

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

**Programa de Pós-Graduação em Parasitologia**



**Dissertação**

**Ocorrência de anticorpos para *Neospora caninum* em cães da área  
urbana e rural do sul do Rio Grande do Sul.**

**Nilton Azevedo da Cunha Filho**

**PELOTAS 2007**

Nilton Azevedo da Cunha Filho

**Ocorrência de anticorpos para *Neospora caninum* em cães da  
área urbana e rural do sul do Rio Grande do Sul.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Parasitologia).

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Nara Amélia da Rosa Farias

PELOTAS 2007

Banca Examinadora

Dr<sup>a</sup>. Nara Amélia da Rosa Farias (Orientadora)

-----

Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

-----

Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Sastre Sacco

-----

Dr<sup>a</sup>. Izabella Cabral Hassum

-----

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de ter encontrado ao longo de todos estes anos, de graduação e pós-graduação, pessoas como vocês, meus colegas e funcionários do Laboratório de Parasitologia, que mal ou bem se tornaram ao longo de todos estes anos parte da minha família, pois só quem esta longe de casa sabe a falta que isso traz. Cada um de vocês soube suprir um pouco essa carência ao longo de todos estes anos de convívio.

A minha querida orientadora, mãe, amiga e às vezes até enfermeira Nara Amélia, por ter sido tão importante ao longo de toda esta caminhada, me mostrando o caminho certo a seguir, e em muitas situações caminhamos juntos dividindo conhecimentos e compartilhando um pouco de sua experiência. Por tudo isso e muito mais, Nara Amélia, fica o meu muito obrigado por você ter sabido ir mais além.

Professora Solange Maria Gennari muito obrigado por ter aberto as portas de seu laboratório nos oferecendo toda a infra-estrutura para a realização da parte experimental deste trabalho. Compartilhar do seu conhecimento durante o pouco, mas muito precioso tempo que estive do seu lado, sei que foi muito importante para a minha vida profissional. Espero que este laço de amizade e profissionalismo que criamos não pare por aqui, siga adiante com novas conquistas.

Não poderia deixar de mencionar o nome de Alessandra Ragozo, minha mestra e guia no tempo em que estive na USP. Muito obrigado por ter muita paciência e dedicação com este gaúcho nos ensinamentos da imunofluorescência, pois para atingir este objetivo, foi necessário evoluir, ir adiante, melhorar com o passar do tempo, superar deficiências (vortex, “lembra da tremedeira com as micropipetas?”) e aprimorar atributos. Não existe nada na vida que uma pessoa determinada não consiga aprender e com os teus ensinamentos consegui realizar todas as minhas análises com sucesso, “mil graças”.

A todos os professores, colegas e funcionários do Laboratório de Doenças Parasitárias da USP, pela ajuda incondicional, assistência técnica e também nas poucas horas vagas algumas dicas de turismo, com muita gratidão a vocês: Rodrigo, Silvio, Maurício, Hilda, Patrícia, Leandra e Renatinho.

Agradeço a todos os professores do pós-graduação em Parasitologia da UFPel sempre dispostos a ajudar quando preciso. Faço amigos ao mesmo tempo que trabalho e acredito que cada um de vocês, além de mestres hoje são meus grandes amigos: João Guilherme, Gertrud e Bretanha muito obrigado.

Gostaria de reconhecer também a grande dedicação da professora Beth (coordenadora do curso de pós-graduação) sempre me dando incentivos em ir mais além, alcançar novos objetivos e buscar com afinco aquilo que almejo.

Ao professor Fábio Leivas Leite pela extraordinária ajuda, principalmente no inglês, sempre disposto a ajudar no que for preciso com muita dedicação e profissionalismo.

A Tânia Maria, não poderia deixar de mencionar, pois também o convívio destes anos todos ultrapassou o profissional e nos tornamos uma única família, sempre acolhendo em sua casa aqueles estudantes “locos de fome” (Nilton e Alex) para um café de tardezinha com pãozinho de casa e de sobremesa umas rapadurinhas de leite da Dona Rita. Sei que sempre poderei contar contigo e tu também sabes que a recíproca é verdadeira, obrigado.

Ao colega Hermann Grau, fronteiroço como eu, pela amizade construída, pelo incentivo que me deste para realizar a prova de seleção do mestrado, que sem o qual talvez não tivesse feito. “Xirú velho”, sucesso para nós nessa nova caminhada e lembra-te que nós não somos uns “coiós” como tu sempre diz. Obrigado por este convívio e muitos ensinamentos, valeu mano velho.

Ao amigo Jerônimo pessoa ímpar entre as que eu tive o prazer de conviver, sempre companheiro para qualquer empreitada, principalmente as de quinta-feira é claro. Entre um mate e outro, um conselho, uma experiência de vida, um ensinamento e às vezes uma simples dica de que a vida é simples e as maiores verdades da vida são as coisas simples. Por isso e por muito mais te agradeço do fundo do coração por esta parceria de irmão.

Quero agradecer a grande ajuda do meu amigo Gallina nas coletas de sangue dos cães, sempre dando dicas de como realizar a técnica de maneira adequada para alcançar com êxito o objetivo. Valeu pelas camperizadas atrás de cachorro pelo interior de Pelotas, sempre disposto e muito atencioso.

Ao meu grandíssimo amigo Felipe Pappen, este sim companheiro de todas as horas seja para uma coleta ou para um churrasco nas horas vagas, assim construímos uma grande amizade. Te agradeço por todo o empenho que tivestes comigo nas horas de trabalho, de manhã cedo quebrando geada e coletando sangue de cães, pode ser que algum dia eu possa retribuir toda a ajuda que me destes na realização deste trabalho, pois acredite, estou em dívida contigo.

A Lucas (Andréia) companheira de coletas, se não de todas da grande maioria, obrigado pelo auxílio e pelo costado que me fizestes principalmente em São Paulo, pois na tua ausência não saberia o que fazer, “me via feio e te pegava o grito”, lembra? Aquela estadia em São Paulo vai ficar para sempre na lembrança, os quartos (lembra que luxo?), mas mesmo assim conseguimos com muita dedicação fazer o nosso trabalho o mais bem feito possível, muito obrigado por não ter me deixado só por lá.

Muito obrigado a todos os meus familiares pelo apoio, incentivo e estímulo que me deram durante toda a minha vida. Aos meus tios, tias, primos e primas muito obrigado por fazerem parte de minha vida.

Bueno agora vem a parte mais difícil, agradecer a quem sempre esteve e sempre estará do meu lado seja qual for a situação, me apoiando em todas as decisões por mim tomadas. A minha Mãe (Clarisse), que é tudo de mais sagrado que tenho em minha vida, quem me ensinou e me mostrou o caminho certo a seguir, desde os primeiros passos até hoje. Com sua dedicação e superação conseguiu me colocar hoje na situação de quase Mestre e se Deus quiser um futuro Doutor. Não serão essas palavras que vão representar toda a minha gratidão, porque por tudo que fizestes até hoje palavras nenhuma conseguirão representar, por isso muito obrigado por simplesmente existir na minha vida.

Não posso de maneira alguma deixar de mencionar Dom Horácio (meu padasto) que também teve muita influência nas minhas conquistas, pois também sempre esteve do meu lado para ajudar quando fosse preciso, muito obrigado pelos ensinamentos a respeito da vida e principalmente pelo grande amor que sentes pela baixinha.

Ao meu irmão por estar sempre do meu lado quando precisei, amigo e companheiro, sempre juntos desde a infância, pois afinal de contas somos só os

dois e a Clarisse, e juntos conseguimos vencer todos os desafios que a vida nos impôs. Obrigado meu Deus pela família maravilhosa que me destes.

Fica a minha homenagem e agradecimento aqueles que hoje já não estão mais comigo, meus avós paternos (Diógenes e Arminda) e meus avós maternos (Carlos e Nilza) que sei esteja onde estiverem estarão sempre torcendo e olhando por mim. Sei que o tempo que pude passar com eles foi de grande valia e me sinto um privilegiado por ter podido desfrutar deste convívio, muito obrigado por tudo que vocês fizeram por mim e sei que continuam a fazer.

A meu Pai (Nilton) pelo simples fato de ter me proporcionado a vida, pois mesmo sem ter podido desfrutar de sua companhia, por voltas que a vida dá, acredito que cada fato na vida tem sua razão de ser, e que muitas vezes não conseguimos explicar o seu significado. Tenho certeza que não faltaram momentos onde me estendestes a mão e me mostrastes o caminho por onde eu deveria ter seguido, muito obrigado por este amor incondicional.

"Deus criou o AMOR e nós, humanos, não soubemos utilizá-lo. Ele então numa inspiração divina criou a AMIZADE e foi assim que o amor passou a ser utilizado na essência de seu significado. Quem está ligado por esse amor, distância alguma separa, pois a verdadeira amizade não une corpos, não une mentes, mas une corações e essa união é feita por Deus e o que Deus une, homem algum é capaz de separar."

## RESUMO

CUNHA FILHO, N. A. **Ocorrência de anticorpos para *Neospora caninum* em cães da área urbana e rural do sul do Rio Grande do Sul.** 2007. 77f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

*Neospora caninum* é um protozoário parasito que causa problemas neurológicos em cães. Foi demonstrado que os cães podem atuar como hospedeiros definitivos do parasito. Devido às diferenças entre as ocorrências e prevalências de *N. caninum* nos diversos estados brasileiros, e a falta de diagnóstico de animais soropositivos no Rio Grande do Sul, revelam a necessidade de maiores informações a respeito de ocorrências do *N. caninum* em cães no sul do Rio Grande do Sul. Cães provenientes do Município de Pelotas, de diferentes ambientes, rural (corte e leite) e urbanos domiciliados foram examinados. Amostras de soro de 339 cães foram testadas para a detecção de anticorpos para *N. caninum* mediante a reação de imunofluorescência indireta (RIFI  $\geq$  1: 50). Anticorpos para *N. caninum* foram encontrados em 53 (15,6%) amostras de soro dos cães. Na área urbana a ocorrência foi de 5,5%, entre os cães rurais, 14,1% (18 cães) eram de propriedades de criação de gado de leite e 28,4% (29 cães) de propriedade de corte. Foi observado que cães acima de três anos de idade são mais soropositivos para *N. caninum* e a soropositividade dos cães aumentou conforme aumentou a idade. Os títulos de anticorpos dos cães foram 1:50 (12 cães), 1:100 (07 cães), 1:200 (08 cães), 1:400 (19 cães), 1:800 (05 cães) e 1:1600 (02 cães). Nenhum dos cães examinados apresentou sinais clínicos de neosporose no momento da coleta de sangue. O estudo das variáveis (fatores de risco para *N. caninum*) na regressão logística feita entre o ambiente urbano e rural demonstrou que nos ambientes estudados, animais mais velhos tem 3,75 vezes mais chances de se infectarem com *N. caninum* do que animais jovens, até três anos de idade. Em propriedades que os proprietários não recolhem carcaças de animais mortos do campo representou um risco 2,67 vezes maior (IC 95% = 1,31-5,42) de infecção por *N. caninum*. Quando analisou-se em separado o ambiente rural (leite e corte) observou-se que, cães provenientes de propriedades de criação de gado de corte tem 2,24 vezes mais chance de serem infectados por *N. caninum* do que cães de propriedades de produção leiteira, e o risco de cães serem soropositivos em propriedades onde os proprietários não tem o hábito de recolher

carcaças de animais mortos do campo foi maior (*Odds Ratio* = 6,11 IC 95% = 1,00-37,17). Os dados sugerem que *Neospora caninum* está presente na região sul do Rio Grande do Sul, infectando cães urbanos domiciliados e rurais (leite e corte). A probabilidade de cães da área rural da região serem soropositivos para *N. caninum* é maior neste ambiente, provavelmente pelo fácil acesso destes animais a material infectado e ao grande contato cão/bovino, característico da bovinocultura da região. A principal forma de infecção por *N. caninum* entre os cães analisados é a horizontal (pós-natal), uma vez que a soroprevalência aumenta conforme aumenta a faixa etária.

Palavras chave: *Neospora caninum*, cães, imunofluorescência indireta (RIFI).

## ABSTRACT

**CUNHA FILHO, N. A. Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* in rural and urban dogs in the south of Rio Grande do Sul. 2007. 77f. Dissertation (Masters in Parasitology) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.**

*Neospora caninum* is a protozoan parasite that causes neurological problems in dogs. It has been shown that it may act as definitive hosts of the parasite. There is a need for more information on the occurrences of *N. caninum* in due to the wide range of its incidence in several Brazilian states, and the lack of animals diagnosed serum positive in Rio Grande do Sul. Rural dogs from (meat and dairy producers) and urban areas from the city of Pelotas were examined. Serum samples of 339 dogs were tested for the detection of antibodies against *N. caninum* by indirect immunofluorescence (RIFI  $\geq$  1:50). Antibodies for *N. caninum* were found in 53 (15,6%) of the dogs serum samples. The occurrence in the urban area was 5,5%, among the rural dogs 14,1% (18 dogs) belonged to dairy and 28,4% (29 dogs) from cattle farms. Dogs over three years old present the higher levels of serum positively and its presence increased with age. The dogs antibody titers were 1:50 (12 dogs), 1:100 (07 dogs), 1:200 (08 dogs), 1:400 (19 dogs), 1:800 (05 dogs) and 1:1600 (02 dogs). None of the dogs examined presented clinical signs of neosporosis when the blood was collected. The study of the variables (risk factors for *N. caninum*) in the logistic regression between the rural and urban environment has shown that older animals are 3,75 times more likely to get infected by the *N. caninum* then the younger ones. Also in farms where the carcasses of dead animals are not removed there is a risk 2,67 times greater (IC 95% = 1,31 – 5,42) of a *N. caninum* infection. In the rural environment, dogs from cattle raising farms have a chance 2,24 times greater of being infected by *N. caninum* then dogs from dairy farms. In addition, the risk of having serum positive dogs in farms where the carcasses are not removed was more significant (OR = 6,11 IC 95% = 1,00 – 37,17). The data suggest that *Neospora caninum* is present in the southern region of Rio Grande do Sul and afflicts both rural and urban dogs. The probability of serum positive dogs in the rural area is grater, possibly by the easy access they have to infected material and the canine/bovine contact, which is characteristic of the cattle raising in the region. The

main form of infection by *N. caninum* among the dogs studied is the horizontal (post natal), suggested by the fact that serum prevalence increase with the age.

Key words: *Neospora* sp., dogs, immunofluorescence.

## LISTA DE FIGURAS

|            |                                                                                                                        |    |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - | Canídeo silvestre característico do Rio Grande do Sul no seu ambiente natural, juntamente com animais de produção..... | 38 |
| Figura 2 - | Frequências de cães soropositivos para <i>N. caninum</i> na população estudada (urbanos e rurais), Pelotas-RS.....     | 47 |
| Figura 3 - | Ocorrência de cães soropositivos para <i>N. caninum</i> através da técnica de RIFI, em relação à faixa etária.....     | 48 |

## LISTA DE TABELAS

|             |                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela -1   | Frequência de bovinos soropositivos para <i>N. caninum</i> , no Brasil, segundo a região de origem, a aptidão dos animais, e a técnica de diagnóstico empregada.....                                                                | 24 |
| Tabela - 2  | Ocorrências de anticorpos para <i>N. caninum</i> em cães de diferentes municípios brasileiros, segundo a procedência dos mesmos .....                                                                                               | 29 |
| Tabela - 3  | Distribuição de cães (n=339) segundo possíveis fatores de risco para infecção por <i>N. caninum</i> na área urbana e rural do município de Pelotas, RS.....                                                                         | 44 |
| Tabela - 4  | Distribuição de cães estudados na área rural (n=230) segundo possíveis fatores de risco para infecção por <i>N. caninum</i> , no município de Pelotas, RS.....                                                                      | 45 |
| Tabela - 5  | Ocorrência de cães soropositivos para <i>N. caninum</i> em relação à origem (urbanos e rurais), Pelotas, RS.....                                                                                                                    | 48 |
| Tabela - 6  | Ocorrência de cães soropositivos para <i>N. caninum</i> em relação a origem (urbanos, propriedades de criação de gado de corte e propriedades de criação de gado de leite), Pelotas, RS.....                                        | 48 |
| Tabela - 7  | Títulos de anticorpos para <i>N. caninum</i> em cães de acordo com a faixa etária dos animais no sul do Rio Grande do Sul, Pelotas, RS.....                                                                                         | 49 |
| Tabela - 8  | Títulos de anticorpos para <i>N. caninum</i> em cães da área urbana e rural do sul do Rio Grande do Sul, Pelotas, RS.....                                                                                                           | 49 |
| Tabela - 9  | Variáveis (fatores de risco) sem associação significativa com a soropositividade de cães da região de Pelotas, RS.....                                                                                                              | 51 |
| Tabela - 10 | Variáveis (fatores de risco), incluídas na regressão logística.....                                                                                                                                                                 | 52 |
| Tabela - 11 | Modelo final da análise multivariada (regressão logística) demonstrando as variáveis que apresentaram associação significativa com a sorologia dos cães entre a área urbana e rural do sul do Rio Grande do Sul, Pelotas, RS.....   | 53 |
| Tabela - 12 | Modelo final da análise multivariada (regressão logística) demonstrando as variáveis que apresentaram associação significativa com a sorologia dos cães na área rural (leite e corte) do sul do Rio Grande do Sul, Pelotas, RS..... | 53 |

## SUMÁRIO

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 - INTRODUÇÃO .....                                                   | 17 |
| 2 - OBJETIVOS .....                                                    | 19 |
| 3 - REVISÃO DE LITERATURA .....                                        | 20 |
| 3.1 – <i>Neospora caninum</i> .....                                    | 20 |
| 3.2 – Morfologia .....                                                 | 21 |
| 3.3 – Biologia de <i>Neospora caninum</i> .....                        | 22 |
| 3.4 – Epidemiologia .....                                              | 23 |
| 3.4.1 – Transmissão vertical entre os bovinos .....                    | 25 |
| 3.4.2 – Transmissão horizontal .....                                   | 25 |
| 3.5 – <i>Neospora caninum</i> em cães .....                            | 27 |
| 3.6 – Sinais clínicos em cães .....                                    | 30 |
| 3.7 – Diagnóstico de <i>Neospora caninum</i> em cães .....             | 31 |
| 3.7.1 – Diagnóstico direto .....                                       | 31 |
| 3.7.1.1 – Técnicas histológicas .....                                  | 31 |
| 3.7.1.2 – Técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) .....        | 32 |
| 3.7.2 – Diagnóstico indireto .....                                     | 32 |
| 3.7.2.1 – RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) .....           | 32 |
| 3.7.2.2 – ELISA (Ensaio Imunoenzimático) .....                         | 33 |
| 3.7.2.3 – NAT ( <i>Neospora</i> agglutination test) .....              | 34 |
| 3.8 – Importância e impacto econômico de <i>Neospora caninum</i> ..... | 34 |
| 3.9 – Potencial zoonótico .....                                        | 35 |
| 3.10– <i>Neospora caninum</i> em animais silvestres .....              | 36 |
| 3.11 – Controle e Profilaxia .....                                     | 38 |
| 4 - MATERIAL E MÉTODOS .....                                           | 39 |

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1 - Área de Estudo .....                                               | 39 |
| 4.2 - Cães.....                                                          | 40 |
| 4.3 - Colheita das Amostras .....                                        | 41 |
| 4.4 - Análise Laboratorial .....                                         | 41 |
| 4.4.1 – Antígeno de <i>Neospora caninum</i> .....                        | 41 |
| 4.4.2 – Detecção de anticorpos (RIFI) para <i>Neospora caninum</i> ..... | 41 |
| 4.5 - Análise Estatística .....                                          | 43 |
| 5 - RESULTADOS.....                                                      | 44 |
| 5.1 – Caracterização da amostra .....                                    | 44 |
| 5.2 – Ocorrência de anticorpos para <i>Neospora caninum</i> .....        | 47 |
| 5.3 – Título de anticorpos para <i>Neospora caninum</i> .....            | 49 |
| 5.4 – Associação entre fatores de risco .....                            | 50 |
| 5.5 – Regressão Logística das variáveis com $p < 0,25$ .....             | 52 |
| 6 - DISCUSSÃO .....                                                      | 55 |
| 7 - CONCLUSÕES .....                                                     | 61 |
| 8 - REFERÊNCIAS.....                                                     | 62 |
| ANEXO.....                                                               | 75 |

## INTRODUÇÃO

Neosporose é uma enfermidade que causa grandes perdas econômicas na pecuária de corte e de leite de vários países do mundo, pois pode ser um agente de abortamento em bovinos, inclusive na América do Sul.

O agente etiológico é o protozoário *Neospora caninum* Dubey; Carpenter; Speer; Topper e Uggla, (1988a), e pode ser transmitido aos bovinos através da ingestão de oocistos esporulados em fezes de cães que são os hospedeiros definitivos, nos quais ocorre o desenvolvimento sexual do parasito e produção de oocistos (McALLISTER et al., 1998). Os oocistos podem atingir pastagens e aguadas e, por fim, virem a contaminar os animais (mamíferos em geral), entre eles bovinos, ovinos e eqüinos. Também pode ocorrer transmissão transplacentária em cães e bovinos (BJÖRKMAN et al., 1996).

O cão foi primeiramente conhecido como hospedeiro intermediário de *N. caninum* (BJERKAS, et al., 1984), através de cistos em filhotes com lesões neurológicas. Somente em 1998, McCallister et al., comprovaram o papel do cão como hospedeiro definitivo do parasito, ao constatarem a eliminação de oocistos por cães experimentalmente infectados.

A soroprevalência de *N. caninum* em cães tem sido avaliada em vários países, inclusive no Brasil, revelando índices variáveis de acordo com o habitat dos animais, convívio com bovinos e técnica sorológica utilizada (CAÑON-FRANCO et al., 2003).

As diferenças entre as ocorrências e prevalências de *N. caninum* nos diversos estados brasileiros revelam a necessidade de maiores estudos sobre a epidemiologia do parasito.

Na região sul do Rio Grande do Sul, embora tenha sido confirmada a ocorrência de aborto por *N. caninum* (PAPPEN et al., 2005), não são conhecidas as ocorrências e prevalências desta enfermidade em bovinos e em cães da região. Um fator que pode ter grande importância epidemiológica é de que, no RS, são criados bovinos de raças européias, em cujo manejo sempre são utilizados cães, diferentemente do restante do país, em que predominam raças zebuínas e o cão não é utilizado para seu manejo. A proximidade cão/bovino pode ser um facilitador da disseminação de *N. caninum*.

No presente trabalho, foram examinados soros de cães da região a fim de conhecer a ocorrência de *N. caninum* entre aqueles de área urbana (domiciliados) e de área rural (de propriedades com gado de leite e outras com gado de corte), além de detectar fatores de risco envolvidos nessa infecção.

## **2- OBJETIVOS**

### **2.1 – Objetivo geral**

- ♦ Avaliar a importância do cão doméstico de diferentes ambientes (urbano e rural, de criação de gado de corte e de criação de gado de leite) do sul do Rio Grande do Sul, na epidemiologia de *Neospora caninum*.

### **2.2 – Objetivos específicos**

- ♦ Determinar a ocorrência de cães soropositivos para *Neospora caninum* na área urbana, em propriedades rurais de criação de gado de corte e naquelas de criação de gado leiteiro, no sul do Rio Grande do Sul.
- ♦ Verificar fatores de risco que possam determinar possíveis diferenças na soropositividade dos cães entre os ambientes estudados.

### 3 - REVISÃO DE LITERATURA.

#### 3.1 – *Neospora caninum*

O coccídio *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper e Uggla, 1988a) é um importante agente causador de aborto em bovinos em todo o mundo. Em cães, o parasito é responsável por desordens neurológicas severas principalmente em ninhadas de filhotes congenitamente infectadas, onde forma cistos no sistema nervoso central (DUBEY, 1999a; DUBEY et al., 1988b).

Bjerkas et al. (1984) diagnosticaram, na Noruega, uma doença semelhante à toxoplasmose em uma ninhada de cães da raça Boxer. Foram observadas, nestes cães, desordens neurológicas entre o segundo e sexto mês após o nascimento. Formas proliferativas e cistos foram encontrados no cérebro e músculos. Estes animais não reagiram em técnicas de diagnóstico para toxoplasmose e cistos inoculados em camundongos não foram infectantes.

A neosporose foi diagnosticada pela primeira vez em 1988, quando Dubey e colaboradores, nos Estados Unidos, isolaram e descreveram um protozoário em filhotes de cães, que apresentavam sinais clínicos similares aos descritos por Bjerkas na Noruega, passando o agente a se chamar *Neospora caninum* (DUBEY et al., 1988a). Logo que *N. caninum* foi reconhecido como causa de doença em cães, parasitos semelhantes foram identificados em fetos bovinos abortados, mumificados, e em terneiros com paralisia neonatal (MARSH et al., 1995). Desde este momento até os dias de hoje, neosporose em bovinos tem sido reconhecida em várias partes do mundo (ANDERSON et al., 2000), e já foi demonstrado que bovinos e caninos se infectam com a mesma espécie de *Neospora* (DUBEY, 1999b).

*N. caninum* não é, portanto, um parasito novo e sim recentemente diagnosticado, pois estudos retrospectivos mostraram que severa enfermidade devido ao agente já acometia cães em 1957, nos EUA (DUBEY et al., 1990).

O desenvolvimento do teste imuno-histoquímico permitiu a identificação de *N. caninum* nos tecidos fixados em formalina, sendo possível o diagnóstico da infecção em uma grande variedade de animais que podem servir de hospedeiros intermediários (LINDSAY e DUBEY, 1989).

McAllister et al. (1998) definiram o cão (*Canis familiaris*) como hospedeiro definitivo de *N. caninum*. E mais recentemente, Gondim et al. (2004) evidenciaram que o coioate (*Canis latrans*) também faz parte do ciclo de vida de *N. caninum*, sendo definido como hospedeiro definitivo.

Segundo LONG (1990), a classificação taxonômica do parasito é a seguinte:

Reino – Protozoa

Filo – Apicomplexa

Classe – Sporozoa

Sub-classe – Coccidiasina

Ordem – Eucoccidiorida

Sub-ordem - Eimeriorina

Família – Sarcocystidae

Sub-família – Toxoplasmatinae

Gênero – *Neospora*

Espécie – *Neospora caninum*

### 3.2 – Morfologia

*N. caninum* apresenta as três formas típicas de protozoários da família Sarcocystidae: taquizoítos, cistos (contendo no seu interior os bradizoítos) (FUCHS et al., 1998) e esporozoítos no interior dos oocistos. Os taquizoítos tem formato semi-lunar e medem aproximadamente 6 x 2 µm, sendo a fase de multiplicação rápida do parasito. Apresentam várias organelas no seu interior, localizadas no

complexo apical, que desempenham funções de secreção de enzimas, fixação com adesão a receptores de superfície e sustentação. Podem ser encontrados em células nervosas, macrófagos, células endoteliais vasculares, miócitos, células epiteliais tubulares renais, hepatócitos, coração, pulmão, rins e placenta (DUBEY, 1999b).

Com a atuação do sistema imunológico e de outros fatores fisiológicos os taquizoítos diferenciam-se em bradizoítos cronificando a infecção sob a forma de cistos, que medem aproximadamente 107  $\mu\text{m}$  de diâmetro, com parede lisa medindo 1 a 4  $\mu\text{m}$  de espessura. Geralmente são encontrados no tecido nervoso dos hospedeiros intermediários e muito raramente no tecido muscular (PETERS et al., 2001). O oocisto que é liberado pelo hospedeiro definitivo é esférico e mede de 10 a 11  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Quando esporulado possui no seu interior dois esporocistos cada um com quatro esporozoítos (DUBEY, 1999b).

### 3.3 - Biologia de *N. caninum*

*N. caninum* é um protozoário que tem ciclo de vida heteroxeno. O cão (*Canis familiaris*) e o coiote (*Canis latrans*) são os únicos hospedeiros definitivos até hoje conhecidos. Entre os hospedeiros intermediários vários mamíferos estão envolvidos, sendo mais importantes os bovinos, devido ao grande impacto econômico que *N. caninum* pode ocasionar tanto na pecuária de corte como de leite, por causas como: perdas relativas aos abortos, reposição de animais positivos, queda na produção de leite e gastos com diagnóstico e médico veterinário (BARR et al., 1997, HERNANDEZ et al. 2001).

O ciclo biológico de *N. caninum* ainda não é bem conhecido, principalmente no que diz respeito à fase intestinal, que compreende a fase sexuada de evolução. Sabe-se que o período pré-patente é de cinco a oito dias após a ingestão dos cistos teciduais (LINDSAY e DUBEY, 2000). Devido à sua similaridade taxonômica e biológica com *Toxoplasma gondii* e por ser um coccídio com carnívoros como hospedeiros definitivos, Dubey (1999b) propôs seu ciclo de vida.

Oocistos liberados no ambiente pelo hospedeiro definitivo se tornam infectantes ao esporular (McALLISTER et al., 1998). São ingeridos pelo hospedeiro intermediário (bovinos, ovinos, cães, bubalinos, caprinos e outros) e, na luz

intestinal, são liberados os esporozoítos. Estes penetram nas células da parede intestinal passando a se chamar de taquizoítos, que se multiplicam rapidamente e podem atingir quaisquer células do organismo do hospedeiro, causando severas lesões em vários órgãos. Alguns destes se transformam em bradizoítos no interior de cistos, permanecendo na forma de latência, em lenta divisão no hospedeiro intermediário. Quando ocorrer a ingestão destes cistos pelo cão ou o coioote, os bradizoítos, que são resistentes às soluções pépticas e ácidas responsáveis pela digestão, iniciarão o processo de penetração no epitélio intestinal dando origem às formas resultantes da multiplicação assexuada e sexuada do parasito, e, por fim, à liberação de oocistos não esporulados no ambiente, reiniciando o ciclo (DUBEY 1999b).

### 3.4 – Epidemiologia

*N. caninum* tem sido relatado em diversas espécies de mamíferos, tendo os bovinos e os cães como espécies de destaque.

A participação do cão na epidemiologia da neosporose foi experimentalmente demonstrada por McCallister et al., em 1998, quando pela primeira vez foi observada a eliminação de oocistos de *N. caninum* nas fezes de cães que, assim, foram reconhecidos como hospedeiros definitivos do parasito. No experimento, os autores alimentaram cães com camundongos contendo cistos teciduais. Os cães eliminaram oocistos, que foram inoculados em camundongos; em um dos camundongos foi observada a presença de taquizoítos em vários órgãos e tecidos. Através de métodos de diagnóstico, como a histopatologia, a imunohistoquímica e a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) o parasito foi identificado. Entretanto, o número de oocistos eliminados nas fezes foi baixo em relação à quantidade de cistos ingeridos pelos cães.

Durante a década passada, a infecção por *N. caninum* emergiu como uma doença reprodutiva importante no rebanho bovino em todo o mundo. A partir de então, vários estudos tem sido realizados com o objetivo de verificar o status sorológico dos rebanhos e identificar abortos ocasionados pelo *N. caninum*.

Andreotti et al., (2006) observaram amostras de soro sanguíneo de gado de corte proveniente de Campo Grande e da região do Pantanal (MS), juntamente com

amostras de soro sanguíneo de cães de Campo Grande. Anticorpos foram detectados por RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) em cães e ELISA (Ensaio Imunoenzimático) nos bovinos. Em vacas com histórico de aborto a prevalência foi de 43% e vacas sem histórico, 7,7%. Portanto na região de Campo Grande a ocorrência de anticorpos para *N. caninum* foi de 5,58 vezes maior em animais com histórico de aborto. Nos cães a prevalência foi de 30%.

Sartor et al. (2005) relatam que os levantamentos soropidemiológicos de *N. caninum* em várias regiões do Brasil têm demonstrado que o parasito está distribuído amplamente, assim como ocorre em outros países do mundo. As freqüências de bovinos soropositivos em rebanhos de diferentes estados do Brasil, encontram-se na (tab. 1).

Tabela 1 – Freqüência de bovinos soropositivos para *N. caninum* no Brasil, segundo a região de origem, a aptidão dos animais, e a técnica de diagnóstico empregada.

| Região              | Estado | Aptidão          | Freqüência       | Técnica | Autor/Ano                        |
|---------------------|--------|------------------|------------------|---------|----------------------------------|
| <b>Sul</b>          | RS     | Leiteira         | 11,2% (25/223)   | RIFI    | CORBELLINI et al. (2002)         |
|                     | RS     | Leiteira         | 17,8% (276/1549) | RIFI    | CORBELLINI et al. (2006)         |
|                     | RS     | Leiteira e Corte | 23% (31/140)     | RIFI    | RAGOZO et al. (2003)             |
|                     | PR     | Leiteira         | 34,8% (60/172)   | ELISA   | LOCATELLI DITTRICH et al. (2001) |
|                     | PR     | Leiteira e Corte | 22% (20/90)      | RIFI    | RAGOZO et al. (2003)             |
| <b>Sudeste</b>      | SP     | Leiteira e Corte | 27% (40/150)     | RIFI    | RAGOZO et al. (2003)             |
|                     | SP     | Leite            | 15,9% (83/521)   | RIFI    | SARTOR et al.(2003)              |
|                     | RJ     | Leiteira         | 87,5% (14/ 16)   | ELISA   | MUNHOZ et al. (2002)             |
|                     | RJ     | Leiteira e Corte | 15% (23/150)     | RIFI    | RAGOZO et al. (2003)             |
|                     | MG     | Leiteira         | 18,7% (67/359)   | ELISA   | MELO & LEITE (2001)              |
|                     | MG     | Leiteira e Corte | 44,8% (48/107)   | ELISA   | PITUCO et al. (2001)             |
|                     | MG     | Leiteira e Corte | 29% (47/162)     | RIFI    | RAGOZO et al. (2003)             |
| <b>Centro-oeste</b> | MS     | Leiteira e Corte | 28% (28/110)     | RIFI    | RAGOZO et al. (2003)             |
|                     | GO     | Leiteira e Corte | 32% (16/50)      | ELISA   | PITUCO et al. (2001)             |
| <b>Nordeste</b>     | BA     | Leiteira         | 14,9% (63/447)   | RIFI    | GONDIM et al. (1999)             |
|                     | PE     | Leiteira         | 34,75% (163/469) | RIFI    | SILVA et al. (2002)              |
| <b>Oeste</b>        | AM     | Leite e Corte    | 8,06% (170/2109) | RIFI    | AGUIAR et al. (2006)             |

No Chile, a enfermidade tem sido demonstrada em bovinos (PATITUCCI et al., 2000) e seu diagnóstico em fetos abortados tem crescido com o aumento de laboratórios capacitados (PATITUCCI et al., 2001).

### 3.4.1 - Transmissão vertical entre bovinos

Uma das formas de transmissão de *N. caninum* é a transplacentária sendo a principal forma de disseminação em rebanhos bovinos leiteiros e de corte, o que pode manter a infecção por diversas gerações (BJÖRKMAN, et al., 1996). Prova disso, é o fato de que, em propriedades endêmicas, as taxas de animais soropositivos são geralmente idênticas entre terneiras e vacas adultas (SCHARES, et al., 1998).

Em bovinos adultos, o aborto é o único sinal clínico da neosporose e ocorre do 3º ao 9º mês de gestação (sendo a maioria entre 5 e 6 meses), entre os terneiros infectados intra-uterinamente, a maioria nasce clinicamente normal, sendo raros os casos com a forma clínica, com lesões neurológicas que variam desde leves disfunções até completa paralisia (DUBEY e LINDSAY, 1996).

Em um estudo na Alemanha, 93% dos descendentes de vacas soropositivas foram também soropositivos, indicando que a transmissão vertical foi a maior rota de transmissão nas propriedades examinadas (SCHARES et al., 1998).

Pappen et al., (2005) verificaram, em um rebanho leiteiro do Município de Pelotas-RS, soroprevalências para *N. caninum* em dois momentos diferentes (2001 e 2004). Observaram que a soroprevalência do rebanho no início do estudo foi de 31,3% e, após terem sido retiradas da reprodução a grande maioria das fêmeas soropositivas, a soroprevalência caiu para 11% em 2004. Os dados obtidos revelaram a importância da transmissão vertical de *N. caninum* no rebanho, uma vez que filhas de matrizes soropositivas tiveram oito vezes mais probabilidade de ter anticorpos para *N. caninum* do que filhas de matrizes soronegativas, confirmando a hipótese de que a transmissão transplacentária de vacas cronicamente infectadas para sua progênie é a principal forma de transmissão da neosporose bovina (BJÖRKMAN et al., 1996).

### 3.4.2 - Transmissão horizontal

A preocupação com esse agente começa em torno do fato de que os cães eliminam oocistos em suas fezes, contaminando as pastagens onde os hospedeiros

intermediários estão. Após a ingestão dos oocistos, ocorre a formação de cistos nos tecidos dos hospedeiros intermediários (DUBEY, 1999b).

Estudos observacionais demonstraram que a ingestão do feto bovino pelo cão, pode realmente ser uma rota de pouca importância, pois de acordo com fazendeiros as placentas bovinas são freqüentemente ingeridas pelos cães ao contrário dos fetos abortados, que normalmente são rejeitados (DIJKSTRA et al., 2001). Neste mesmo estudo foi demonstrado que cães podem eliminar oocistos não esporulados nas fezes, após terem sido alimentados com placenta de vacas soropositivas. Além disso, oocistos de *N. caninum* já foram isolados de fezes de um filhote de cão naturalmente infectado, com histórico de diarreia, alimentado com carne mal cozida repetidas vezes (BASSO et al., 2001a).

Os bovinos podem-se infectar oralmente com oocistos de *N. caninum* eliminados pelo cão. Quando um cão jovem é introduzido na fazenda ou ocorre o nascimento de filhotes de cães na propriedade, o risco de que ocorram abortos nos bovinos aumenta (DIJKSTRA et al., 2002a). Entretanto, os mecanismos da transmissão de *N. caninum* na fazenda são ainda incertos. Com base nesta incerteza Dijkstra et al.(2002b) realizaram um estudo para verificar mais detalhadamente as rotas naturais da transmissão pós-natal de *N. caninum* entre cães e bovinos de propriedades de criação de gado de corte. Observaram que cães de fazendas com evidências de infecção pós-natal para *N. caninum*, consumiam placenta de bovinos naturalmente infectados e defecavam em locais de armazenamento de silagem, mais freqüentemente do que aqueles de fazendas sem tal evidência. O estudo demonstrou que restos fetais são fontes importantes de transmissão das vacas aos cães. Os cães infectados por líquidos fetais ou por placenta de bovinos naturalmente infectados, podem causar uma infecção pós-natal do rebanho bovino por eliminação de oocistos. Assim verifica-se a transmissão do agente do cão ao bovino e vice-versa, com o fechamento e a manutenção do ciclo dentro da fazenda.

A presença dos cães em fazendas de criação de bovinos foi considerada um risco importante de infecção e de aborto por *N. caninum* em diferentes países (PARÉ et al. 1998).

Na região sul do Brasil, Guimarães Junior et al. (2004), encontraram uma baixa correlação entre a ocorrência de *N. caninum* nos bovinos e a presença de

cães infectados. No entanto, verificaram que a infecção de *N. caninum* nos bovinos aumentou com a idade. Dados similares foram verificados por Pappen et al. (2005), indicando que a infecção pós-natal de *N. caninum* em bovinos também ocorre.

### 3.5 – *Neospora caninum* em cães

Neosporose clínica pode acometer cães de várias idades, mas os mais comumente afetados são cães jovens congenitamente infectados (DUBEY et al., 1990), embora 80% de fêmeas prenhes soropositivas não transmitam congenitamente *N. caninum* a sua prole (BARBER e TREES 1998). Na Dinamarca, de 8 filhotes nascidos de fêmea com títulos inferiores a 1:80 no início da gestação e crescentes ao longo do período (chegando a 1:640 na época do nascimento), 3 foram natimortos e um morreu dois dias após, de causas desconhecidas. Dos quatro filhotes restantes, um morreu aos 14 dias de idade e foi atribuída a sua morte à neosporose. Depois de nove meses um dos filhotes ainda permanecia com títulos de 1:640, indicando neosporose sub-clínica. Os outros dois cães da ninhada foram clinicamente saudáveis do início ao fim das observações e não foram observados anticorpos para *N. caninum* até os nove meses de idade (RASMUSSEN & JENSEN, 1996). Os mesmos autores também analisaram se existia a relação entre a soropositividade dos animais e a dieta oferecida aos mesmos, raça, idade dos animais e utilidade dada ao cão. Não foi observada associação entre estas variáveis.

Foi relatado na Argentina, por Basso et al. (2005), um caso de neosporose clínica em filhote de cão da raça Boxer. O animal foi eutanasiado sendo encontrada severa miosite (inflamação dos músculos que pode ser de origem parasitária) no esôfago e músculos estriados. Taquizoítos e cistos foram observados em cortes do cérebro. A confirmação do caso foi feita através de imunohistoquímica, Western Blot e inoculação em gerbis (*Meriones unguiculatus*), que 49 dias após a inoculação já apresentavam títulos de 1:100 a 1:400. O DNA do parasito foi identificado no pulmão, no cérebro e músculo estriado do cão e no cérebro de um dos gerbis inoculados.

Sawada et al. (1998), no Japão, analisando 198 cães urbanos, 48 de criação de gado de leite e 20 de uma criação de cães pastores observaram que 7,1% dos animais foram positivos para anticorpos para *N. caninum* na área urbana e 31,3%

soropositivos em propriedades leiteiras. Na criação de cães pastores 85% foram soropositivos para *N. caninum*.

Wouda et al. (1999a) também observaram essa maior prevalência em cães de propriedades rurais na Holanda, comprovando que o convívio de cães com bovinos aumenta a possibilidade de soropositividade para *N. caninum* em ambas as espécies.

Em um estudo realizado em 157 cães da região urbana do Município de Monte Negro, Rondônia, Cañon-Franco et al. (2003) observaram que *N. caninum* está presente na região, infectando cães, com prevalência de 8,3% na RIFI. No mesmo experimento, os autores verificaram que o parasito infecta os animais sem diferença de sexo, idade, tipo de alimentação ou criação.

Estudos realizados em Salvador e Lauro de Freitas, Bahia, demonstraram que cães errantes e cães domiciliados não apresentaram diferenças significativas quanto à positividade para *N. caninum*. Também não foram observadas diferenças estatísticas entre as variáveis, raça, faixa etária, distrito de origem dos animais e sexo (JESUS et al., 2006).

Gennari, (2004) relata que, as ocorrências de cães soropositivos para *N. caninum*, no Brasil, variam muito de região para região e entre os diferentes ambientes em que os cães habitam. Os índices de ocorrência constatados em levantamentos sorológicos de cães em diferentes locais do país, estão na (tab. 2).

Gennari et al. (2002) analisando sorologicamente 611 cães capturados nas ruas da cidade de São Paulo e 500 cães domiciliados, observaram pela técnica de NAT (*Neospora* Agglutination Test) uma prevalência de 25% e 10% respectivamente, indicando que a chance de cães de rua serem soropositivos para *N. caninum* foi duas vezes e meia maior do que a de cães domiciliados.

Na Áustria, 1770 soros de cães e 94 soros de raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) foram testados por RIFI para *N. caninum* e *T. gondii* sendo que 3,6% dos cães foram soropositivos para *N. caninum*. Na área rural foi maior a ocorrência de cães soropositivos do que na área urbana (5,3% e 2,1% respectivamente). Nenhuma das raposas vermelhas foi positiva para anticorpos de *N. caninum*, sendo 35% positivas para *T. gondii* (WANHA et al. 2005).

Tabela 2 – Ocorrência de anticorpos para *N. caninum* em cães de diferentes municípios brasileiros, segundo a procedência dos mesmos (RIFI  $\geq$  1:50).

| Estado - Cidade      | Amostras examinadas | Procedência           | Ocorrência (%) | Autor/Ano                  |
|----------------------|---------------------|-----------------------|----------------|----------------------------|
| PR – Norte           | 134                 | Rural                 | 21,6           | Souza et al., (2002)       |
| SP – São Paulo *     | 500                 | Domiciliados          | 10,0           | Gennari et al. (2002)      |
|                      | 611                 | Errantes              | 25,0           | Gennari et al. (2002)      |
| BA – Salvador        | 165                 | Domiciliados          | 13,3           | Jesus et al. (2006)        |
|                      | 250                 | Errantes              | 11,2           |                            |
| RO – Monte Negro     | 157                 | Urbanos               | 8,3            | Cañon-Franco et al. (2003) |
| MS – Campo Grande    | 245                 | Urbana                | 26,5           | Oliveira et al. (2004)     |
|                      |                     | Urbana (300)          | 10,7           |                            |
| MG – Uberlândia      | 450                 | Peri-urbana (58)      | 18,9           | Fernandes et al. (2004)    |
|                      |                     | Rural (92)            | 21,7           |                            |
|                      | 213                 | Hospital veterinário  | 8,9            |                            |
| MG – Uberlândia **   | 62                  | Clinicas veterinárias | 4,8            | Mineo et al. (2004)        |
|                      | 94                  | CCZ ***               | 12,8           |                            |
| PA - Campina Grande  | 286                 | Urbanos               | 8,4            | Azevedo et al. (2005)      |
| São Luis do Maranhão | 100                 | CCZ ***               | 45,0           | Teixeira et al. (2006)     |
| MS – Campo Grande    | 345                 | CCZ ***               | 27,3           | Andreotti et al. (2006)    |
| RO – Monte Negro     | 174                 | Rural                 | 12,6           | Aguiar et al. (2006)       |
| PR - Guarapuava      | 24                  | Rural                 | 20,8           | Romanelli et al. (2007)    |

\* *Neospora* agglutination test – NAT  $\geq$ 1:25

\*\* Iscon-ELISA

\*\*\* Centro de Controle de Zoonoses

Na República Tcheca foi realizado um estudo a respeito da dinâmica de anticorpos para *N. caninum* em cães durante um período de três anos (1999 a 2001). Os autores verificaram que a população de cães está exposta ao agente, pois 4,9% destes foram soropositivos na RIFI. Foram avaliados, neste experimento, cães de quatro procedências (exército, polícia, particulares e de abrigos), com prevalências de 4,7%, 0%, 2,6% e 19,2%, respectivamente. Com isso observa-se que a neosporose canina deve ser incluída como diagnóstico diferencial em clínicas veterinárias para cães com desordens neurológicas, já que o parasito encontra-se presente no meio em que os cães habitam (VÁCLAVEK et al., 2007).

A infecção por *N. caninum* pode ocorrer juntamente com outras doenças causadas por protozoários como é o caso da leishmaniose. Andreotti et al., (2006) observaram que cães urbanos do município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, apresentam-se soropositivos tanto para neosporose como para leishmaniose, não havendo relação entre estas duas enfermidades, uma vez que foram detectados animais soropositivos para apenas um dos agentes, quanto para ambos, sem diferenças estatísticas significativas.

### **3.6 – Sinais Clínicos em cães**

Em cães, a transmissão vertical é a responsável pela maioria dos casos de neosporose clínica, em animais congenitamente infectados (DUBEY, 1999b). Os filhotes de cães infectados intra-uterinamente podem nascer saudáveis, mas infectados, mantendo a infecção por várias gerações (ANDERSON et al., 1997).

Cães de qualquer idade podem desenvolver a neosporose: a idade mínima relatada é de dois dias (BARBER E TREES, 1996), e a máxima é de 15 anos (DUBEY, 2003). Os cães mais velhos são menos afetados clinicamente, mas, quando o são, geralmente apresentam envolvimento multifocal do sistema nervoso central e poliomiosite (GIRALDI et al., 2001).

Deve-se suspeitar de neosporose em qualquer caso clínico de cão com menos de um ano de idade que apresente desde fraqueza progressiva dos membros posteriores até um quadro de paralisia flácida (BARBER e TREES, 1996).

As manifestações clínicas características da neosporose canina são desordens neurológicas, paresia e paralisia progressiva dos membros, hiperextensão flácida ou rígida e contrações espásticas dos mesmos (DUBEY, 2003).

Posteriormente *N. caninum* passou a ser reconhecido como causador de afecções neuromusculares, miocárdicas, pulmonares e dérmicas (GIRALDI et al., 2001). Na maioria dos casos fatais, a infecção ocorre transplacentariamente, à ninhadas consecutivas (DUBEY, 1999a). Esses animais desenvolvem paresia uni ou bilateral, flácida ou espástica, que evolui para uma paralisia progressiva, de curso agudo ou crônico, e podem sobreviver por vários meses (BARBERS e TREES, 1998).

Embora os sinais neurológicos da síndrome miosite-polirradiculoneurite variem de acordo com o local parasitado, os mais frequentes são paresia de membros posteriores acompanhado de ataxia, atrofia de membros pélvicos, e alterações proprioceptivas. Também pode ocorrer mialgia, cifoescoliose lombar, hiperextensão rígida de um ou ambos os membros posteriores, paresia uni ou bilateral dos membros anteriores, hemiparesia a quadriparesia, alterações de comportamento, cegueira, tremores cefálicos, convulsões, dificuldade de deglutição, incontinência fecal e urinária, flacidez muscular e paralisia dos maxilares (BARBER e TREES, 1996).

A dermatite pode ser severa, apresentando-se ulcerada, hemorrágica, necrótica e piogranulomatosa. Recomenda-se que, no diagnóstico diferencial da dermatite piogranulomatosa em cães, a neosporose seja considerada (GIRALDI et al., 2001).

Mudanças extensivas observadas no esôfago de um filhote de cão sugerem que a neosporose deva ser incluída no diagnóstico diferencial de megaesôfago em cães (BASSO et al. 2005).

### **3.7 - Diagnóstico de *Neospora caninum* em Cães**

O diagnóstico clínico no cão é difícil, pois a sintomatologia nervosa pode ser confundida com traumatismos, patologias do disco intervertebral, cinomose, raiva, entre outros. Na fase sub-clínica, as provas sorológicas são a principal ferramenta de diagnóstico disponível, uma vez que a eliminação de oocistos não é constante e só podem ser diferenciados dos de *Hammondia* sp. através de provas biológicas como inoculação em gerbil (*Meriones unguiculatus*) e formas proliferativas uma vez identificadas mantidas em cultivo celular (FARIAS, 2002).

#### **3.7.1 – Diagnóstico direto**

##### **3.7.1.1 - Técnicas histológicas**

O diagnóstico definitivo de *N. caninum* está baseado em lesões histológicas produzidas nos tecidos parasitados.

No diagnóstico histopatológico, as lesões no cérebro consistem de encefalite não supurativa, caracterizada por múltiplos focos de infiltrados mononucleares e células da glia, geralmente ao redor de um centro de necrose (DUBEY e LINDSAY, 1996).

A identificação do protozoário pode ser feita pela técnica de imunohistoquímica que permite evidenciar o agente nos tecidos, utilizando soro policlonal ou anticorpo monoclonal anti-*Neospora* (LINDSAY e DUBEY, 1989). Ocasionalmente, reações cruzadas com *T. gondii* podem ser observadas com o uso de anticorpos policlonais para *N. caninum*, provavelmente devido à grande variação na fonte de animais utilizados para produção de anticorpos, do tipo de antígeno e estágio dos parasitos utilizados na imunização dos animais (DUBEY e LINDSAY, 1996). Também são observadas variações nos procedimentos imunohistoquímicos entre os diversos laboratórios (DUBEY e LINDSAY, 1996).

#### **3.7.1.2 - Técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)**

As técnicas de PCR desenvolvidas, tem como seqüência alvo a região ITS1 do DNA ribossômico e a seqüência Nc5 do DNA genômico de *N. caninum*. As técnicas de PCR são de grande utilidade no diagnóstico de *Neospora*, pois permitem amplificar quantidades muito pequenas de DNA, mesmo em tecidos que estejam autolisados (COLLANTES-FERNÁNDES et al., 2002). As técnicas de PCR ainda não são usadas como rotina de laboratório devido ao seu alto custo.

#### **3.7.2 – Diagnóstico Indireto**

Provas sorológicas como a RIFI e o teste de ELISA, também são usados no diagnóstico de neosporose subclínica, que indicam exposição dos animais a *Neospora* não significando que os mesmos estejam doentes (DUBEY e LINDSAY, 1996).

##### **3.7.2.1 - RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta)**

A imunofluorescência com título maior ou igual a 1:50 indica exposição do cão ao agente (DUBEY et al., 1988a). Quando soros são testados com diluições menores podem ocorrer reações inespecíficas apresentando-se o taquizoíto com

fluorescência parcial ou apical. Isso pode acontecer também em reações cruzadas com *T. gondii*, por isso diluições inferiores a 1:50 devem ser interpretadas com cautela (ATKINSON et al., 2000).

Um título maior ou igual a 1:800, em cão com sinais clínicos, é forte indício de neosporose (GIRALDI et al., 2001).

A RIFI foi a primeira das técnicas utilizadas, empregando como antígenos taquizoítos de *N. caninum* fixados em lâmina. Este teste é utilizado como prova de referência para comparação com outras técnicas (DUBEY et al., 1988b).

Na RIFI é preconizada a observação de fluorescência total do taquizoíto para que a reação seja considerada positiva. A maioria dos laboratórios de referência em imunofluorescência indireta para *N. caninum*, utilizam o ponto de corte de 1:50.

#### **3.7.2.2 - ELISA (Ensaio Imunoenzimático)**

O teste de ELISA pode ser problemático devido à ampliação enzimática de reações inespecíficas, comumente relacionadas com reações cruzadas com parasitos coccídios ou com o tipo de antígeno utilizado (CAÑON-FRANCO et al., 2003).

As reações cruzadas observadas no ELISA indireto podem ser decorrentes dos antígenos de *N. caninum* utilizados nos testes. O ELISA indireto contém antígenos solúveis, com uma preponderância de antígenos intracelulares, enquanto a RIFI contém taquizoítos fixados intactos, prevalecendo os antígenos de superfície dos parasitos (BJORKMAN e UGGLA, 1999). Evidências apontam que os antígenos mais específicos das espécies do filo Apicomplexa encontram-se na superfície do parasito, podendo explicar a maior especificidade do teste de RIFI para *N. caninum* sobre o ELISA indireto (BJORKMAN e UGGLA, 1999).

Outros tipos de ELISA, como o *iscom* ELISA, que agregam imunoestimulantes aos antígenos de membrana de *N. caninum*, mostram-se bastante específicos para a detecção de anticorpos para *N. caninum* (BJORKMAN e UGGLA, 1999).

Mais recentemente tem sido utilizado o ELISA de avidéz que permite distinguir infecções recentes de infecções crônicas em bovinos, parecendo ser de grande importância para se diferenciar abortos epidêmicos de abortos endêmicos (DUBEY, 2003). Animais com infecção primária recente, até dois meses, apresentam IgG com baixa avidéz. As IgG de alta avidéz aparecem em animais infectados há mais de seis meses, com infecção considerada crônica (DUBEY E SCHARES, 2006).

### **3.7.2.3 - NAT (*Neospora* Agglutination Test)**

O teste NAT foi aprimorado por Romand et al. (1998) para a pesquisa de anticorpos para *N. caninum* empregando, como antígeno, taquizoítos da cepa NC-1 isolado de monocamadas de fibroblastos humanos, numa concentração de  $2 \times 10^4$  taquizoítos por microlitro. Este método de diagnóstico mede a aglutinação de taquizoítos na presença de anticorpos específicos presentes no soro, eliminando a utilização de anticorpos secundários empregados nos testes anteriores. Neste teste foi observada uma especificidade e sensibilidade semelhantes às da RIFI (BJORKMAN e UGGLA, 1999).

A sedimentação dos taquizoítos formando um ponto no fundo do poço é considerada como resultado negativo, ao passo que uma sedimentação difusa (em malha) representa um resultado positivo. É bastante utilizado para sorodiagnóstico de animais silvestres pelo fato que não necessita de conjugados espécie-específicos (CAÑON-FRANCO et al., 2003).

## **3.8- Importância e impacto econômico de *Neospora caninum***

Não há dados concretos sobre as perdas econômicas devidas à neosporose na bovinocultura, mas as perdas são estimadas em milhões de dólares (DUBEY, 2003). Isto porque 42% das vacas podem abortar devido à neosporose, e o impacto econômico dependerá do custo e do valor direto dos fetos perdidos (DUBEY, 2003).

A importância do rastreamento dos rebanhos visando a neosporose é justificada pelos prejuízos por ela causados. Na Califórnia (EUA), *N. caninum* é o maior causador de abortamentos em bovinos leiteiros e a segunda causa em

rebanhos de criação de gado de corte (ANDERSON et al.,1991), causando em todo país perdas com abortamentos estimados em US\$ 35 milhões (BARR et al., 1997). Na pecuária de corte as perdas são estimadas entre US\$ 15 e US\$ 24 milhões (KASARI et al.,1999).

No geral, é menor o conhecimento sobre as causas de aborto no gado de corte do que no gado de leite, devido à dificuldade de encontrar fetos pequenos abortados durante o primeiro trimestre. Conseqüentemente, torna-se mais difícil uma avaliação exata de perdas econômicas causadas por *Neospora* no gado de corte (DUBEY, 2003).

### 3.9 - Potencial zoonótico

Há um grande interesse em saber se *N. caninum* é um agente causador de zoonose.

Em experimento realizado com primatas não humanos (*Macaca mulata*), Barr et al. (1994) observaram que *N. caninum* inoculado em fêmeas prenhes, causa lesões que se assemelham muito às aquelas causadas por toxoplasmose congênita, demonstrando um provável potencial zoonótico do agente.

Resultados de estudos de Lobato et al. (2006) indicam a exposição ou a infecção por *N. caninum* em seres humanos, particularmente em pacientes infectados com HIV (38% soropositivos para *N. caninum*) e em pacientes com distúrbios neurológicos (18% soropositivos para *N. caninum*), que poderiam ter infecções oportunistas e simultâneas com *T. gondii*. Além disso, observaram também a importância de métodos sorológicos complementares ou de procedimentos diagnósticos multidisciplinares, tais como PCR e imunohistoquímica com o material coletado pela biópsia ou na autópsia, para uma caracterização melhor da infecção humana pelo agente. Estes achados podem trazer um interesse novo ao quadro clínico instável de pacientes infectados com HIV e o papel real da infecção de *N. caninum* em pacientes imunocomprometidos.

### 3.10 - *Neospora caninum* em animais silvestres

Mamíferos domésticos tem sido descritos como hospedeiros de *N. caninum*, tanto definitivos como intermediários. Estudos realizados em várias partes do mundo tem demonstrado que outros animais podem estar envolvidos no ciclo biológico de *N. caninum*, em especial os animais silvestres.

Na América do Norte onde a caça de cervos de cauda branca (*Odocoileus virginianus*) é liberada e para isso é utilizado o cão, freqüentemente, como recompensa pelo sucesso da caçada, são oferecidos pedaços de carne do cervo, que pode ser uma possível fonte de infecção para o cão (LINDSAY e ROSYPAL, 2005). Numa outra oportunidade de caçada o cão, por ser um hospedeiro definitivo do parasito, pode vir a liberar oocistos neste ambiente, contaminando os animais silvestres e fechando o ciclo de *N. caninum* em um ambiente selvagem (LINDSAY e ROSYPAL, 2005).

Viana et al. (2005) demonstraram na região da Virginia (USA) a importância do cervo (*Odocoileus virginianus*) na epidemiologia da neosporose no ambiente silvestre, já que foi realizado o isolamento de *N. caninum* deste herbívoro, naturalmente infectado, confirmando assim mais um hospedeiro intermediário para este parasito.

Rodrigues et al. (2004) em Pirassununga, São Paulo, Brasil obtiveram o primeiro isolado de *N. caninum* de cérebro de búfalos (*Bubalis bubalis*), naturalmente infectados confirmado por técnicas de biologia molecular.

Vários trabalhos têm sido realizados no intuito de identificar canídeos silvestres como hospedeiros definitivos de *N. caninum*, mas até hoje, com exceção do coiole (*Canis latrans*), só foram observados animais soropositivos, ou seja, prováveis hospedeiros. São considerados hospedeiros definitivos para o *N. caninum* até o momento o cão (*Canis familiaris*) (McCALLISTER et al., 1998) e o coiole (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004). Gondim et al. (2004) relata que, existe a possibilidade dos lobos (*Canis lupus*) serem prováveis hospedeiros definitivos de *N. caninum*, já que estes são parentes mais próximos do cão, do que os coioles.

Entre os diversos carnívoros soropositivos encontram-se, *Canis familiaris dingo* (BARBER et al., 1997), *Procyon lotor* (LINDSAY et al., 2001a), *Canis lupus* (GONDIM et al., 2004), *Cerdocyon thous* (CAÑON-FRANCO et al., 2004), *Lycalopex*

(*Pseudalopex*) *gymnocercus* (CAÑON-FRANCO et al., 2004), *Chrysocyon brachyurus* (VITALIANO et al., 2004), *Vulpes vulpes* (HAMILTON et al., 2005), *Urocyon cinereoargenteus* (LINDSAY et al., 2001b) e *Pseudolapex fulvipes* (PATITUCCI et al., 2001).

Essa variedade de canídeos soropositivos para *N. caninum* demonstra que animais silvestres podem estar contribuindo para a disseminação do parasito no ambiente e principalmente a animais de produção e de companhia, uma vez que o ciclo silvestre já foi estabelecido, isolando-se o protozoário de *Canis latrans* e *Odocoileus virginianus* (LINDSAY e ROSYPAL, 2005).

Os canídeos *Pseudalopex gymnocercus* e *Cerdocyon thous* conhecidos como sorros são freqüentes no Rio Grande do Sul. Segundo Cañon-Franco et al. (2004), ambas as espécies podem ser infectadas por *N. caninum*, uma vez que foram detectados 33,33% (9/27) de animais soropositivos em estudo realizado na Região Sul do Brasil. Habitam regiões abertas, como campos e capoeiras, onde tem sido observados mais comumente do que em matos. Estas espécies possuem hábitos alimentares diversos, podendo ser considerados onívoros. Possuem particularidades comportamentais, como reunir objetos colhidos próximo às habitações humanas dentro de suas tocas, o que revela o grande sinantropismo destes canídeos (BOCCACECI, 1998).

Estes canídeos têm o hábito de conviver próximo às habitações do meio rural e com os animais domésticos (fig. 1), muitas vezes se alimentando de restos de comida deixados perto das residências. Segundo Pereira (informe pessoal, 1997),<sup>1</sup> na época de parição de cordeiros, os canídeos silvestres (*Pseudalopex gymnocercus* e *Cerdocyon thous*) alimentam-se dos restos de placenta das ovelhas, raramente atacando cordeiros. Quando isto acontece, são atacados somente cordeiros mais fracos ou abandonados pelas mães.

---

<sup>1</sup> João Carlos Alves Pereira. Médico Veterinário e pecuarista.



Figura 1 – Canídeo silvestre característico do Rio Grande do Sul no seu ambiente natural, juntamente com animais de produção.

### 3.11 - Controle e profilaxia

É importante a adoção de medidas efetivas de controle evitando que a doença permaneça cronicamente no rebanho. Entre as medidas se destacam: no caso de transferência de embrião, uso somente de receptoras soronegativas; redução da exposição de cães a tecidos infectados como fetos abortados, crias mortas e placentas; uso de maternidades individuais; reduzir o número de cães coabitando com o rebanho; evitar o acesso de canídeos a silos e depósitos de ração; enviar ao laboratório fetos abortados e placentas para diagnosticar a causa do aborto, e fazer a sorologia do rebanho (ANDREOTTI, 2001).

O descarte de animais soropositivos pode ser pensado quando o número de animais for baixo. Em rebanhos controlados, devem ser introduzidos somente animais soronegativos (ANDREOTTI, 2001).

O tratamento em bovinos é ineficaz, e em cães com sinais neurológicos é longo, com prognóstico reservado a desfavorável. Os medicamentos mais utilizados no tratamento da neosporose clínica em cães incluem clindamicina (11-22 mg/Kg, duas a três vezes ao dia), sulfonamida (15 mg/Kg duas vezes ao dia) e pirimetamina (1 mg/Kg, diário) (BARBER, 1998).

## **4 – MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 - Área de Estudo**

Foram avaliados cães de domicílios urbanos e de propriedades rurais, localizados no município de Pelotas, no sul do Rio Grande do Sul.

A região estudada encontra-se entre os paralelos 31° S e 31,5° S., latitude: 31° 46' 19'' S e longitude: 52° 20' 33'' W.

O município de Pelotas está localizado na encosta inferior da Serra dos Tapes, na Encosta do Sudeste.

Pelotas apresenta duas paisagens naturais e humanas distintas: a serrana, mais elevada e ondulada, e a paisagem de planície, baixa e plana. A primeira corresponde à policultura e à colonização alemã, e a segunda à orizicultura, com composição étnica variada. Tem uma população estimada de 350.000 habitantes e uma área territorial de 1.921.80 Km<sup>2</sup>. A cidade encontra-se a sete metros acima do nível do mar, às margens do canal São Gonçalo, que liga as lagoas dos Patos e Mirim, possuindo grande potencial turístico (<http://www.ufpel.tche.br/pelotas/>). A sua produção é baseada na agropecuária, possuindo um rebanho bovino de 57.128 animais, sendo 20.608 de produção leiteira (dados fornecidos pela Secretaria da Agricultura e Abastecimento, Departamento de Produção Animal, Divisão de Fiscalização e Defesa Sanitária Animal). Pelotas se destaca na produção de pequenas e grandes culturas como é o caso das plantações de pêssego e arroz. O município produz 4.000 Kg de pêssego por hectare e 57.004 toneladas de arroz (<http://www.irga.rs.gov.br/arquivos/ranking.pdf>).

## 4.2 – Cães

Estudos realizados pela Secretaria de Saúde de Pelotas mostraram que a população de cães da cidade de Pelotas é de 63.453, o que resulta em uma proporção de um cão para cada 5,52 habitantes. Destes 90% seriam domiciliados (57.107 animais) (70% cães com dono, mas tem acesso à rua e 20% mantidos presos pelos proprietários restritos à área da residência) e 10% cães errantes (6346) (cães sem dono, soltos nas ruas da cidade).

Na zona rural, em propriedades de criação de gado de corte, os números são estimados em 1115 cães e, em propriedades de criação de gado de leite, de 3139 cães (dados fornecidos pela Secretaria da Agricultura e Abastecimento, Departamento de Produção Animal, Divisão de Fiscalização e Defesa Sanitária Animal).

Baseado nestes dados foi calculado o número de cães a serem examinados no presente estudo. Segundo análises feitas pelo programa estatístico Epi-Info versão 3.3.2, para cálculo do tamanho amostral, utilizou-se uma prevalência esperada de 50% (correspondente a doenças ainda desconhecidas em determinada região), precisão mínima de 10%, e intervalo de confiança (IC) de 95%, valores adequados a levantamentos soroepidemiológicos (5 a 10%). Foi determinado um tamanho amostral de no mínimo 277 animais, sendo 96 cães da área urbana, 88 cães de propriedades de criação de gado de corte e 93 cães de propriedade de criação de gado de leite.

Foram colhidas amostras sangüíneas de cães de diferentes sexos, idades, e ambientes (urbanos, rurais com bovinos de produção leiteira e rurais com bovinos de corte). As coletas foram realizadas entre os meses de maio e novembro de 2006, obtendo-se um total de 339 amostras de soros de cães, com idade variando entre três meses a 14 anos. Destes, 109 vivem na área urbana, 128 em propriedades de criação de gado leiteiro e 102 em propriedades de criação de gado de corte.

Adicionalmente, foram coletadas amostras de sangue de bovinos de 67 propriedades leiteiras da região de Pelotas, RS, para correlacionar com os resultados obtidos. A análise sorológica dos bovinos faz parte de outro projeto de pesquisa e os resultados sorológicos dos animais foram gentilmente cedidos pela colega Andréia da Silveira Lucas.

### **4.3 - Colheita das Amostras**

Durante a colheita das amostras de sangue, cada cão foi registrado com um número, e em uma ficha de identificação, foram registradas informações sobre o ambiente em que viviam e os possíveis fatores de risco a que estavam expostos (anexo).

Em cada residência/propriedade, foram coletados, no máximo, três cães.

Foi feita a contenção do cão com mordaca, e após o animal estar completamente imobilizado foi realizada a colheita do sangue, através de venocentese da veia cefálica, sempre com o acompanhamento do proprietário. O sangue foi colhido diretamente em tubos do tipo vacutainer sem anticoagulante, estéreis, identificados e mantidos em temperatura ambiente para posterior centrifugação, a uma velocidade de 3600 g (rotações por minuto) durante 10 minutos, retração do coágulo e obtenção do soro. As amostras foram processadas no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, RS.

Os soros dos cães foram acondicionados em tubos de polipropileno (tipo eppendorf) identificados com o número do cão e mantidos a -20°C, até o momento da realização da prova sorológica.

### **4.4 - Análise Laboratorial**

#### **4.4.1 - Antígeno de *Neospora caninum***

Para a realização da prova sorológica utilizou-se lâminas sensibilizadas com taquizoítos de *N. caninum* (cepa NC-1) mantidos em cultivo celular na Universidade de São Paulo, no Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

As lâminas foram acondicionadas em caixas de polipropileno e mantidas a -20 °C até o momento do uso.

#### **4.4.2 - Detecção de anticorpos (RIFI) para *N. caninum***

O soro dos cães foi submetido à RIFI, segundo DUBEY et al. (1988a).

Em cada lâmina foram colocados os soros a serem testados, além de um controle positivo e um negativo de origem canina, fornecidos pelo Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade de São Paulo. Em cada orifício da lâmina, foi colocado um soro, diluído em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) pH 7,2, estéril (1,19g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,22g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 8,55g  $\text{NaCl}$ ) acrescentado de 10g de soro-albumina bovina (BSA), a partir da diluição 1:50 ( 2  $\mu\text{l}$  do soro teste em 98  $\mu\text{l}$  da solução de diluição). Em cada orifício foi colocado um volume total de 20  $\mu\text{l}$ . O mesmo procedimento foi realizado com os controles positivos e negativos. O material foi incubado por 30 minutos à temperatura de 37 °C, em câmara úmida. Após o término da incubação, cada lâmina foi submetida a três lavagens de cinco minutos cada, em cubeta de vidro com solução tampão carbonatada de lavagem pH 9,0 estéril (11,4g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 33,6g  $\text{NaHCO}_3$ , 8,5g  $\text{NaCl}$  e um litro de água destilada).

As lâminas foram secas em estufa com temperatura de 37 °C, para que o processo de secagem fosse mais rápido. Após a secagem, em cada orifício foram acrescentados 20  $\mu\text{l}$  do conjugado (IgG de coelho anti-IgG canina, marcada com isotiocianato de fluoresceína – Sigma F-7884), utilizado na diluição de 1:700 em PBS 7.2 pH 7,6 estéril (80g  $\text{NaCl}$ , 2g  $\text{KCl}$ , um litro de água destilada, 14,9g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,4g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) contendo Azul de Evans 0,01%. As lâminas novamente foram incubadas por 30 minutos a 37 °C e lavadas com solução tampão carbonatada de lavagem pH 9 estéril. O processo foi o mesmo descrito anteriormente, só que, neste momento, a técnica é realizada em ambiente escuro para evitar a queima do isotiocianato de fluoresceína. Após a secagem em estufa com temperatura de 37 °C foi feita a montagem das laminas com lamínula utilizando-se glicerina tamponada (pH 8,0).

As leituras foram realizadas em microscópio de fluorescência no aumento de 400x (Olympus – modelo BX-FLA). As reações foram consideradas positivas, quando os taquizoítos apresentaram fluorescência periférica total. Os que apresentaram fluorescência parcial, apical ou fraca foram considerados negativos (PARÉ et al.,1995). Os controles positivos apresentavam sempre fluorescência total bem visível e os negativos encontravam-se sem fluorescência apresentando-se avermelhados devido à presença de Azul de Evans. O ponto de corte da reação foi de 1:50 e os soros positivos neste título foram diluídos seriadamente na base dois

até a máxima titulação reagente (BARBER et al., 1997; BJÖRKMAN e UGGLA, 1999).

#### 4.5 - Análise Estatística

Os dados foram organizados em formato de banco de dados utilizando-se planilhas eletrônicas do programa Excel do Windows (Microsoft).

Freqüências de cães e de anticorpos para *N. caninum* foram calculadas segundo os fatores de risco. Os valores foram comparados utilizando-se o teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e o teste exato de Fischer, através do programa estatístico Epi-info 3.3.2, com intervalo de confiança de 95%.

Primeiramente, as variáveis independentes (fatores de risco para *N. caninum*) foram sujeitas a análise univariada para verificar a associação de cada um dos possíveis fatores de risco com a variável dependente (positividade para *N. caninum*) pelo teste de Qui-quadrado e teste Exato de Fisher. Foi adotado como ponto de corte nesta etapa da análise um valor de  $P < 0,25$  podendo então passar para a próxima fase da análise (regressão logística).

Odds ratio (OR) foram calculados com intervalo de confiança de 95%, também se obteve neste modelo o valor de  $P$  para cada variável. O modelo foi construído usando eliminação em ordem decrescente conforme valor de  $P$ . As variáveis com  $P \leq 0,05$  foram mantidas até o final da análise multivariada. Para a realização do teste de regressão logística foi utilizado o programa Statistix 8.0.

## 5 - RESULTADOS

### 5.1 – Caracterização da amostra

Os dados de frequências dos cães, segundo as variáveis estudadas, estão nas tab. 3 e 4.

Tabela 3 – Distribuição de cães (n=339) segundo possíveis fatores de risco para infecção por *N. caninum* na área urbana e rural do município de Pelotas, RS.

| Variáveis                 |                    | n   | Frequência de cães (%) |
|---------------------------|--------------------|-----|------------------------|
| Origem                    | Urbanos            | 109 | 32,2                   |
|                           | Propriedade Leite  | 128 | 37,8                   |
|                           | Propriedade Corte  | 102 | 30,1                   |
| Idade (anos)              | 0 a 3              | 145 | 42,8                   |
|                           | 3,1 a 6            | 103 | 30,4                   |
|                           | > 6                | 91  | 26,8                   |
| Sexo                      | Fêmea              | 181 | 53,4                   |
|                           | Macho              | 158 | 46,6                   |
| Utilidade                 | Companhia/guarda   | 165 | 48,6                   |
|                           | Pastoreio          | 174 | 51,3                   |
| Confinamento              | Temporário         | 66  | 19,5                   |
|                           | Sempre Solto       | 273 | 80,5                   |
| Alimentação               | Comercial          | 61  | 18,0                   |
|                           | Caseira/carne crua | 278 | 82,0                   |
| Raça                      | Definida           | 159 | 46,9                   |
|                           | SRD                | 180 | 53,1                   |
| Nº de cães na residência  | 1 a 3              | 214 | 63,1                   |
|                           | > 4                | 125 | 36,9                   |
| Sinal nervoso no cão      | Não                | 334 | 98,5                   |
|                           | Sim                | 05  | 1,5                    |
| Sinal nervoso em filhotes | Não                | 335 | 98,8                   |
|                           | Sim                | 04  | 1,2                    |
| Cães vão p/meio rural*    | Não                | 79  | 72,5                   |
|                           | Sim                | 30  | 27,5                   |

\*Fatores de risco relacionados a área urbana foram calculados sobre o n=109

Foram analisados 339 animais, sendo 109 (32,2%) urbanos, 102 (30,1%) rurais de propriedade de criação de gado de corte e 128 (37,8%) rurais de propriedades de criação de gado de leite (tab. 3).

Nas propriedades rurais (leite e corte) visitadas, foi observada a presença de 388 cães, com média de 3,37 animais por residência. Deste total de cães do meio rural 240 eram de propriedades de criação de gado de leite e 148 de propriedades de criação de gado de corte. O número médio de cães em propriedades de criação de gado de leite foi de 3,53 e naquelas de criação de gado de corte 3,15.

A faixa etária com maior número de animais foi a de 0 a 3 anos, com frequência de 42,8%, decrescendo conforme aumento da idade.

Tabela 4 – Distribuição de cães estudados na área rural (n=230) segundo possíveis fatores de risco para infecção por *N. caninum*, no município de Pelotas, RS.

| Variáveis               |        | n   | Frequência de cães (%) |
|-------------------------|--------|-----|------------------------|
| Área (ha)               | < 50   | 122 | 53,0                   |
|                         | > 50   | 108 | 47,0                   |
| Aborto em Bovinos       | Não    | 103 | 44,8                   |
|                         | Sim    | 127 | 55,2                   |
| Contato c/ bovinos      | Não    | 06  | 2,6                    |
|                         | Sim    | 224 | 97,4                   |
| Destino das Carcaças    | Campo  | 121 | 52,6                   |
|                         | Queima | 109 | 47,4                   |
| Diagnóstico de Aborto * | Não    | 118 | 92,9                   |
|                         | Sim    | 09  | 7,1                    |
| Contato com Sorro       | Não    | 83  | 36,1                   |
|                         | Sim    | 147 | 63,9                   |
| Recolhe Carcaças **     | Não    | 134 | 58,3                   |
|                         | Sim    | 96  | 41,7                   |

\* Dados de frequência relacionados ao diagnóstico de aborto foram calculados sobre o n=127

\*\* Em 13 propriedades as carcaças eram queimadas no campo

Dentro da população estudada, 181 cães eram do sexo feminino (53,4%) e 158 (46,6%) do sexo masculino. A maior parte dos animais estudados tinha como utilidade o pastoreio (51,3%), animais que são utilizados para o trabalho com os bovinos, e os demais encontravam-se distribuídos entre guarda/companhia (48,6%).

Os animais, na sua maioria, permaneciam sempre soltos (80,5%). Na área urbana todos os animais examinados eram domiciliados, mas tinham acesso à rua,

não ficando restritos aos limites do domicílio. Entre os cães urbanos, 27,5% eram levados para o meio rural, esporadicamente.

Quanto à alimentação oferecida aos cães, observou-se que um misto de comida caseira (resto de alimentos e carne crua) era o tipo preferido pelos proprietários para ser dada aos animais (82,0%). Poucos animais (18,0%) eram alimentados exclusivamente com ração comercial.

As raças foram divididas em Definidas e SRD (sem raça definida), a qual teve o maior número de animais analisados (180 cães) 53,1%. Os de raça definida tiveram frequência de 46,9% (159 cães).

Quando foi perguntado aos proprietários sobre a ocorrência de sinais nervosos nos cães, tanto animais adultos como em filhotes, observou-se que a grande maioria nunca tinha observado este tipo de alteração nos animais adultos (98,5%), nem em filhotes (98,8%).

A área das propriedades rurais foi classificada como menor ou maior que 50 ha. Entre os cães coletados, 53,0% viviam em pequenas propriedades, e 47% viviam em propriedades com mais de 50 ha. Quanto à ocorrência de problema de aborto bovino na propriedade, 55,2% dos cães viviam em propriedades com o problema. A grande maioria dos cães rurais (97,4%) tinha contato com os bovinos no campo e também nas instalações das fazendas.

Quanto ao recolhimento de carcaça de bovinos do campo, constatou-se que 58,3% (134) dos cães coletados viviam em propriedades em que essa prática não ocorre. Desses, apenas 13 cães (9,7%) vivem em propriedades em que as carcaças bovinas são queimadas no campo.

A grande maioria dos cães estudados no meio rural (92,9%) vive em propriedades que não fazem o diagnóstico de aborto.

Dos cães do meio rural, 147 (63,9%) tinham algum tipo de contato com canídeos silvestres (sorros), uma vez que esses animais são frequentemente vistos nos arredores das propriedades.

Das 67 propriedades onde foi coletado sangue de cães e de bovinos de criação de gado de leite, 18 (27%) tinham pelo menos um cão soropositivo para *N. caninum* e 33 (49,3%) pelo menos um bovino soropositivo.

A associação entre a soropositividade de cães e de bovinos não foi significativa ( $P = 0,24$ ), mas verificou-se que 61,1% dos cães soropositivos viviam em propriedades com pelo menos um bovino positivo.

## 5.2 – Ocorrência de anticorpos para *N. caninum*

Dos 339 cães examinados 53 (15,63%) (I.C. 95% = 12 a 20,0%) apresentaram anticorpos para *N. caninum* (fig. 2).

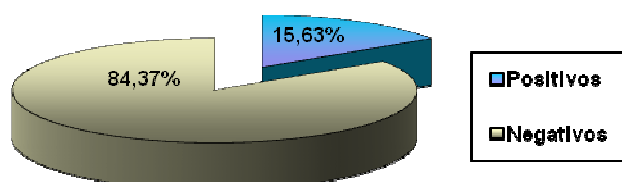


Figura 2 – Frequência de cães soropositivos para *N. caninum* na população estudada (urbanos e rurais), Pelotas – RS (n=339).

Observou-se que, do total de cães examinados na área urbana, 5,50% (06 cães) tinham anticorpos para *N. caninum* enquanto que na área rural este percentual foi de 20,43% (47 cães), ocorrência quatro vezes maior, com diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ) (tab. 5).

Quando dividiu-se os animais por zonas estudadas, a ocorrência em cães urbanos foi de 5,5% (06 cães), enquanto que, na população de cães rurais de propriedades de criação de gado de corte e de criação de gado de leite, os percentuais foram de 28,4% (29 cães), de 14,1% (18 cães), respectivamente. Em cães do meio rural, a ocorrência foi duas vezes maior naqueles provenientes de propriedades de criação de gado de corte do que naqueles de criação de gado leiteiro, diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) (tab. 6).

Tabela 5 – Ocorrência de cães soropositivos para *N. caninum* em relação à origem (urbanos e rurais), Pelotas, RS.

| Origem  | Total examinados | Positivos |                   |
|---------|------------------|-----------|-------------------|
|         |                  | n         | %                 |
| Urbanos | 109              | 6         | 5,5 <sup>a</sup>  |
| Rurais  | 230              | 47        | 20,4 <sup>b</sup> |
| Total   | 339              | 53        | 15,6              |

Valores seguidos de letras diferentes, na coluna, representam diferença estatística entre si ( $p < 0,05$ ).

Tabela 6 – Ocorrência de cães soropositivos para *N. caninum* em relação à origem (urbanos, propriedades de criação de gado de corte e propriedades de criação de gado de leite), Pelotas, RS.

| Origem  | Total examinados | Positivos |                   |
|---------|------------------|-----------|-------------------|
|         |                  | n         | %                 |
| Urbanos | 109              | 6         | 5,5 <sup>a</sup>  |
| Leite   | 128              | 18        | 14,1 <sup>b</sup> |
| Corte   | 102              | 29        | 28,4 <sup>c</sup> |
| Total   | 339              | 53        | 15,6              |

Valores seguidos de letras diferentes, na coluna, representam diferença estatística entre si ( $p < 0,05$ ).

Na fig. 3 verifica-se que, em relação à idade, no grupo com 0 a 3 anos a frequência foi de 7,6% de soropositivos (I.C. 95% = 3,8 a 13,2%). Nos cães com idade intermediária (3,1 a 6 anos) 17,5% foram soropositivos (I.C. 95% = 10,7 a 26,2%).

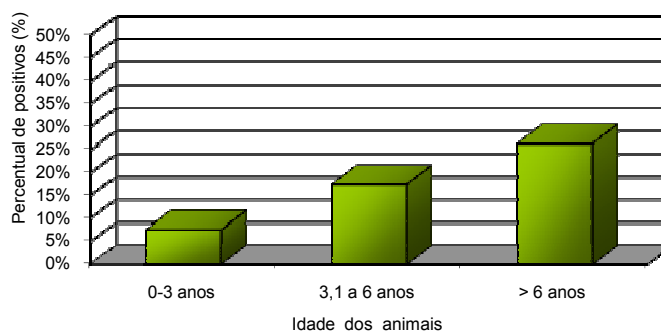


Figura 3 - Ocorrência de cães soropositivos para *N. caninum* através da técnica de RIFI, em relação à faixa etária.

Entre os animais mais velhos, com idade maior que seis anos, foi observado 26,4% de soropositivos (I.C. 95% = 17,7 a 36,7%). A análise estatística revela que a prevalência de soropositivos é significativamente mais alta em cães com idade superior a 3 anos (tab. 7).

### 5.3 – Título de anticorpos para *N. caninum*

Os títulos de anticorpos encontrados pela RIFI, nas amostras de soros analisadas, variaram de 1:50 a 1:1600, sendo que o título modal, nos três ambientes, foi o de 1:400, com um total de 19 cães (35,84%) com esta titulação.

A tab. 8 demonstra a distribuição dos cães soropositivos, segundo os títulos de anticorpos para *N. caninum*. Das 53 amostras positivas (título  $\geq$  1:50), 12 (22,6%) apresentaram título mínimo de 1:50, enquanto que em 39 (73,6%) amostras os títulos variaram de 1:100 a 1:800, e duas (3,8%) delas apresentaram título igual a 1:1600.

Tabela 7 – Título de anticorpos para *N. caninum* em cães de acordo com a faixa etária dos animais no sul do Rio Grande do Sul, Pelotas, RS.

| Idade dos cães | Nº de animais | Título (RIFI) |     |     |     |     |      | Soropositivos n (%)    |
|----------------|---------------|---------------|-----|-----|-----|-----|------|------------------------|
|                |               | 50            | 100 | 200 | 400 | 800 | 1600 |                        |
| 0 - 3          | 145           | 3             | -   | 2   | 3   | 1   | 2    | 11 (7,6) <sup>a</sup>  |
| 3,1 - 6        | 103           | 2             | 3   | 3   | 9   | 1   | -    | 18 (17,5) <sup>b</sup> |
| > 6            | 91            | 7             | 4   | 3   | 7   | 3   | -    | 24 (26,4) <sup>b</sup> |
| Total          | 339           | 12            | 7   | 8   | 19  | 5   | 2    | 53 (15,6)              |

Diferentes letras demonstram diferença estatística  $P < 0,05$  entre a condição soropositiva.

Tabela 8 - Título de anticorpos para *N. caninum* em cães da área urbana e rural do sul do Rio Grande do Sul, Pelotas, RS.

| Título de Anticorpos | Numero de cães positivos (%) |               | Total de positivos (%)<br>(n=53) |
|----------------------|------------------------------|---------------|----------------------------------|
|                      | Urbanos (n=6)                | Rurais (n=47) |                                  |
| 1:50                 | 1 (16,7)                     | 11 (23,4)     | 12 (22,6)                        |
| 1:100                | 0                            | 7 (14,9)      | 7 (13,2)                         |
| 1:200                | 0                            | 8 (17,0)      | 8 (15,1)                         |
| 1:400                | 3 (50,0)                     | 16 (34,0)     | 19 (35,8)                        |
| 1:800                | 2 (33,3)                     | 3 (6,4)       | 5 (10,6)                         |
| 1:1600               | 0                            | 2 (4,3)       | 2 (3,8)                          |

#### 5.4 – Associação entre fatores de risco e soropositividade para *N. caninum*

Foi analisada a frequência de soropositivos, segundo os possíveis fatores de risco. Aqueles que não revelaram associação, com valor de  $P \geq 0,25$ , na análise univariada, encontram-se na tab. 9 e foram removidos do modelo (análise multivariada). As variáveis com valor de  $P < 0,25$  encontram-se na tab. 10 e foram utilizadas no modelo multivariado (regressão logística).

Quando foram comparadas as ocorrências de animais soropositivos segundo a origem dos cães, observou-se que no meio rural esse índice é de 20,4%, significativamente superior ao de cães do meio urbano (5,5%). Entre os cães do ambiente rural foi maior a frequência de soropositivos em propriedades de criação de gado de corte (28,4%) do que em propriedades de criação de gado de leite (14,0%).

Na variável idade dos cães, foi observada associação altamente significativa com a soropositividade, demonstrando que a faixa etária de 0 a 3 anos tem menor ocorrência de cães soropositivos para *N. caninum* quando comparada com os animais mais velhos ( $P = 0,004$ ).

Os cães de raças definidas apresentaram maior frequência de soropositivos do que os cães sem raça definida, embora esta diferença não tenha sido significativa a nível de  $P \leq 0,05$ .

Quanto ao destino dado a carcaças bovinas, constatou-se que a prevalência de cães soropositivos foi maior em propriedades que deixam as carcaças no campo (Fica no campo x Queima) ( $P = 0,006$ ). Em 57,8% das propriedades de produção de gado de leite é dado destino adequado as carcaças e fetos de animais e em propriedades de criação de gado de corte este percentual foi de 34,3%. Esta diferença entre o tipo de exploração da propriedade e o fato de recolher as carcaças e fetos de animais do campo e dar o destino adequado as mesmas foi estatisticamente significativa  $P = 0,0006$  (OR=0,37 IC 95% = 0,20-0,69).

A frequência de soropositivos entre os cães de pastoreio, utilizados para o trabalho com o gado, foi significativamente superior ( $P = 0,003$ ) à daqueles de companhia.

Tabelas 9 – Variáveis (fatores de risco) sem associação significativa com a soropositividade ( $p \geq 0,25$ ) de cães da região de Pelotas, RS.

| Variável independente               | Variável dependente |          |                | $X^2$ | Valor de p |
|-------------------------------------|---------------------|----------|----------------|-------|------------|
|                                     | Número              | Positivo | Percentual (%) |       |            |
| <b>Contato com bovinos</b>          |                     |          |                |       |            |
| Sim                                 | 224                 | 47       | 20,9           | 1,6   | 0,25*      |
| Não                                 | 06                  | 0        | 0              |       |            |
| <b>Sinal nervoso no cão</b>         |                     |          |                |       |            |
| Sim                                 | 05                  | 0        | 0              | 0,9   | 0,4*       |
| Não                                 | 334                 | 53       | 15,9           |       |            |
| <b>Sinal nervoso em filhotes</b>    |                     |          |                |       |            |
| Sim                                 | 04                  | 0        | 0              | 0,7   | 0,5*       |
| Não                                 | 335                 | 53       | 15,8           |       |            |
| <b>Aborto nos bovinos</b>           |                     |          |                |       |            |
| Sim                                 | 127                 | 25       | 19,7           | 0,1   | 0,75       |
| Não                                 | 103                 | 22       | 21,6           |       |            |
| <b>Hectares</b>                     |                     |          |                |       |            |
| <50                                 | 122                 | 22       | 18,0           | 0,9   | 0,34       |
| >50                                 | 108                 | 25       | 23,1           |       |            |
| <b>Cães vão para o meio rural</b>   |                     |          |                |       |            |
| Sim                                 | 30                  | 1        | 3,3            | 0,3   | 0,47*      |
| Não                                 | 79                  | 5        | 6,3            |       |            |
| <b>Diagnóstico de aborto bovino</b> |                     |          |                |       |            |
| Sim                                 | 9                   | 2        | 22,2           | 0,0   | 0,28*      |
| Não                                 | 118                 | 45       | 38,1           |       |            |
| <b>Nº de cães</b>                   |                     |          |                |       |            |
| 1 a 3                               | 214                 | 31       | 14,5           | 0,58  | 0,44       |
| >4                                  | 125                 | 22       | 17,6           |       |            |

\* Valores de  $p$  através do Teste Exato de Fisher.

As variáveis demonstradas na tab. 10, embora algumas não tenham apresentado significância estatística em nível de 95% ( $P < 0,05$ ), foram utilizadas para verificar o real efeito de cada uma na regressão logística, uma vez que  $P < 0,25$ .

Tabela 10 – Variáveis (fatores de risco) com ( $P < 0,25$ ), incluídas na regressão logística.

| Variável independente      | Variável dependente |          |                | $X^2$ | Valor de p |
|----------------------------|---------------------|----------|----------------|-------|------------|
|                            | Número              | Positivo | Percentual (%) |       |            |
| <b>Origem*</b>             |                     |          |                |       |            |
| Urbano                     | 109                 | 06       | 5,5            | 12,5  | 0,0004     |
| Rural                      | 230                 | 47       | 20,4           |       |            |
| Leite                      | 128                 | 18       | 14,0           | 7,21  | 0,007      |
| Corte                      | 102                 | 29       | 28,4           |       |            |
| <b>Idade em anos*</b>      |                     |          |                |       |            |
| 0-3                        | 145                 | 11       | 7,6            | 12,44 | 0,0004     |
| > 3,1                      | 194                 | 42       | 21,6           |       |            |
| <b>Recolhe Carcaça*</b>    |                     |          |                |       |            |
| Sim                        | 96                  | 13       | 13,5           | 4,82  | 0,03       |
| Não                        | 134                 | 34       | 25,4           |       |            |
| <b>Raça*</b>               |                     |          |                |       |            |
| SRD                        | 180                 | 21       | 11,7           | 4,58  | 0,03       |
| Definida                   | 159                 | 32       | 20,1           |       |            |
| <b>Destino de carcaça*</b> |                     |          |                |       |            |
| Queima                     | 109                 | 14       | 12,8           | 7,34  | 0,006      |
| Fica no campo              | 121                 | 33       | 27,3           |       |            |
| <b>Confinamento</b>        |                     |          |                |       |            |
| Temporário                 | 66                  | 06       | 9,1            | 2,66  | 0,1        |
| Sempre soltos              | 273                 | 47       | 17,2           |       |            |
| <b>Presença de sorro</b>   |                     |          |                |       |            |
| Não                        | 83                  | 12       | 14,6           | 2,85  | 0,09       |
| Sim                        | 147                 | 35       | 23,8           |       |            |
| <b>Sexo</b>                |                     |          |                |       |            |
| Fêmeas                     | 181                 | 22       | 12,2           | 3,56  | 0,06       |
| Machos                     | 158                 | 31       | 19,6           |       |            |
| <b>Utilidade*</b>          |                     |          |                |       |            |
| Companhia/guarda           | 165                 | 16       | 9,7            | 8,6   | 0,003      |
| Pastoreio                  | 174                 | 37       | 21,3           |       |            |
| <b>Alimentação</b>         |                     |          |                |       |            |
| Comercial                  | 61                  | 06       | 9,8            | 1,9   | 0,17       |
| Caseira/carne crua         | 278                 | 47       | 16,9           |       |            |

\* Fatores de risco com  $p \leq 0,05$ , ou seja, representativo dentro da população.

## 5.5 – Regressão logística das variáveis com $P < 0,25$

O modelo inicial foi criado com as variáveis que na análise univariada mostraram um valor de  $P < 0,25$  (origem, idade, recolhe carcaça de animais mortos, raça, destino dado a carcaças, confinamento, presença de sorro na propriedade, sexo, utilidade, tipo de alimentação). O modelo final revelou existência de associação entre a soropositividade dos cães e duas variáveis, quando se comparou o ambiente rural com urbano, e com três variáveis quando a comparação dos dados foi feita somente no ambiente rural (leite e corte).

Entre as variáveis que demonstraram associação quando comparou-se área urbana e rural (tab. 11) observa-se que idade e destino dado a carcaças e fetos, apresentaram associação positiva com a condição sorologia para *N. caninum* já que o limite inferior do intervalo de confiança é maior que um, demonstrando assim que há associação neste intervalo. Verifica-se que os cães com mais de três anos têm 3,75 vezes mais chances de estarem infectados por *N. caninum* do que os de idade inferior (OR=3,75 IC 95%=1,78–7,91). Da mesma forma, cães provenientes de propriedades onde os proprietários não costumam eliminar carcaças de animais mortos estão 2,67 vezes mais expostos a essa infecção do que os que eliminam (OR=2,67 IC 95%=1,31–5,42).

Tabela 11 – Modelo final da análise multivariada (regressão logística) demonstrando as variáveis que apresentaram associação significativa com a sorologia dos cães entre a área urbana e rural do sul do Rio Grande do Sul, Pelotas, RS.

| Variáveis                              | Odds ratio | P      | IC 95%    |
|----------------------------------------|------------|--------|-----------|
| <b>Idade</b>                           |            |        |           |
| 0-3                                    | 1          |        |           |
| >3,1                                   | 3,75       | 0,0005 | 1,78-7,91 |
| <b>Destino dado a carcaças e fetos</b> |            |        |           |
| Queima                                 | 1          |        |           |
| Deixa no campo                         | 2,67       | 0,0066 | 1,31-5,42 |

Uma segunda análise multivariada foi realizada utilizando-se apenas o ambiente rural, dividido em propriedades de criação de gado de corte e propriedades de criação de gado de leite (tab. 12).

Tabela 12 – Modelo final da análise multivariada (regressão logística) demonstrando as variáveis que apresentaram associação significativa com a sorologia dos cães no ambiente rural (corte e leite), do sul do Rio Grande do Sul, Pelotas, RS.

| Variáveis                              | Odds ratio | P      | IC 95%     |
|----------------------------------------|------------|--------|------------|
| <b>Origem</b>                          |            |        |            |
| Leite                                  | 1          |        |            |
| Corte                                  | 2,24       | 0,0245 | 1,11-4,53  |
| <b>Destino dado a carcaças e fetos</b> |            |        |            |
| Queima                                 | 1          |        |            |
| Deixa no campo                         | 6,11       | 0,0495 | 1,00-37,17 |

Os cães pertencentes a propriedades de criação de gado de corte tiveram um risco maior (OR = 2,24) de serem soropositivos comparados com os animais pertencentes a propriedades de criação de gado de leite. No ambiente rural também observou-se que o risco de cães serem soropositivos para *N. caninum* é 6,11 vezes maior em propriedades que não dão o destino adequado as carcaças de animais mortos do campo do que naquelas que tem essa prática.

A variável confinamento dos cães mostrou que os animais que ficam o tempo todo soltos tem maior risco de serem soropositivos (OR = 0,36 IC 95%= 0,15-0,88) apesar de um valor baixo de OR, mas com valor significativo  $P = 0,0243$ .

## 6 – DISCUSSÃO

A técnica utilizada no presente trabalho foi a RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) que tem sido empregada na maioria dos trabalhos sorológicos com cães, com ponto de corte de 1:50 (BJÖRKMAN e UGGLA, 1999).

Dos 339 animais examinados, 15,63% (53 cães) foram soropositivos para *N. caninum*, indicando que estes animais foram expostos ao agente e responderam imunologicamente com a produção de anticorpos específicos. Dados de prevalências relatados na literatura têm ampla variação, desde 1% nas Ilhas Malvinas (BARBER et al., 1997) até 29%, na Itália (CRINGOLI et al., 1996). Rasmussem e Jensen (1996), na Dinamarca, observaram prevalência geral de cães soropositivos para *N. caninum* similar aos dados do presente estudo.

Na América do Sul, Barber et al. (1997) encontraram uma prevalência de 20% no Uruguai, posteriormente houve o relato de 37,8% na Argentina (BASSO et al., 2001b), 18% no Chile (PATTITUCI et al., 2001). No Brasil Gennari et al. (2002) observaram 18% de cães reagentes ao *N. caninum* na área urbana da cidade de São Paulo. Fernandes et al. (2004) relataram que 14% dos cães de Uberlândia, MG, estão infectados por *N. caninum*. Azevedo et al. (2005) observaram 8,4% de prevalência de anticorpos para *N. caninum* na Cidade de Campina Grande estado da Paraíba.

A ocorrência de cães soropositivos para *N. caninum* na área urbana da cidade de Pelotas, RS, foi de 5,5%, valores também encontrados por Wouda et al. (1999b) em área urbana na Holanda. Apesar de serem domiciliados, existe a possibilidade destes cães se infectarem com oocistos eliminados por cães errantes, uma vez que a maioria dos cães urbanos utilizados no estudo eram levado para passearem nas ruas da cidade, não ficando, portanto, restritos aos limites da

residência. Frequências pouco mais elevadas foram observadas em várias partes do mundo. No Chile, Pattituci et al. (2001), detectaram 12,5% de cães soropositivos na área urbana, enquanto que, na Itália, essa frequência foi de 11,7% (CAPELLI et al., 2004).

Diferenças nas ocorrências de cães soropositivos observados nos diversos locais podem ser atribuídas aos diferentes testes sorológicos utilizados e valores de ponto de corte. Alguns autores consideram como limiar de positividade no teste de RIFI a diluição de 1:200, o que embora diminua a sensibilidade, eleva sua especificidade, reduzindo a ocorrência de falso positivos (JESUS et al., 2006).

Soroprevalências distintas podem ser devidas também a diferenças de exposição da população canina aos fatores de risco da doença. Cañon-Franco et al. (2003) observaram que 8,3% dos cães da área urbana do município de Monte Negro, Rondônia, foram soropositivos para *N. caninum* e esta soropositividade pode ter sido devido a estes animais possuírem características próprias. Apesar de serem de área urbana, o município de Monte Negro é rodeado por floresta Amazônica na sua totalidade, o que pode favorecer o contato dos cães com animais silvestres e as fontes de infecção.

No presente estudo, quando comparadas as ocorrências de cães soropositivos para *N. caninum* nos diferentes ambientes estudados (urbanos e rurais), no meio rural a ocorrência foi 4 vezes maior (20,4%) do que naqueles de área urbana (5,5%). Esses dados reforçam a hipótese de que no meio rural o acesso dos cães às fontes de infecção é mais fácil, uma vez que estes animais têm a possibilidade de ingestão de carcaças de animais mortos deixados no campo assim como fetos bovinos abortados e restos placentários. A análise multivariada demonstrou que este tipo de fator de risco é importante na epidemiologia da neosporose, uma vez que cães provenientes de propriedades onde não existe o hábito de recolher os animais mortos ou fetos abortados do campo, têm 2,67 vezes mais risco de serem soropositivos do que cães onde esta prática é exercida.

Fernandes et al. (2004), em Minas Gerais, Uberlândia, demonstraram uma prevalência duas vezes maior de anticorpos para *N. caninum* em cães do meio rural em comparação com os da área urbana, corroborando com os dados ora mencionados.

Quando foram analisados separadamente no meio rural, cães provenientes de propriedades de criação de gado de corte e daquelas de criação de gado de leite, observou-se que em propriedades de criação de gado de corte a ocorrência de cães soropositivos é duas vezes maior do que naquelas de criação de gado de leite. Esta diferença foi estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) sendo que o risco de cães se infectarem pelo *N. caninum* é 2,24 (IC 95% = 1,11- 4,53) vezes maior em propriedades de criação de gado de corte. Isso pode ser consequência de que, em propriedades de criação de gado de leite os proprietários tem um controle maior da sanidade do rebanho e da propriedade, uma vez que 57,8% recolhem as carcaças do campo, enquanto que, entre os de corte, esse hábito existe em apenas 34,3% das propriedades, sendo esta diferença estatisticamente significativa. A análise multivariada demonstrou que em propriedades rurais onde os proprietários não têm o hábito de recolher as carcaças de animais mortos do campo os cães têm 6,11 vezes mais risco de serem soropositivos para *N. caninum*.

Patitucci et al. (2001) detectaram uma maior porcentagem de animais infectados, entre cães que eram utilizados para trabalhos ou esportes na zona rural, o que também foi observado no presente estudo pois cães que eram utilizados para o pastoreio foram estatisticamente mais infectados do que os de companhia ( $P=0,003$ ).

Em estudo realizado na Amazônia Ocidental Brasileira foi observado que propriedades leiteiras, de criação de gado de corte e mistas, apresentaram cães soropositivos para *N. caninum*, e os valores de ocorrências não apresentaram diferença estatística significativa entre si ( $P > 0,05$ ). Esses achados indicam que, independentemente da origem dos animais, a soropositividade se manteve similar entre os ambientes (AGUIAR et al., 2006).

Vários estudos no Brasil demonstram índices variáveis de infecção por *N. caninum* em rebanhos de gado leiteiro, comparados com os de gado de corte. Há relatos onde as taxas de soropositividade ao *N. caninum* são semelhantes entre propriedades de criação de gado de leite e de corte (SARTOR et al., 2003).

Com relação à idade dos cães, quando foi realizada a análise multivariada com o total de cães analisados, observou-se que cães com mais de 3 anos de idade tem 3,75 (IC 95% = 1,78 - 7,91) vezes mais risco de serem soropositivos para *N. caninum* do que cães jovens. Também foi observado um aumento da

soropositividade à medida que aumenta a faixa etária dos cães, o que indica a importância da transmissão horizontal do *N. caninum* nesses hospedeiros. Assim o ciclo enteroepitelial do parasito pode ter ocorrido, determinando a produção e eliminação de oocistos através das fezes, contaminando o ambiente (água e alimentos) e aumentando o risco de infecção para os bovinos e outros potenciais hospedeiros, como roedores e pequenos mamíferos, perpetuando assim a infecção no ambiente.

Dados semelhantes foram observados por Basso et al. (2001b) em populações de cães da área urbana e rural da Argentina. Os autores também atribuíram o aumento da soropositividade com o aumento da idade, à infecção pós-natal pelo parasito.

Soroprevalências associadas significativamente com a idade, sugestivas de ocorrência de transmissão horizontal, foram observadas em estudos similares (SOUZA et al., 2002; CAÑON-FRANCO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2004 e AGUIAR et al., 2006). Em contraste, diferenças não significativas foram observadas entre cães jovens e velhos em outros estudos (RASMUSSEN e JENSEN, 1996; VARANDAS et al., 2001; AZEVEDO et al., 2005).

Barber e Trees (1998) relatam que a taxa de transmissão vertical de neosporose em cães é baixa, já que 80% da prole de mães soropositivas não é infectada até o nascimento, indicando que a infecção pós-natal é significativa nesta espécie, o que também foi demonstrado no presente estudo.

Poucos cães (1,5%) já haviam apresentado sinais nervosos, o que poderia ser um indicativo de neosporose. Entretanto nenhum deles foi soropositivo, confirmando que a transmissão vertical não é a principal rota de transmissão de *N. caninum* entre os cães nas condições deste experimento.

A titulação máxima encontrada no presente estudo foi de 1:1600 (3,8%) e a mais freqüente, tanto no meio rural como na área urbana, foi 1:400 (34,84%). Na maioria dos trabalhos realizados no Brasil não foi observada correlação entre titulação alta e neosporose clínica como também foi observado no presente estudo. Souza et al. (2002) e Cañon-Franco et al. (2003) também obtiveram semelhantes observações.

Azevedo et al. (2005), demonstraram que nenhum dos cães analisados tiveram sinais clínicos e desordens neurológicas, a maioria dos cães soropositivos tiveram níveis baixos de anticorpos para *N. caninum* (título 1:50), o que também foi observado por Teixeira et al. (2006) em cães no Maranhão. Barber et al. (1997) sugeriram que títulos baixos poderiam sugerir falsos positivos, atribuindo a reações inespecíficas de anticorpos, principalmente com *Toxoplasma gondii*.

Não foram observadas associações estatisticamente significativas quando comparou-se as prevalências entre machos e fêmeas ( $P = 0,06$ ) e entre raças (definida e SRD  $P = 0,06$ ) tanto na análise univariada como na multivariada, estando em conformidade com Basso et al. (2001b). De acordo com Dubey (2003), a existência de predisposição de raça ou de susceptibilidade diferencial do sexo à neosporose nos cães são ainda desconhecidas. Contrário a esses resultados, Wouda et al. (1999a) demonstraram uma maior suscetibilidade nas fêmeas adultas do que nos machos, fato que pode ser relacionado a fatores hormonais presentes durante a gestação (BARBER e TREES, 1996).

Ainda são poucos os estudos que avaliam o quanto existe de associação entre a ocorrência de cães soropositivos e o tipo de dieta que recebem. Cañon-Franco et al. (2003), observaram que o efeito da dieta não foi significativo, conforme o observado no presente estudo, onde a dieta dos animais não teve influência estatística significativa na soropositividade dos cães. Patitucci et al. (2001) observaram que cães alimentados com carne crua, ou que tinham acesso a animais abatidos clandestinamente, tiveram um risco 2,613 vezes maior de serem soropositivos quando comparados com animais que se alimentavam a base de concentrado ou comida caseira.

Foi verificado no presente estudo que a variável confinamento dos cães, quando testada na análise multivariada entre propriedades rurais, demonstrou associação significativa com a sorologia dos cães ( $P = 0,0243$ ). Cão que tem o hábito de permanecer sempre solto tem um risco maior de ser mais contaminado com *N. caninum* do que aquele que permanece alguma parte do dia sob confinamento. Esta pequena diferença pode ser explicada pelo fato de que cães que permanecem o tempo todo soltos têm mais acesso a possíveis fontes de infecção, ingerindo presas, como por exemplo, pequenos mamíferos e aves, e também carcaças de bovinos e fetos mortos no campo.

O contato com canídeos silvestres não representou risco de infecção para *N. caninum* em nenhuma das análises feitas no experimento. Patitucci et al. (2001) e Cañon-Franco et al. (2004), verificaram que canídeos silvestres podem ser infectados por *N. caninum*, uma vez que foram detectados animais soropositivos em estudos realizado no Chile e na Região Sul do Estado do Rio Grande do Sul, podendo estes canídeos representar risco de infecção do ambiente onde vivem bovinos e cães domésticos.

No presente trabalho constatou-se que, em 26,8% das propriedades leiteiras onde havia o contato bovino/cão, os cães eram soropositivos para *N. caninum*. No Paraná, índices superiores foram detectados por Guimarães Junior et al. (2004), quando verificaram que, em 65,2% das propriedades leiteiras, existe pelo menos um cão soropositivo. Embora não tenha sido detectada associação significativa ( $P = 0,24$ ) entre a soropositividade de cães e bovinos de leite, foi constatado que 61,1% das propriedades com bovinos soropositivos também tinham cães soropositivos enquanto naquelas cujos bovinos eram soronegativos esse índice foi de 38,9%. Esses dados indicam a importância do contato cão/bovino na epidemiologia da doença. Segundo Wouda et al., (1999b), a presença de cães nas fazendas constitui um fator de risco para neosporose pois em fazendas sem cães, a soroprevalência nos bovinos foi significativamente mais baixa do que nas fazendas onde havia cães. Basso et al. (2001b) e Sawada et al. (1998) descreveram similares observações. No entanto, Aguiar et al., (2006) não observaram associação significativa entre a presença e a ausência de cães nas propriedades, em relação à soropositividade dos bovinos.

## 7 – CONCLUSÕES

*Neospora caninum* está presente na região sul do Rio Grande do Sul, infectando cães urbanos domiciliados e rurais.

A probabilidade de cães da área rural da região serem soropositivos para *Neospora caninum* é 4 vezes maior no ambiente rural.

O uso de cães para o manejo de bovinos, e o fácil acesso destes animais a material infectado, são importantes fatores de risco para *Neospora caninum* na região estudada.

Cães de propriedades de criação de gado de corte são 2,2 vezes mais soropositivos para *Neospora caninum* do que cães de propriedades de criação de gado de leite, na região estudada.

A principal forma de infecção por *Neospora caninum* entre os cães analisados é a horizontal (pós-natal), uma vez que a soroprevalência aumenta de acordo com a faixa etária.

## 8 – REFERÊNCIAS

AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; RODRIGUES, A.A.R; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; ERNEY, P.C.; GENNARI, S.M. 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, p.71-77, 2006.

ANDERSON, M.L.; BLANCHARD, P.C.; BARR, B.C.; DUBEY, J.P.; HOFFMAN, R.L.; CONRAD, P.A. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.198, n.2, p.241-244, 1991.

ANDERSON, M.L., REYNOLDS, J.P., ROWE, J.D., SVERLOW, K.W., PACKHAM, A.E., BARR, B.C., CONRAD, P.A. Evidence of vertical transmission of *Neospora* infection in dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 210, p. 1169–1172, 1997.

ANDERSON, M.L.; ANDRIANARIVO, A.G.; CONRAD, P.A. Neosporose in cattle. **Animal Reproduction Science**. V. 60-61 p. 417-431, 2000.

ANDREOTTI, R. Neosporose: um possível problema reprodutivo para o rebanho bovino -- Campo Grande : **Embrapa Gado de Corte**, 14p. -- (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1517-3747 ; 104), 2001.

ANDREOTTI, R.; OLIVEIRA, J.M.; SILVA, E.A.; OSHIRO, L.M.; MATOS, M.F.C. Occurrence of *Neospora caninum* in dogs and its correlation with visceral leishmaniasis in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.135, p.375-379, 2006.

ATKINSON, R.; HARPER, P.A.W.; REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. **Parasitology Today**, v. 16, n.3, p. 100-114, 2000.

AZEVEDO S.S.; BATISTA C.S.A.; VASCONCELLOS S.A.; AGUIAR D.M.; RAGOZO A.M.A.; RODRIGUES A.A.R.; ALVES C.J.; GENNARI, S.M. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 79, p. 51-56, 2005.

BARBER, J.S. Neosporosis canina. **Waltham Focus** v.8, p.25-29, 1998.

BARBER, J.S.; GASSER, R.B.; ELLIS, J.; REICHEL, M.P.; ILLAN, D.; TREES, A.J. Prevalence of serum antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. **Journal of Parasitology**, v.83, p.1056-1058, 1997.

BARBER, J.S., TREES, A.J. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. **The Veterinary Record**, v. 139, p. 439-443, 1996.

BARBER, J.S., TREES, A.J. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. **International Journal Parasitology** v.28, p.57-64, 1998.

BARR, B.C., BJERKAS, I. BUXTON, D., CONRAD, P.A. Neosporosis – report of the International *Neospora* Workshop. **Compendium On Continuing Education For The Practicing Veterinarian**, 19, p.120 -144, 1997.

BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; SVERLOW, K. W.; TARANTAL, A. F.; HENDRICKX, A. G. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. **Laboratory Investigation** v.71, p. 236-242, 1994.

BASSO, W.; VENTURINI, M. C.; BACIGALUPE, D.; KIENASTE, M.; UNZAGA, J.M.; LARSEN, A.; MACHUCA, M.; VENTURINI L. Confirmed clinical *Neospora caninum* infection in a boxer puppy from Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.131, p. 299-303, 2005.

BASSO, W.; VENTURINI L.; VENTURINI, M. C.; HILL, D. E.; KWOK, O. C. H.; SHEN S. K.; DUBEY, J. P. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 612-618, 2001a.

BASSO, W.; VENTURINI L.; VENTURINI, M. C.; MOORE, P.; RAMBEAU M.; UNZAGA, J. M.; CAMPERO C.; BACIGALUPE, D.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 906-907, 2001b.

BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zentralblatt für Parasitenkunde**, v. 70, n. 2, p. 271-274, 1984.

BJÖRKMAN, C.; JOHANSSON, O.; STENLUND, S. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 208, p.1441-1444, 1996.

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

BOCCACECI, M. Azara'sorro (*Pseudalopex gymnocercus*) In: Canid specialist group 1998. Disponível em: <http://www.canids.org/SPPACCTS/cthouus.htm>. Acesso em: 23 mai. 2007.

CAÑON-FRANCO, W.A.; BERGAMASCHI, D.P.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; SOUZA, S.L.P.; SILVA, J. C. R.; PINTER, A.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of antibodies anti-*Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.115, p. 71-74, 2003.

CAÑON-FRANCO, W.A.; SANTOS, L.C.; FARIAS, N.A.R.; RUAS, J.L.; SUMMA, M.E.L.; GÓMES, A.A.B; YAI, L.E.O.; SOUZA, S.L.P.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M.; Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em canídeos silvestres do Brasil. **Veterinary Parasitology**, v.123, p. 275-277, 2004.

CAPELLI, G.; NARDELLI, S.; REGALBONO, A.F.; SCALA, A.; PIETROBELLI, M. Sero-epidemiological survey of *Neospora caninum* infection in dogs in north-eastern Italy. **Veterinary Parasitology**, v.123, p. 143-148, 2004.

COLLANTES-FERNANDEZ E, ZABALLOS, A.; ÁLVARES-GARCÍA, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Quantitative Detection of *Neospora caninum* in Bovine Aborted Fetuses and Experimentally Infected Mice by Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.4, p.1194-1198, 2002.

CORBELLINI, L.G.; CAROLINE, A.P.; FERNANDA, F.; WUNDER, E.; STEFFEN, D.; SMITH, D.R.; DRIEMEIER, D. Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection: Importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil. **The Veterinary Journal**, v.172, p.114-120, 2006.

CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.F.E.; GONDIM, L.F.P.; WALD, V. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.103, n.3, .195-202, 2002.

CRINGOLI, G.; CAPUANO, F.; VENEZIANO, V. Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* in dog sera. **Veterinary Parasitology**, v.38, p.282, 1996.

DIJKSTRA, T.; EYSKER, M.; SCHARES, G.; CONRATHS, F.J.; WOUDA, W.; BARKEMA, H. W. Dogs shed *Neospora caninum* oocyst after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 8, p. 747–752, 2001.

DIJKSTRA, TH.; BARKEMA, H.W.; HESSELINK, J.W.; WOUDA, W.; EYSKER, M. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. **Veterinary Parasitology** v.105 p.99–104, 2002b.

DIJKSTRA, TH., BARKEMA, H.W., HESSELINK, J.W., WOUDA, W. Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. **Veterinary Parasitology**, v. 105, n. 2, p. 89-98, 2002a.

DUBEY, J.P.; Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.84, p.349-367, 1999a.

DUBEY, J. P. Neosporosis — the first decade of research. **International Journal of Parasitology** v. 29, p. 1485–1488. 1999b.

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

DUBEY, J.P.; CARPENTER, J.L.; SPEER, C.A.; TOPPER, M.J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.192, p.1269-1285, 1988a.

DUBEY, J.P.; HATEL, A. L.; LINDSAY, D. L.; TOPPER, M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 193, p. 1259 –1263. 1988b.

DUBEY, J.P.; KOESTNER, A.; PIPER, R.C. Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.197, n.7, p.857-860, 1990.

DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.67, p.01-59, 1996.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 1-34, 2006.

FARIAS, N.A.R. Neosporose - Uma enfermidade a ser estudada. **Ciência e Tecnologia Veterinária**, UFPEL, v.01, p.05-14, 2002.

FERNANDES, B.C.T.M.; GENNARI, S.M.; SOUZA, S.L.P.; CARVALHO, J.M.; OLIVEIRA, W.G.; CURY, M.C. Prevalence of anti-*N. caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city Uberlândia, Minas Gerais – Brazil. **Veterinary Parasitology** v. 123, p. 33-40, 2004.

FUCHS, N., SONDA, S., GOTTSTEIN, B. et al. Differential expression of cell surface- and dense granule-associated *Neospora caninum* proteins in tachyzoites and bradyzoites. **Journal of Parasitology**, v.84, p.753-758, 1998.

GENNARI, S.M. *Neospora caninum* NO BRASIL: SITUAÇÃO DA PESQUISA ATUAL. XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses Ouro Preto, MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, p.23-28, 2004.

GENNARI, S.M.; YAI, L.E.O.; D`AURIA, S.N.R.; CARDOSO, S.M.S.; KWOK, O.C.H.; JENKINS, M.C., DUBEY, J.P. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.106, n.2, p.177-179, 2002.

GIRALDI, J.H.; BRACARENSE, A.P.; VIDOTTO, O. Neosporose canina–revisão. **Clínica Veterinária**, n.34, p.50-56, 2001.

GONDIM, L.F.P.; McALLISTER, M.M.; MATEUS-PINILLA, N.E.; PITT, W.C.; MECH, L.D.; NELSON, M.E. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. . **Journal Parasitology**, v. 90, p.1361–1365, 2004.

GONDIM, L.F.P.; SARTOR, I.F.; HASEGAWA, M.; YAMAME, I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 86, p.71-75,1999.

GUIMARÃES JUNIOR, J.S., SOUZA, S.L.P., BERGAMASCHI, D.P., GENNARI, S.M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Parana´ state. Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.124, p.1–8, 2004.

HAMILTON, C.M.; GRAY, R.; STEPHEN, E.W.; BABUNILAYAM, G.; KAREN, L.; ELISABETH, A.I. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from around the UK. **Veterinary Parasitology**, v.130, p.169-173, 2005.

HERNANDEZ, J., RISCO, C., DONOVAN, A. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.219, p.632-635, 2001.

INSTITUTO RIO GRANDENSE DE ARROZ. Disponível em: <http://www.irga.rs.gov.br/arquivos/ranking.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2007, 15:40:16.

JESUS, E. E.V.; SANTOS, P.O.M.; BARBOSA, M.V.F.; PINHEIRO, A.M.; GONDIM, L.F.P.; GUIMARÃES, J.E.; ALMEIDA, M.A.O. Frequência de anticorpos anti-*N. caninum* em cães nos municípios de Salvador a Lauro de Freitas, Estado da Bahia – Brasil. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Sciences**, v.43, n.1, p.5 -10, 2006.

KASARI, R.T.; BARLING, K.; MCGRANN, J. M. Estimated production and economic losses from *Neospora caninum* infection in Texas beef herds. **Bovine Practice**, v.33, p.113-120, 1999.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **American Journal Veterinary Research**, v. 50, n. 11, p. 1981-1983, 1989.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Canine neosporosis. **Journal of Veterinary Parasitology**, v. 87, n. 1, p. 1-11, 2000.

LINDSAY, D. S.; ROSYPAL, C. A. The sylvatic cycle of *Neospora caninum*: where do we go from here? **Trends in Parasitology**, v.21, n.10, p. 439-440, 2005.

LINDSAY, D.S.; SPENCER, J.; RUPPRECHT, C.; BLAGBURN, L.B. Prevalence of agglutinating of antibodies to *Neospora caninum* in Raccoons, *Procion lotor*. **Journal of Veterinary Parasitology**, v. 97, p. 159-164, 2001a.

LINDSAY, D.S.; WESTON, J.L.; LITTLE, S.E. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) from South Carolina. **Veterinary Parasitology**, v. 82, p. 327-333, 2001b.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V.T.; RICHARTZ, R.R.; GASINO-JOINEAU, M.E.; VINNE, R.; SILVA, R.; LEITE, L.C.; PINCKNEY, R.D. Detecção de anticorpos contra *Neospora caninum* em vacas leiteiras e bezerros no Estado do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v.6, p.37-41, 2001.

LOBATO, J.; DEISE, A. O. S.; MINEO, W. P. T.; AMARAL, J. D. H. F.; GESMAR, R. S. S.; COSTA-CRUZ, J. M.; FERREIRA, M. S.; BORGES, S. A.; MINEO, R. J. 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.

LONG, P.L. **Coccidiosis of man and animals**. Boca Raton: CRC Press, 1990, p. 356.

MARSH, A.E.; BARR, B.C.; SVERLOW, K.; HO, M.; DUBEY, J.P.; CONRAD, P.A. Sequence analysis and comparison of ribosomal DNA from bovine *Neospora caninum* to similar coccidial parasites. **Journal of Parasitology**, v.81, p.530-535, 1995.

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

MELO, C.B.; LEITE, R.C.; SOUZA, G.N. *Neospora caninum*: Distribuição de anticorpos em três faixas etárias de rebanhos bovinos de leite em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.2, p.250-251, 2001.

MUNHOZ, A. D.; FLAUSINO, W.; ALMEIDA, C.R.R.; LOPES, C.W.G. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas, no rebanho leiteiro do município de Rio Claro, estado do Rio de Janeiro: dados preliminares. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. **Anais do Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 12, 2002, Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002. CD-ROM.

OLIVEIRA, M.J.; MATOS, M.F.C.; OSHIRO, L.M.; ANDREOTTI, R. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs in the urban area of Campo Grande, MS, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, p.155-158, 2004.

PAPPEN, F.; CUNHA, FILHO, N. A.; RUAS, J. L.; FARIAS, N. A. R. RELAÇÃO ENTRE A OCORRÊNCIA DE ABORTO E A SOROPREVALÊNCIA DE *Neospora caninum* EM REBANHO BOVINO LEITEIRO NO SUL DO RIO GRANDE DO SUL. 2005. In: XIV Congresso de Iniciação Científica, VII EnPos encontro de pós-graduação. **Anais do XIV Congresso de Iniciação Científica, VII EnPos Encontro de Pós-Graduação, UFPel, Pelotas, 2005**.

PARE´, J.; FECTEAU, G.; FORTIN, M.; MARSOLAIS, G. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. V. 213, p.1595–1598. 1998.

PARÉ J.; HIETALA, S. K.; THURMOND, M. C. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, n. 2, p. 273-275, 1995.

PATITUCCI, A.N.; PÉREZ, M.J; ROZAS, M.A.; ISRAEL, K.F. Prevalência de anticuerpos séricos contra *N. caninum* en dos rebaños lecheros de la IX Region de Chile. **Arquivo de Medicina Veterinária**, 2: p. 209-215, 2000.

PATITUCCI, A.N.; PHIL, M.; PÉREZ, M.J.; ROZAS, M.A.; ISRAEL, M.V. Neosporose canina: Presencia de anticuerpos sericos en poblaciones caninas rurales y urbanas de Chile. **Arquivo de Medicina Veterinária**, v.33, n.2, Valvidia 2001.

PETERS, M.; LÜTKEFELS, E.; HECKEROTH, A.R.; SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscle of naturally infected dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.1114-1148, 2001.

PITUCO, E.M., STEFANO, E.; OKUDA, L.H.; TROTTER, C.M.; PERUCINI, L.M.; DUARTE, F.C. Sorodiagnóstico de neosporose bovina no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.68, p.83, 2001. Suplemento. Trabalho apresentado na REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 14, 2001, São Paulo. Resumo 113. CD-ROM.

RAGOZO, A.M.A., PAULA, V.S.O., SOUZA, S.L.P., BERGSMASCHI, D.P., GENNARI, S.M. Occurrence of antibodies anti-*Neospora caninum* in bovine sera from six Brazilian states. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 1, p. 33-37, 2003.

RASMUSSEN, K.; JENSEN, A. L. Some epidemiologic features of canine neosporosis in Denmark. **Veterinary Parasitology**, v. 62, p. 345-349, 1996.

RODRIGUES, A. A. R; GENNARI, S. M; AGUIAR, D. M; SREEKUMAR, C; HILL, D. E; MISKA, K. B; VIANNA, M. C. B; DUBEY, J. P. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.124, p.139–150, 2004.

ROMANELLI, P.R.; FREIRE, R.L.; VIDOTTO, O.; MARANA, E.R.M.; OGAWA, L.; DE PAULA, V.S.O.; GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 82, p. 202-207, 2007.

ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; DUBEY, J.P. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. **Parasitology Research**, v.84, n.1, p. 50-53, 1998.

SARTOR, I. F.; GARCIA FILHO, A.; VIANNA, L. C.; PITUCO, E. M.; DAL PAI, V.; SARTOR, R. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros e de corte da região de Presidente Prudente, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.4, p.413-418, 2005.

SARTOR, I.F.; HASEGAWA, M.Y.; CANAVESSI, A.M.O.; PINCKNEY, R.D. Ocorrência de anticorpos de *Neospora caninum* em vacas leiteiras avaliados pelos métodos de ELISA e RIFI no município de Avaré, SP. **Seminário de Ciências Agrárias**, v.24, p.3-10, 2003.

SAWADA, M.; PARK, C.H.; KONDO, H.; MORITA, T.; SHIMADA, A.; YAMANE, I.; UMEMURA, T. Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60, n. 07, p. 853-854, 1998.

SCHARES, G.; PETERS, M.; WURM, R.; BARWALD, A.; CONRATHS, F.J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analyzed by serological techniques. **Veterinary Parasitology**, v.80, p.87-98, 1998.

SILVA, M.I.S.; ALVES, L.C.A.; FAUSTINO, M.A.G.; ALMEIDA, M.A.; PINHEIRO, M.A.; JESUS, E.E.V.; CUNHA, A.P.; NASCIMENTO, E.S.; LIMA, M.M. Freqüência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros do município de gravatá. Pernambuco. **Anais do Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, **12**, **2002**. Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002, CD-ROM.

SOUZA, S.L.P.; GUIMARÃES Jr, J.S.; FERREIRA, F.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Paraná, Brazil. **Journal of Parasitology**, v.88, p.408-409, 2002.

STATISTIX 8.0. **Analytical Software**. User's Manual, 396p.

TEIXEIRA, W. C; SILVA, M.I.S; PEREIRA, J.G; PINHEIRO, A.M; ALMEIDA, M.A.O; GONDIM, L.F.P. Freqüência de cães reagentes para *Neospora caninum* em São Luís, Maranhão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n.4, p.685-687, 2006.

UNIVERSIDADE FEDERALDE PELOTAS: Disponível em:  
<http://www.ufpel.tche.br/pelotas/>. Acesso em:10 jan. 2007, 15:30:25.

VÁCLAVEK, P.; SEDLAK, K.; HURKOVA, L.; VODRAZKA, P.; SEBESTA, R.; KOUDELA B. Serological survey of *Neospora caninum* in dogs in the Czech Republic and a long-term study of dynamics of antibodies. **Veterinary Parasitology**, v.143, p.35–41, 2007.

VARANDAS, N.P., RACHED, P.A., COSTA, G.H.N., SOUZA, L.M., CASTAGNOLLI, K.C., COSTA, A.J. Freqüência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em cães da região nordeste do estado de São Paulo: correlação com neuropatias. **Semina: Ciencias Agrarias** 22, 105–111, 2001.

VIANA, M.C.B; SREEKUMAR, C; MISKA, K.B; HILL, D.E.; DUBEY, J.P. Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Veterinary Parasitology**, v.129, p.253–257, 2005.

VITALIANO, S.N.; SILVA, D.A.O.; MINEO, T.W.P.; FERREIRA, R.A.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J.R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from southeastern and Midwestern regions of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.122, p.253–260, 2004.

WANHA, K.; EDELHOFER, R.; GABLER-EDUARDO, C.; PROSL, H. Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs and foxes in Austria. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 189-193, 2005.

WOUDA, W; DIJKSTRA, T; KRAMER, A. M. H.; VAN MAANEN, C.; BRINKHOF, J. M. A. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n.10, p.1677-1682, 1999a.

WOUDA, W; BARTELS C.J.M.; MOEN A.R. Characteristics of *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995-1997). **Theriogenology**, v.52, p.233-245, 1999b.

## **ANEXO**

### Questionário sobre neosporose

Numero do formulário:

Data:

Nome do proprietário:

Município:

Localidade:

Telefone:

Qual o tipo de exploração da propriedade: ( ) Urbano ( ) corte ( ) leite

Numero de hectares:

Hectares que usa em agricultura:

Hectares que usa em pecuária:

Hectares que usa em arrendamento:

Qual a taxa de natalidade dos bovinos:

Tem problema de aborto nos bovinos: ( ) Sim ( ) Não

Recolhe as carcaças de animais mortos do campo: ( ) Sim ( ) Não

Recolhe os fetos abortados do campo: ( ) Sim ( ) Não

Destino dado aos fetos:

Destino dado as carcaças:

Já evidenciou aborto nos animais da propriedade: ( ) Sim ( ) Não

Se sim quais espécies:

Tem diagnostico dos agentes causadores de aborto na propriedade e qual o causador:

Numero do cão:

Nome do cão:

Raça:

Idade:

Sexo:

Qual utilidade e dada ao cão: ( ) companhia, ( ) guarda, ( ) caça, ( ) pastoreio

Os cães ficam: ( ) confinados temporariamente, ( ) permanentemente ( ) sempre soltos

Os cães vão para o meio rural ( ) Sim ( ) Não

Cães tem contato com outros animais, quais:

Algum sinal nervoso no cão: ( ) Sim ( ) Não

Que alimento dá ao cão: ( ) ração, ( ) carne crua, ( ) carne cozida, ( ) leite cru, ( ) restos de alimentos ( ) cozido.

Já evidenciou sinal nervoso em filhotes de cães: ( ) Sim ( ) Não

Total de cães na propriedade:

Total de gatos:

Esses gatos têm acesso ao local de armazenamento das rações dos animais?

( ) Sim ( ) Não

E aos Cochos?

( ) Sim ( ) Não

Se não, como os mantém afastados?

( ) Tela ( ) Cães ( ) Nenhum ( ) Os gatos não vão por medo ( ) Outros- Descrição de outros

Já viu sorro na propriedade: ( ) Sim ( ) Não

Se sim onde:

**Diagnóstico sorológico:**

**Titulação de anticorpos:**