasil
e-mail: benettigomes@terra.com.br

Introdução

O protozoário *Neospora caninum* é um importante parasito intracelular que foi a princípio descrito em cães com alterações neurológicas, sendo considerado atualmente como o responsável por uma das mais importantes enfermidades causadoras de abortamentos em bovinos leiteiros (GENARI, 2004; GONDIM et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2004). O cão e o coiote são as únicas espécies reconhecidas que podem se comportar como hospedeiros definitivos, nas quais ocorre o desenvolvimento sexual do protozoário resultando na eliminação de oocistos nas fezes (McALLISTER et al., 1998; GONDIM et al., 2004). Pesquisas realizadas, nos últimos anos, demonstraram que a presença e o número de cães nas propriedades rurais podem funcionar como fatores de risco para a infecção e a ocorrência de abortamentos em bovinos, indicando uma associação entre a infecção em ambas as espécies (SÁNCHEZ et al., 2003).

Em estudos de McAllister et al. (1998) e Lindsay et al. (1999), cães infectados experimentalmente com carcaças de camundongos infectados por *N. caninum* excretaram poucos oocistos. Desse modo, alguns pesquisadores questionaram se os cães seriam hospedeiros definitivos eficientes de *N. caninum* (LINDSAY et al., 2001). Gondim et al. (2002) justificaram que houve produção de baixo número de oocistos nesses experimentos, porque os bradizoítas nas carcaças de camundongos infectados estavam em baixo número, imaturos ou atenuados pela passagem em um hospedeiro intermediário não usual para *N. caninum*. Os mesmos autores mostraram que o número de oocistos de *N. caninum*, produzido por cães que ingeriram tecidos de bezerros infectados, foi significativamente maior que o produzido por cães que ingeriram carcaças de camundongos infectadas.

No Brasil, *N. caninum* foi diagnosticado em fetos abortados a partir de 1999 e em levantamentos sorológicos de bovinos e cães de diferentes estados, além de outras espécies domésticas e silvestres (GENNARI, 2004). Corbellini et al. (2002) encontraram prevalência em torno de 10% de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos de propriedades do Rio Grande do Sul, não havendo correlação desses resultados com a presença de cães residentes nas propriedades estudadas e sim com a frequência de cães errantes ou silvestres nas referidas propriedades. Em dois estudos realizados com cães do meio urbano e rural de um mesmo município do Estado de Rondônia (CAÑÓN-FRANCO et al., 2003; AGUIAR et al., 2006), a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* foi de 8,3% na região urbana e 12,6% na região rural do município, indicando que, no meio rural, as fontes de infecção para os cães, como ingestão de placenta e fetos contaminados, bem como a possibilidade de caça e de ingestão de cistos teciduais em possíveis hospedeiros intermediários, parecem ser importantes na epidemiologia e manutenção do *N. caninum* nesse ambiente.

O parasito ainda não foi detectado em humanos, embora em infecção experimental por *N. caninum* em primatas Rhesus (*Macaca mulatta*) foram observadas nos fetos, lesões semelhantes à toxoplasmose congênita (BARR et al., 1994). Na Califórnia, Tranas et al. (1999) detectaram anticorpos anti-*N. caninum* com título de 100 em 6,7% dos soros humanos analisados pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

Na Inglaterra, em estudo com 518 trabalhadores rurais e com 3.232 pessoas não consideradas “grupo de risco”, McCann et al. (2008) não observaram soropositividade para *N. caninum* através da RIFI, embora tenham sido encontrados bovinos soropositivos na mesma localidade.

Lobato et al. (2006) detectaram anticorpos IgG contra *N. caninum* em 38% de pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e em 18% de pacientes com distúrbios neurológicos, em Uberlândia, Estado de Minas Gerais, sendo esse estudo importante por sugerir a possibilidade da neosporose constituir parasitose oportunista em pacientes imunocomprometidos. Os autores consideraram também que as soropositividades para *N. caninum* e *Toxoplasma gondii* estavam significativamente associadas nesses dois grupos de pacientes examinados.

Em face da importância da neosporose e da escassez de informações sobre o parasito no Estado de Mato Grosso, objetivou-se, no presente trabalho, verificar a frequência de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais que conviviam no mesmo ambiente.

Material e Métodos

Foram coletadas 932 amostras de sangue de vacas leiteiras da raça Holandesa e mestiças (cruzamentos), pertencentes a 24 propriedades de diferentes municípios e ou distritos da Região Sudoeste do Estado de Mato Grosso. Essa região destaca-se por possuir pequenas propriedades produtoras de leite. Todas as propriedades apresentavam ordenha canalizada ou tipo balde ao pé e a maioria possuía mão-de-obra basicamente familiar. A maior parte dos animais era criada de forma extensiva em pastagens com lotações que variavam de 0,5 a 4,5 animais/hectare. O número total de propriedades leiteiras da região estudada e de animais por propriedade foi fornecido pelo Instituto de Defesa Agropecuária/Mato Grosso (INDEA/MT). As propriedades foram selecionadas de forma aleatória, sorteadas, obedecendo à condição de possuírem número igual ou superior a 20 vacas leiteiras, tendo sido esse o limite inferior recomendado estatisticamente para esse caso.

Para a amostragem, considerou-se prevalência estimada de 50% e precisão mínima desejada igual a 10% (esta estimativa de prevalência garante a precisão mínima, mesmo que os valores reais da prevalência se afastem de 50%) garantindo intervalo de confiança de 95%. Esse cálculo foi realizado com o auxílio do programa EPIINFO 6.04.

Em todas as propriedades, não havia histórico de vacinação dos animais contra agentes potencialmente abortivos como *Leptospira* spp., Herpesvírus bovino tipo I (BHV-1) e Diarreia viral bovina (BVD). Os animais foram vacinados para *Brucella abortus*. Foram relatados casos de abortamento, registrados em até 12 meses antes da data do preenchimento da ficha epidemiológica – contendo dados reprodutivos do rebanho – em 11 (45,83%) das propriedades avaliadas. Foi também observada a presença de um ou mais cães por propriedade.

Foram obtidas amostras sanguíneas de 37 cães hígidos, com idade superior a seis meses, que conviviam em proximidade com os

rebanhos leiteiros e de 67 trabalhadores rurais saudáveis, 50 homens e 17 mulheres, com idades superiores a 15 anos, residentes nas propriedades estudadas.

As amostras de soros sanguíneos foram estocadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises. Os soros bovinos foram examinados pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), utilizando-se taquizoítas fixados de *N. caninum*, cepa NC-1, cultivados em células Vero e conjugado fluorescente anti-IgG bovino (Sigma Chemical Co., F7887), segundo Conrad et al. (1993). Inicialmente, foi feita uma triagem dos soros na diluição 1:200, e as amostras positivas foram testadas novamente em diluições sequenciais na base dois, até o título final. As reações com título igual ou maior que 200 foram consideradas positivas (DUBEY; LINDSAY, 1996).

Os soros dos cães foram examinados pela RIFI, utilizando-se conjugado fluorescente anti-IgG canino (Sigma Chemical Co., F 4012), com triagem inicial na diluição 1:50 e titulação das amostras positivas como realizado para os soros bovinos (CONRAD et al., 1993). As amostras de soros humanos foram examinadas pela RIFI, utilizando-se conjugado fluorescente anti-IgG humano (F0132, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), com triagem inicial na diluição de 1:100, segundo Camargo (1964) e Mineo et al. (2001). As amostras positivas foram confirmadas pelo “Western-blotting”, utilizando-se extrato solúvel de *N. caninum*, cepa NC1 e reveladas pelo conjugado anti-IgG humano marcado com peroxidase (A6029, Sigma Chemical Co.), de acordo com Lobato et al. (2006).

Os resultados referentes aos testes sorológicos foram estatisticamente analisados por meio do teste de χ^2 (Qui-quadrado), segundo Everitt (1992). Para o estudo da prevalência de *N. caninum*, foram coletadas 932 amostras de uma população de 4.168 bovinos das 24 propriedades. Para se avaliar a prevalência por propriedade, utilizou-se inicialmente um teste de hipótese, associado ao teste do χ^2 . A partir desses dados avaliaram-se (95% de confiança) as propriedades que possuíam as maiores prevalências, fazendo-se a associação com os casos de abortamentos e cães soropositivos nessas localidades. O efeito da idade dos bovinos como fator de risco para a presença de anticorpos anti-*N. caninum* foi comparado entre as faixas etárias de 0 a 24 meses, > 24 a 48 meses, > 48 a 72 meses e idade superior a 72 meses, duas a duas, utilizando-se o teste de χ^2 . Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

A frequência de anticorpos anti-*N. caninum* nos bovinos foi de 53,5% (499/932). Em todas as propriedades avaliadas, foi observado, no mínimo, um bovino soropositivo/propriedade.

Para os cães, observou-se frequência de anticorpos anti-*N. caninum* de 67,6% (25/37). Em 79,2% das propriedades avaliadas (19/24) que possuíam cães, pelo menos um cão soropositivo foi encontrado.

Em humanos, a frequência foi de 10,5% (07/67), de trabalhadores do sexo masculino, provenientes de cinco propriedades, as quais apresentaram frequência de 23,5% a 81,2% de bovinos soropositivos. Em apenas uma dessas cinco localidades não houve presença de cães soropositivos para *N. caninum*.

Em quatro das seis propriedades que obtiveram as maiores frequências de soropositividade não houve histórico de abortamentos e, em três delas (4, 15 e 22) não foram observados cães soropositivos para o parasita.

A análise do número de bovinos soropositivos por faixa etária não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$).

Discussão

A variabilidade de soroprevalência de anticorpos anti-*N. caninum*, de 6,8% a 67,8% observados em estudos brasileiros (GENNARI, 2004), pode estar relacionada, dentre outros fatores, aos diferentes pontos de corte utilizados e à ausência de técnicas sorológicas padronizadas. Dados referentes aos animais, como procedência, manejo, soropositividade ou não a outros agentes abortivos, assim como a profilaxia aplicada para os mesmos, poderiam interferir no percentual de animais sororreagentes (AGUIAR, 2004).

De acordo com Wouda et al. (1999), a presença de cães portadores de anticorpos contra *N. caninum*, nas fazendas está associada à prevalência dessa infecção em bovinos. Entretanto, no presente estudo, observou-se a ausência de cães soropositivos em três das seis propriedades com as mais altas taxas de bovinos sororreagentes. Esse resultado pode ser devido ao baixo número de caninos examinados por propriedade ou ser indicativo de que o parasita mantém-se no rebanho mesmo na ausência do hospedeiro definitivo, sendo a positividade associada à transmissão vertical. Tal observação condiz com as informações de Anderson et al. (1997), que consideraram a transmissão transplacentária como a principal via de infecção em bovinos. Outro motivo relevante pode ser a frequência de cães errantes nas propriedades que, embora não analisados no presente estudo, podem ter participação no ciclo de *N. caninum*, como já reportado por Corbellini et al. (2002). Lindsay et al. (1999) observaram que cães, mesmo eliminando oocistos pelas fezes, podem não apresentar soroconversão, sendo esse mais um aspecto a ser considerado na análise da fraca associação entre a presença de cães soropositivos e a soropositividade em bovinos observada neste estudo.

Observou-se que quatro das seis propriedades com as maiores frequências de bovinos sororreagentes não apresentaram casos de abortamentos nos 12 meses anteriores ao preenchimento da ficha epidemiológica do rebanho. Okuda et al. (1997) observaram em um rebanho no Japão, 27,7% de animais sororreagentes sem histórico de abortamento e Stobbe (1999) relatou 26,2% de bovinos soropositivos em propriedades no Estado de São Paulo sem histórico de problemas reprodutivos.

Os níveis de anticorpos podem apresentar flutuações com a idade e o tempo de infecção. Bovinos entre 13 e 24 meses apresentaram tendência de soroprevalência mais baixa em relação a outras faixas etárias (HIETALA; THURMOND, 1999), sugerindo que essa ocorrência é devida ao declínio de anticorpos em bovinos congenitamente infectados. Essas informações apontam as dificuldades e o cuidado que merecem as interpretações da soroprevalência de *N. caninum*.

No presente trabalho não se observou associação entre as faixas etárias com valores semelhantes entre os animais jovens e idosos. Na Inglaterra e na França não foram observadas evidências no

aumento da soroprevalência de acordo com a idade dos bovinos estudados (HEMPHILL; GOTTSTEIN, 2000; PITEL et al., 2001). No Brasil, Melo, Leite e Souza (2001) avaliaram em fêmeas leiteiras do Estado de Minas Gerais e também não observaram diferenças entre as faixas etárias de 7 a 18 meses, 19 e 30 meses e fêmeas acima de 31 meses, sugerindo a ocorrência da mesma exposição dos animais ao parasito. Entretanto, Guimarães et al. (2004), também no Brasil, observaram, em fêmeas bovinas acima de 24 meses, maior soroprevalência para o agente e sugeriram que a idade é um importante fator de risco. No presente estudo, a ocorrência de valores semelhantes de soropositividade nas diferentes faixas etárias dos bovinos indica ser a transmissão vertical a mais importante nos rebanhos estudados.

A soropositividade de 10,5% para humanos foi ligeiramente superior à relatada por Lobato et al. (2006), que obtiveram, pelas mesmas técnicas utilizadas, 6% de soropositividade em indivíduos saudáveis do Estado de Minas Gerais.

Os indivíduos amostrados no presente trabalho não tinham histórico de problemas reprodutivos e/ou de outras doenças concomitantes. Petersen et al. (1999) pesquisaram anticorpos anti-*N. caninum* em um grupo de mulheres dinamarquesas com abortamentos repetidos, de causa desconhecida, e não encontraram resultado positivo. Sugeriram, então, que anticorpos devem ser investigados especificamente em mulheres com quadros reprodutivos aliados a sinais neurológicos. Outras formas de infecção por *N. caninum*, em humanos, também poderiam ser investigadas, como sugeriram Lobato et al. (2006), baseando-se na toxoplasmose, embora a epidemiologia de ambos os agentes venha apresentado aspectos diferentes.

Agradecimentos

À Profª Drª Rosângela Zacarias Machado, pelas orientações iniciais. Ao Dr. João Ademir de Oliveira, pelas análises estatísticas. À Tatiana Evelyn Hayama Ueno, pelo auxílio na parte experimental.

Referências

AGUIAR, D. M. **Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum*, anti-*Brucella abortus* e anti-*Lepstospira spp* em bovinos da zona rural do município de Monte Negro, Rondônia**: estudo de possíveis fatores de risco. São Paulo, 2004. 118 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo - USP.

AGUIAR, D. M. et al. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 1/2, p. 71-77, 2006.

ANDERSON, M. L. et al. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. Infection in dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 210, n. 8, p. 1169-1172, 1997.

BARR, B. C. et al. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. **Laboratory Investigation**, v. 71, n. 2, p. 236-242, 1994.

CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, n. 3, p. 117-118, 1964.

CAÑÓN-FRANCO, W. A. et al. Prevalence of antibodies to anti-*Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 71-74, 2003.

CONRAD, P. A. et al. Detection of serum antibody responses in cattle with natural and experimental *Neospora* infections. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, n. 4, p. 572-578, 1993.

CORBELLINI, L. G. et al. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 103, n. 3, p. 195-202, 2002.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 67, n. 1/2, p. 1-59, 1996.

EVERITT, B. S. **The analysis of contingency tables**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1992. 164 p.

GENNARI, S. M. *Neospora caninum* no Brasil: situação atual da pesquisa. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 23-28, 2004.

GONDIM, L. F. P.; GAO, L.; McALLISTER, M. M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts **International Journal of Parasitology**, v. 88, n. 6, p. 1159-1163, 2002.

GONDIM, L. F. P. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 159-161, 2004.

GUIMARÃES, J. S. et al. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 124, n. 1/2, p. 1-8, 2004.

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B. A. European perspective on *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, v. 30, n. 8, p. 887-924, 2000.

HIETALA, S. K.; THURMOND, M. C. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two daired. **International Journal of Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1669-1676, 1999.

LINDSAY, D. S.; UPTON, S. J.; DUBEY, J. P. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst **International Journal of Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1521-1523, 1999.

LINDSAY, D. S.; RITTER, D. M.; BRAKE, D. Oocyst excretion in dogs fed mouse brains containing tissue cysts of a cloned line of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, vol. 87, n. 4, p. 909-911, 2001.

LOBATO, J. et al. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 1, p. 84-89, 2006.

McALLISTER, M. M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, 1998.

MCCANN, C. M. et al. Lack of serologic evidence of *Neospora caninum* in humans, England. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 6, p. 978-980, 2008.

MELO, C. B.; LEITE, R. C.; SOUZA, G. N. Frequência de infecção por *Neospora caninum* em dois diferentes sistemas de produção de leite e

- fatores predisponentes à infecção em bovinos em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 10, n. 2, p. 67-74, 2001.
- MINEO, T. W. P. et al. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 98, n. 4, p. 239-245, 2001.
- OKUDA, K.; FUKUTOMI, T.; YOSHINO, T. Detection of *Neospora* antibody and antigens from bovine cases of abortion in Okayama Prefecture. **Journal of the Japan Veterinary Medical Association**, v. 50, n. 7, p. 386-389, 1997.
- PETERSEN, E. et al. *Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 2, p. 278-280, 1999.
- PITEL, P. H. et al. Neosporosis in bovine dairy herds from the west of France: detection of *Neospora caninum* DNA in aborted fetuses, seroepidemiology of *Neospora caninum* in cattle and dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n. 4, p. 269-277, 2001.
- SÁNCHEZ, G. F. et al. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 2, p. 142-145, 2003.
- STOBBE, N.S. **Estudo interativo entre a presença de anticorpos anti-*Neospora caninum* e a ocorrência de abortamentos em bovinos no noroeste do Estado de São Paulo**. São Paulo, 1999. 44 p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo – USP.
- TRANAS, J. et al. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 5, p. 765-767, 1999.
- WOUDA, W. et al. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. **International Journal of Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1677-1682, 1999.