

## Desenvolvimento e padronização do Dot-ELISA usando peptídeos recombinantes para o diagnóstico sorológico de *Neospora caninum*<sup>1</sup>

Rafael D. Blanco<sup>2\*</sup>, Cintia F. Fidelis<sup>2</sup>, Leandro S. Araujo<sup>2</sup>, Adriana M. Henao<sup>2</sup>, Jose A. Cardona<sup>2,3</sup>, Jose D. Guimarães<sup>4</sup>, Marlene I. Vargas<sup>5</sup> e Joaquin H. Patarroyo<sup>6</sup>

**ABSTRACT.-** Blanco R.D., Fidelis C.F., Araujo L.S., Henao A.M., Cardona J.A., Guimarães J.D., Vargas M.I. & Patarroyo J.H. 2014. [Development and standardization of Dot-ELISA using recombinant peptides for serological diagnosis of *Neospora caninum*.] Desenvolvimento e padronização do Dot-ELISA usando peptídeos recombinantes para o diagnóstico sorológico de *Neospora caninum*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34(8):723-727. Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores, Universidade Federal de Viçosa, Avenida Ph Rolfs, Campus Universitário, Viçosa, MG 36570-000, Brazil. E-mail: [rdblama@gmail.com](mailto:rdblama@gmail.com)

Neosporosis is recognized as a major cause of abortion and neonatal loss in cattle worldwide, both for dairy cattle and beef cattle. In recent years this disease has attracted the interest of researchers and studying the epidemiology and effective methods of diagnosis of this disease. The present study aimed to develop and standardize on a Dot-ELISA for the serological diagnosis of *Neospora caninum* by using recombinant peptide as antigen for the development of a diagnostic kit used on the field. The recombinant antigen (rNcGRA1) was designed based on the method of reverse genetics derived antigenic epitopes of dense granules protein of *N. caninum* and synthesized by GenScript (USA). It was produced by the fermentation in yeasts *Pichiapastoris* KM71. The serological technique was used for the Dot-ELISA detection of IgG specific for *N. caninum* in which 0.22µm nitrocellulose membranes were sensitized with 1µL of antigen and subsequently the plasmas were diluted in a washing solution and incubated for 1 hour. The results will revealed by the addition of Protein G labeled with peroxidase for 30 minutes, followed by the developing solution based on 3,3'-Diaminobenzidine (DAB). Soon after standardization tested 44 bovine plasmas were diagnosed by indirect immunofluorescence assay (IFA), agreeing with the results on a 95.5% and a sensitivity and specificity of 100% and 92% respectively. In regard to the diagnostic kit for the Technology Platform Rapid Flow-Through Miriad®, the peptide presented rNcGRA1 visible markings to react with positive plasma, and showed no markings using the negative plasma. This study is the first to use recombinant peptides and prove to be efficient for the serological diagnosis of cattle naturally infected.

**INDEX TERMS:** Neosporosis, *Neospora caninum*, diagnosis, parasitic diseases, hematozoários, Dot-ELISA, sorology, cattle.

**RESUMO.-** A neosporose é reconhecida como uma das maiores causas de aborto e perdas neonatais em bovinos de leite e corte em todo o mundo. Nos últimos anos esta

doença tem atraído o interesse de pesquisadores com foco na epidemiologia e métodos eficazes de diagnóstico desta doença. No presente estudo objetivou-se desenvolver e pa-

<sup>1</sup> Recebido em 21 de janeiro de 2014.

Aceito para publicação em 29 de março de 2014.

<sup>2</sup> Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (Bioagro), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Avenida Peter Henry Rolfs s/n, Campus Universitário, Viçosa, MG 36570-000, Brasil. \*Autor para correspondência: [rdblama@gmail.com](mailto:rdblama@gmail.com)

<sup>3</sup> Docente de Clínica de Grandes Animais, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Córdoba, AA 354 Montería, Colômbia.

<sup>4</sup> Docente de Reprodução Animal, Depto Medicina Veterinária, UFV, Viçosa, MG.

<sup>5</sup> Docente de Patologia Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, UFV, Viçosa, MG.

<sup>6</sup> Docente de Doenças Parasitárias, Departamento de Medicina Veterinária, UFV, Viçosa, MG.

dronizar um teste Dot-ELISA para o diagnóstico sorológico de *Neospora caninum* com um peptídeo recombinante como antígeno, visando o desenvolvimento de um kit para diagnóstico a campo. O peptídeo recombinante (rNcGRA1) foi desenhado com base na metodologia de genética reversa de epítomos antigênicos originados de uma proteína de grânulos densos de *N. caninum*, e sintetizado pela GenScript (USA). Produzido mediante o processo fermentativo em leveduras *Pichia pastoris* KM71. Para a padronização do Dot-ELISA, membranas de nitrocelulose de 0.22µm foram sensibilizadas com 1µL do antígeno e posteriormente os soros foram diluídos em solução de lavagem e incubados durante 1 hora. A revelação foi feita mediante a adição de Proteína G marcada com peroxidase por 30 minutos, seguido da solução reveladora a base de 3,3'-Diaminobenzidine (DAB). Logo após a padronização foram testados 44 soros bovinos diagnosticados por imunofluorescência indireta (RIFI), obtendo-se uma concordância nos resultados do teste de 95,5% e uma sensibilidade e especificidade de 100% e 92% respectivamente. Quanto ao Kit para diagnóstico a campo na Plataforma Tecnológica RapidFlow-Through Miriad®, o peptídeo rNcGRA1 apresentou marcações visíveis ao reagir com os soros positivos, e não apresentou marcações usando os soros negativos. Este estudo é o primeiro a utilizar peptídeos recombinantes e mostrar-se eficiente para o diagnóstico sorológico de bovinos naturalmente infectados por *N. caninum*.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Neosporose, *Neospora caninum*, diagnóstico, doenças parasitárias, hematozoários, Dot-ELISA, sorologia, bovinos.

## INTRODUÇÃO

*Neospora caninum* é um parasito intracelular obrigatório, formador de cistos, capaz de infectar uma série de hospedeiros de interesse produtivo, principalmente ruminantes (Yao et al. 2009). Os cães e coiotes são os hospedeiros definitivos do coccídeo, eliminando oocistos em suas fezes (Gondim et al. 2004).

A transmissão vertical em bovinos é considerada a principal via de transmissão do parasito (Trees & Williams, 2005), assumindo papel primordial na manutenção da doença, pelo fato da maioria das infecções congênicas resultar em animais clinicamente normais, mas persistentemente infectados (Yildiz et al. 2009). A doença é caracterizada por abortos, sendo o único sinal aparente da doença (Dubey & Schares, 2011), podendo ocorrer entre o quinto e o sexto mês de gestação, embora possam se apresentar a partir do terceiro mês até o término da gestação (Dubey, 1999).

A primeira evidência sorológica de infecção por *Neospora caninum* em bovinos no Brasil foi feita no ano 1996, no estado de São Paulo em bovinos de corte e leite com histórico de aborto (Brautigan et al. 1996). A partir do primeiro isolamento de *N. caninum*, testes sorológicos como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), teste de aglutinação de *Neospora* (TAN) e teste imunoenzimático (ELISA) foram desenvolvidos para o diagnóstico em cães, bovinos e outros animais hospedeiros potenciais (Atkinson et al. 2000).

As técnicas de imunodiagnóstico avaliam o contato do hospedeiro com o agente por meio da detecção de IgG, sen-

do as mais comuns a RIFI e o teste ELISA. A primeira é uma técnica que pode ser considerada de leitura subjetiva, além de necessitar de equipamentos de alto custo. A desvantagem do teste de ELISA é que os antígenos ainda não são produzidos no Brasil, limitando a execução do teste por causa do alto custo de importação.

O Dot-ELISA é uma técnica usada com menor frequência para o diagnóstico da neosporose. É uma técnica baseada na sensibilização de membranas de nitrocelulose com antígeno, e posterior adição de um anticorpo marcado com peroxidase, para ocorrência de reação e revelação com formação de cor. O princípio é semelhante ao ELISA; no entanto, não requer aparelhagem sofisticada (Pinheiro 2001. Pinheiro et al. 2006). Além disso é um teste objetivo onde a reação com formação de cor indica a soropositividade e a ausência de cor indica a soronegatividade, não tendo outras formas de leitura que façam deste um teste subjetivo. Pode ser usado como método quantitativo, quando se deseja verificar a concentração do antígeno, ou, ainda qualitativo, separando amostras em positivas ou negativas (Pinheiro 2001).

Por ser uma técnica de imunodiagnóstico de fácil execução e eficaz, o presente estudo objetivou desenvolver e padronizar um Dot-ELISA para o diagnóstico sorológico de *Neospora caninum* a partir do uso de peptídeo recombinante como antígeno, visando o desenvolvimento de kit para diagnóstico a campo.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Produção do antígeno

Um gene sintético, contendo os principais epítomos antigênicos da proteína de grânulos densos do parasito, NcGRA1 (GenBank: AF199030.1), foi desenhado através da metodologia de genética reversa de epítomos antigênicos determinados por fermentação de bioinformática. Seus códons foram otimizados para a expressão em *Pichia pastoris* KM71, que foi transformada como plasmídeo linearizado, gerando transformantes estáveis via recombinação homóloga entre o DNA transformante e regiões de homologia dentro do genoma da levedura. Posteriormente a confirmação da recombinação gênica na *P. pastoris* KM71 e sua transformação foram realizadas através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) do material genético extraído das colônias selecionadas seguindo recomendações do manual do Sistema de expressão em *Pichia pastoris* (Invitrogen®).

A produção dos antígenos recombinantes, em escala laboratorial, foi realizada por processos fermentativos em frascos "spinner" (fermentadores de bancada) de 500 ml, com injeção contínua de oxigênio, rotação de 250rpm e temperatura de 30°C. Para isso uma simples colônia foi inoculada em 50mL de meio B (13g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8,75g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 4,5g MgSO<sub>4</sub>; 0,5g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 2,5g Extrato de levedura e 40mL de glicerol) em erlenmayer de 250mL e crescida por cerca de 18 horas à temperatura de 30°C e sob agitação orbital constante de 250rpm. Essa cultura foi posteriormente inoculada em 500mL do mesmo meio e transferidos para frasco "spinner" devidamente esterilizado. Foi mantida sob essas condições por 2 dias, quando foi alimentada com 40 mL de solução de glicerol 50% autoclavada. Posteriormente a batelada foi induzida com 1% do volume de meio, de metanol diariamente, durante um período de 96 horas. O pH foi mantido em 5–5,5 corrigido com hidróxido de amônia 50% diluído em água Milli-Q autoclavada. Após indução, a cultura foi centrifugada a 3000xg por 15 minutos

e o sobrenadante submetido a ultra-filtração em membrana de 30 kDa e 1 kDa.

### Padronização do Dot-ELISA

Para padronização da técnica, foram utilizados soros bovinos confirmados por RIFI como negativo e positivo. Após conhecer a concentração do peptídeo recombinante, realizou-se a titulação do antígeno como forma de verificar a menor concentração capaz de promover a reação. Membranas de nitrocelulose de 0,22µm foram sensibilizadas com antígeno diluído em PBS (4,25g NaCl; 0,64g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,068g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O; H<sub>2</sub>O deionizada q.s.p. 500mL; pH 7,6) nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2µg/poço e secas durante duas horas em refrigeração a 4°C. Cada concentração foi feita em quadruplicata com duas réplicas para cada concentração.

Após sensibilização, foram submetidas a bloqueio com PBST+Caseína 0,3% (PBS; Tween20; Caseína), por 30 minutos. Logo depois, as membranas foram submetidas a diluições distintas (1:50, 1:100, 1:200 e 1:400) do soro positivo e soro negativo durante uma hora. Posteriormente, as membranas foram lavadas três vezes por cinco minutos sob agitação lenta com PBST a 0,5% e incubadas com Proteína G marcada com peroxidase em uma diluição de 1:5000, durante 30 minutos. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas duas vezes com PBST a 0,5% e mais uma vez com PBS. A revelação foi feita mediante a adição de uma solução reveladora a base de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB), Tris 50mM, cloreto de níquel ao 0,3% e água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A reação ocorreu em 30 segundos e foi parada fazendo duas lavagens com 200µL de água destilada. Todas as etapas foram realizadas em temperatura ambiente sob agitação constante.

Considerou-se como melhor resultado para efeito da padronização, a diluição do antígeno que apresentou melhor definição visual de cor entre o soro positivo e negativo.

### Amostras

Foram utilizadas 44 amostras de sangue de bovinos de diferentes idades provenientes da Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Gado de Leite do Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal de Viçosa – MG, todas com diagnóstico sorológico de infecção por *Neospora caninum* por meio de RIFI realizado no laboratório TECSA (Belo Horizonte, MG). Com base no diagnóstico sorológico, os animais foram distribuídos em dois grupos, sendo 22 soropositivos e 22 soronegativos.

As amostras sanguíneas foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores – LBCHV, no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, onde foram centrifugados a 1500xg por 5 minutos. Os soros foram identificados e armazenados em criotubos e conservados em freezer a -20°C, até a realização das análises.

### Cálculo de sensibilidade e especificidade

Para efeito de cálculo da sensibilidade e especificidade do Dot-ELISA, utilizaram-se as fórmulas propostas por Guimarães MCS (1985):

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{Verdadeiros Positivos}}{(\text{Verdadeiros Positivos} + \text{Falsos Negativos})} \times 100$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{Verdadeiros Negativos}}{(\text{Verdadeiros Negativos} + \text{Falsos Positivos})} \times 100$$

### Desenho do kit para campo

Para o desenho do kit diagnóstico de *Neospora caninum* a campo, foi utilizada a Plataforma Tecnológica RapidFlow-Through Miriad® seguindo as indicações do fabricante (MedMira).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O peptídeo rNcGRA1 se origina de uma proteína dos grânulos denso liberada durante a fase de conversão do estado de taquizoítos a bradizoítos de *Neospora caninum*. As análises do peptídeo utilizado neste estudo revelaram que o mesmo é composto por 78 aminoácidos, possui peso molecular de 8,08kDa, e ponto isoelétrico de 4,3. Os peptídeos recombinantes apresentam elevada sensibilidade e especificidade para o diagnóstico, sobretudo ausência de reação cruzada. O peptídeo rNcGRA1, comparado com 23 milhões de sequências, apresentou 48% de similaridade com a proteína íntegra GRA1 e 50% de similaridade com *Neospora caninum*, cepa Liverpool, sendo um peptídeo recombinante com capacidade de ser reconhecido pelos anticorpos de bovinos e ovinos (Patarroyo et al. 2013) infectados naturalmente.

A quantificação proteica revelou concentração de 4µg/µL. No presente estudo, as diferentes concentrações empregadas reagiram aos testes, sendo a concentração ideal considerada para efeito de padronização de 0,5µg/poço, sugerindo que o peptídeo recombinante apresenta uma conformação com características semelhantes às proteínas nativas de *N. caninum*, tendo a capacidade de ser utilizado para o desenvolvimento de métodos de imunodiagnóstico.

Antígenos gerados a partir de domínios de superfície de *N. caninum* já têm sido utilizados, demonstrando resultados satisfatórios com soro bovino e potencial para o desenvolvimento de testes sorológicos específicos para neosporose (Pinheiro et al. 2013). Além disso, o uso de antígenos produzidos em sistema de expressão em levedura tem demonstrado ser geneticamente estável, pois uma vez transformadas, são capazes de crescimento em meios de cultura relativamente simples e de produção em escala industrial (Cereghino et al. 2002). Recentemente, as pesquisas com antígenos recombinantes para o diagnóstico sorológico de *N. caninum* têm sido desenvolvidas usando proteínas de superfície íntegras, sendo este estudo o primeiro a utilizar peptídeos recombinantes contendo fragmentos da proteína íntegra do complexo apical e mostrar eficiência para o diagnóstico da neosporose.

No que se refere à padronização da técnica de imunodiagnóstico, o bloqueio demonstrou ótimo desempenho, e o valor de diluição ótimo dos soros empregados na realização dos testes foi de 1:200. Além disso, a diluição do conjugado a1:5000 forneceu distinção visual entre os soros controles positivo e negativo.

Após a padronização da técnica, com os 44 soros testados no presente estudo, 95,5% coincidiram com o diagnóstico feito por RIFI (Fig.1), sendo maior que a concordância verificada por Sartor et al.(2003) ao comparar as técnicas de ELISA e RIFI usando uma diluição 1:200, constatando que a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* foi 85% superior na primeira técnica.

O imunodiagnóstico por Dot-ELISA tem sido avaliado e mostrou-se eficiente, tendo concordância entre resultados obtidos pelo teste ELISA comercial e o Dot-ELISA em soros de bovinos (Ahmad et al. 2011). No presente estudo, de acordo com os soros avaliados, verificou-se uma sensibilidade e especificidade de 100% e 92% respectivamente, índices que superam os valores relatados por Ahmad et al.

C+	3	7	11	15	19	C+	25	29	33	37	41
C-	4	8	12	16	20	C-	26	30	34	38	42
1	5	9	13	17	21	23	27	31	35	39	43
2	6	10	14	18	22	24	28	32	36	40	44

Fig.1. Dot-ELISA utilizando antígeno rNcGRA1 com bovinos soropositivos (à esquerda) e soronegativos (à direita) para *Neospora caninum*.

(2011), onde reportaram uma sensibilidade de 95% e especificidade de 88%, utilizando como antígeno taquizoítos de *N. caninum*.

O teste padronizado tem a capacidade de reconhecer a presença de IgG específicas para *N. caninum*, sendo um teste capaz de diagnosticar animais clinicamente saudáveis mas persistentemente infectados. Em bezerros ou bovinos adultos, anticorpos específicos IgG aparecem no sangue poucos dias após a infecção primária e aumentam durante a primeira semana até três a seis meses após a infecção experimental primária (Williams et al. 2000). Permitindo diagnosticar animais em qualquer fase da doença e inclusive com o parasito em período de latência.

Quanto ao teste na Plataforma Tecnológica RapidFlow-ThroughMiriad®, o peptídeo rNcGRA1 apresentou marcações visíveis ao reagir com os soros positivos, e não apresentou marcações usando os soros negativos. Para uma melhor visualização da marcação, a concentração do antígeno usada foi 1,5µg/µL (Fig.2).

No kit, a proteína G do conjugado se liga aos anticorpos anti-*N.caninum* do complexo e a concentração do ouro coloidal permitirá a visualização de um ponto colorido (vermelho). O kit desenhado para o diagnóstico em campo trata de um teste inovador, de fácil leitura, o qual usa proteína G conjugada com ouro coloidal, permitindo uma ligação com o anticorpo específico em segundos, e a totalidade do teste pode ser completada em aproximadamente 12 minutos. Pela praticidade para sua execução, o kit pode ser usado para levantamentos serológicos usando uma gota de sangue ou de soro por tratar-se de um método preciso,



Fig.2. Reação na Plataforma Tecnológica RapidFlow-ThroughMiriad® usando diferentes concentrações do antígeno rNcGRA1 e bovino soropositivo (à esquerda) e soronegativo (à direita) para *Neospora caninum*.

sensível, rápido e facilidade na leitura qualitativa dos resultados, onde a formação de um ponto de cor sobre a nitrocelulose é considerado como positivo sem importar a intensidades da marcação.

## CONCLUSÕES

O uso deste peptídeo recombinante gerado a partir de fragmentos da proteína dos grânulos densos de *Neospora caninum* (rNcGRA1) mostrou-se eficiente para o diagnóstico sorológico de bovinos naturalmente infectados.

Propõe-se a técnica Dot-ELISA como uma ferramenta de diagnóstico para neosporose com alta sensibilidade e especificidade, além de ser um método rápido e preciso.

O kit para uso a campo é um teste qualitativo, baseado na tecnologia da Plataforma Tecnológica RapidFlow-ThroughMiriad® com a utilização do peptídeo recombinante capaz de reagir com soros de animais naturalmente infectados, convertendo-se em uma alternativa para veterinários e produtores ao momento de selecionar animais livres da doença.

## REFERÊNCIAS

- Ahmad N., Jozani J. & Neda Z. 2011. Adaptation of Dot-Elisa for serodiagnosis of *Neospora caninum* infestation in aborted cows. *Global Vet.* 7(2):149-152.
- Atkinson R., Harper P.A.W., Reichel M.P. & Ellis J.T. 2000. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. *Parasitol. Today* 16(1):110-114.
- Brautigam F.E., Hietala S.K. & Glass R. 1996. Resultados de levantamento sorológico para a espécie *Neospora caninum* em bovinos de corte e leite. *Anais XV Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias, Campo Grande, MS, p.284. (Resumo)*
- Cereghino G.P.L., Cereghino J.L., Ilgen C. & Cregg J.M. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13(4):329-332.
- Dubey J.P. & Schares G. 2011. Neosporosis in animals: the last five years. *Vet. Parasitol.* 180:90-108.
- Dubey J.P. 1999. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 8(4):349-367.
- Gondim L.F.P., McAllister M.M., Pitt W.C. & Zemlicka D.E. 2004. Coyotes (*Canislatrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 34:159-161.
- Guimarães M.C.S. 1985. Exames de laboratorio: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo. *Revta Soc. Bras. Med. Trop.* 18:117-120.
- Patarroyo J.H., Vargas M.I., Cardona J.A., Blanco R.D. & Gomez V.E. 2013. Frecuencia serológica de infección por *Neospora caninum* en ovinos en el departamento de Córdoba, Colombia. *MVZ Córdoba* 18(3):3886-3890.
- Pinheiro A.F., Borsuk S., Berne M.E., Pinto L.S., Andreotti R., Roos T., Roloff B.C. & Leite F.P. 2013. Expression of *Neospora caninum* NcSRS2 surface

- protein in *Pichia pastoris* and its application for serodiagnosis of *Neospora* infection. *Pathog. Glob. Health* 107(3):116-121.
- Pinheiro R.R. 2001. Virus da artrite encefalite caprina: desenvolvimento e padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot-Blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará. Dissertação de Doutorado, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- Pinheiro R.R., Chaves C.D.O., Guimarães A.M.G., Costa S.A. & Andrioli A. 2006. Desenvolvimento de dot-blot para detecção de anticorpos para o vírus da Artrite Encefalite Caprina em caprinos. *Revta Port. Ciênc. Vet.* 101:51-56.
- Sartor I.F., Hasegawa M.Y., Canavessi A.M.O. & Pinckney R.D. 2003. Ocorrência de anticorpos de *Neospora caninum* em vacas leiteiras avaliados pelos métodos de ELISA e RIFI no município de Avaré, SP. *Semina, Ciênc. Agrarias* 24:3-10.
- Trees A.J. & Williams D.J. 2005. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol.* 21:558-561.
- Williams D.J., Guy C.S., McGarry J.W., Guy F., Tasker L., Smith R.F., MacEachern K., Cripps P.J., Kelly D.F. & Trees A.J. 2000. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology* 121:347-358.
- Yao L., Yang N., Liu Q., Wang M., Zhang W., Qian W.F., Hu Y.F. & Ding J. 2009. Detection of *Neospora caninum* in aborted bovine fetuses and dam blood samples by nested PCR and ELISA and seroprevalence in Beijing and Tianjin. *Parasitology* 136(11):1251-1256.
- Yildiz K., Kul O., Babur C., Kilic S., Gazyagci A.N., Celebi B. & Gurcan I.S. 2009. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle ranches with high abortion rate: special emphasis to serologic co-existence with *Toxoplasma gondii*, *Brucella abortus* and *Listeria monocytogenes*. *Vet. Parasitol.* 164(2):306-310.