

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

***Neospora caninum* em bovinos da bacia leiteira
da região de Pelotas, RS: soroprevalência
e associação com fatores de risco.**

Andréia da Silveira Lucas

Pelotas, 2007

ANDRÉIA DA SILVEIRA LUCAS

***Neospora caninum* em bovinos da bacia leiteira
da região de Pelotas, RS: soroprevalência
e associação com fatores de risco.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação da
Faculdade de Medicina Veterinária
da Instituição, como requisito
parcial à obtenção do título de
Mestre em Veterinária.

Orientador: Nara Amélia da Rosa Farias

Pelotas, 2007

636

L933n

Lucas Andréia da Silveira

Neospora Caninum em bovinos da bacia leiteira da Região de Pelotas, RS / Andréia da Silveira Lucas; orientador Nara Amélia da Rosa Farias – Pelotas : UFPEL : Faculdade de Veterinária, 2007. – 84 p.

Dissertação

Programa de Pós-Graduação em Veterinária

I. Neospora Caninum II. Bovino Leiteiro
III. Epidemiologia IV. RIFI 1. Autor 2. Título
3. Farias, Nara Amélia da Rosa.

Banca examinadora

Nara Amélia da Rosa Farias

Jerônimo Lopes Ruas

Cláudio Alves Pimentel

Neusa Saltiel Stobbe

AGRADECIMENTOS

A Deus pela graça maior, a VIDA, por me fazer capaz de realizar meus sonhos e não desistir nunca ao longo da estrada, sempre buscando o conhecimento.

À melhor família do mundo, a minha é claro, pelo amor, compreensão nos momentos mais difíceis, incentivo e apoio durante toda a minha jornada.

À minha mãe científica, Nara Amélia Farias, por ter me aturado todos estes anos, e não foram poucos, pela amizade, amor, e pela maravilhosa orientação que levarei com grande orgulho, marcada a fogo pelo resto da minha vida.

Ao meu amor, Vinicius, pelo apoio, incentivo, dedicação e muita compreensão, nesta etapa da minha vida.

À minha filhota, Shara Cristina, pelo amor incondicional e lambidas, de compreensão e apoio em todos os momentos.

Aos meus queridos colegas Felipe, Nilton e Cíntia, pelo apoio, amizade e ajuda indispensável na realização da parte experimental deste trabalho.

À professora Solange Gennari por ter gentilmente aberto às portas do seu laboratório para realizarmos a parte de diagnóstico sorológico deste trabalho e principalmente pela sua hospitalidade, atenção e auxílio durante nossa estadia em São Paulo.

À querida Alessandra Rago pelo carinho, dedicação, experiência e ensinamentos, indispensáveis das técnicas laboratoriais de diagnóstico, e principalmente pela amizade e seus “serviços de guia turística” de três gaúchos desorientados na grande São Paulo.

Aos professores Ricardo Dias e Thomaz Lucia Junior pelo valioso apoio nas análises estatísticas deste trabalho.

Aos funcionários da Secretaria da Agricultura de Pelotas, em especial ao Dr. Mário Schuster, pela amizade, disponibilidade e apoio incansável no fornecimento dos dados e mapeamento das propriedades estudadas, sobretudo na interseção junto aos produtores.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFPel, que participaram direta ou indiretamente neste trabalho, pela amizade e apoio.

A todos os companheiros e amigos do laboratório de Parasitologia da UFPel, Jerônimo, Tânia, Tiago, Graci, Bia, Michele, Josi, Alice, Luciana, Karina, Cristina, Herman e Deise, sempre prontos a ajudar, pela agradável convivência durante todos estes anos.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFPel, em especial a Dona Vera e Antonieta, pela amizade e auxílio.

A todos os funcionários, estagiários, pós-graduandos e professores do Laboratório de Doenças parasitárias da USP pela calorosa acolhida, apoio e auxílio técnico durante nossa permanência em São Paulo.

Aos meus queridos Bianca, Débora, Aline, Michele Gonçalves e Alex (cabeçudo) por serem muito mais que amigos, meus irmãos de coração.

Aos colegas do pós-graduação, em especial aos amigos Priscila Leon, Eduardo Madruga e Virgilio pelos conselhos e apoio nos momentos difíceis.

Aos produtores, por permitirem o acesso e coleta de material dos seus animais, em especial ao Zé e Sr. Paulo, pela espetacular ajuda, intermediando o acesso às propriedades da região estudada.

Quem pôs véus nas pitangueiras e alambrou cordas de espinhos
é porque andou mil caminhos e bandeou mil corredeiras
Depois alargou fronteiras, buscando outras direções,
usando outras expressões na textura dos poemas
e hoje seus versos são gemas que formam constelações.

Jayme Caetano Braun

RESUMO

LUCAS, Andréia da Silveira. ***Neospora caninum* em bovinos da bacia leiteira da região de Pelotas, RS: soroprevalência e associação com fatores de risco.** 2007. 84f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Para verificar a prevalência de anticorpos para *Neospora caninum* e os fatores de risco associados em bovinos leiteiros provenientes de 92 propriedades localizadas na bacia leiteira da região de Pelotas, Rio Grande do Sul, foram coletadas 1046 amostras de soro sanguíneo de fêmeas com mais de seis meses de idade e aplicado um questionário epidemiológico, contendo questões ligadas a neosporose aos responsáveis pelas propriedades. As amostras foram avaliadas pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI ≥ 100). As associações estatísticas entre o “status” sorológico do rebanho e as possíveis variáveis ligadas ao ambiente e manejo, foram avaliadas por regressão logística (Statistx 8.0). Também foi verificada a soroprevalência dos cães (RIFI ≥ 50) em 67 propriedades. Em 26,8% (18/67) destas propriedades existia pelo menos um cão soropositivo para *N. caninum*. A prevalência entre os bovinos foi de 12,04%, distribuídos em 47,6% (43/92) das propriedades analisadas. A porcentagem de fêmeas soropositivas, por propriedade, variou de 2,6 a 100%. As variáveis: acesso de outros animais doméstico à comida dos bovinos (OR: 13,34; IC 95%: 1,60-111,57, P=0,0168) e produção leiteira até 5000 l/mês (OR: 2,77; IC 95%: 1,07-7,18, P= 0,0362) apresentaram associação estatística com a soropositividade para *N. caninum*. Não foi observada associação entre a soropositividade dos cães e dos bovinos nos rebanhos estudados.

Palavras-chave: *Neospora caninum*, bovinos leiteiros, epidemiologia, RIFI.

ABSTRACT

LUCAS, Andréia da Silveira. ***Neospora caninum* in bovines from the milk basin region of Pelotas county, RS: serum prevalence and risk factors association** 2007. 84p. Dissertation (Master Degree) – Veterinary Pos Graduation Program. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The seroprevalence of *Neospora caninum* and the associated risk factors in dairy properties were verified in Pelotas region. Blood serum of 1046 six months older females from 92 properties were analysed by indirect immunofluorescence Assay (IFA ≥ 100). Canine seroprevalence from 67 properties was also verified (IFA ≥ 50). An epidemiological questionnaire with neosporosis related issues was also applied to evaluate risk factors and statistical associations between the serological status of the livestock and the possible variables related to environment and handling, were evaluated by logistic regression (Statistx 8.0). The prevalence in bovines was 12,04%, in 47,6% of the analysed properties. Although at least one seropositive dog was found in 26,8% of the properties, none association was found between canine and bovine seroprevalences. The variables that presented statistic relation with the seropositivity to *N. caninum* in the studied were: access of others domestic animals to the bovine food (OR: 13,34; IC 95%: 1,60-111,57, P=0,0168), and monthly milk production until 5000l (OR: 2,77; IC 95%: 1,07-7,18, P= 0,0362).

Key Words: *Neospora caninum*, dairy cattle, seroepidemiology, IFA, risk factors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1..Rotas de transmissão de <i>N. caninum</i> e envolvimento de hospedeiros silvestres (adaptado de DUBEY; BUXTON e WOUDA, 2006)	9
Figura 2 Distribuição geográfica dos municípios estudados, na região sul do Estado do Rio Grande do Sul: Pelotas (1); Turuçu (2); Morro Redondo (3); Arroio do Padre (4)	34
Figura 3 Distribuição de bovinos soropositivos para <i>N. caninum</i> (RIFI), segundo a faixa etária	44
Figura 4 Relação entre a soropositividade (RIFI) para <i>N. caninum</i> de bovinos e cães, nas propriedades estudadas na região de Pelotas, RS	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Levantamentos soroepidemiológicos de <i>Neospora caninum</i> em bovinos leiteiros de diferentes países (1999 a 2006)	18
Tabela 2	Levantamentos sorológicos para <i>N. caninum</i> em bovinos leiteiros, de diferentes Estados do Brasil, no período de 1999 -2006	19
Tabela 3	Número de propriedades e de bovinos de exploração leiteira, nos municípios da região de Pelotas, RS (SAA, 2005)	35
Tabela 4	Número de fêmeas coletadas por propriedade, segundo o tamanho do rebanho leiteiro (Epi-Info 6.04)	36
Tabela 5	Caracterização da infra-estrutura e manejo das propriedades analisadas na região de Pelotas, RS	41
Tabela 6	Perfil sanitário das propriedades analisadas na região de Pelotas, RS, quanto a possíveis fatores de risco para neosporose bovina .	42
Tabela 7	Frequência de bovinos soropositivos na região estudada, segundo o título de anticorpos para <i>N. caninum</i> por RIFI.	43
Tabela 8	Distribuição da frequência de bovinos soropositivos para <i>N. caninum</i> (RIFI) segundo o município estudado	44
Tabela 9	Distribuição das propriedades com pelo menos um bovino soropositivo, segundo os possíveis fatores de risco para <i>N. caninum</i>	45

Tabela 10	Resultado da análise multivariada dos fatores associados com soropositividade para <i>N. caninum</i> nas propriedades estudadas, pertencentes à categoria I e II	47
Tabela 11	Análise da associação entre possíveis fatores de risco e a soropositividade de bovinos, em propriedades com rebanho superior a 50 animais, na região de Pelotas, RS	48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Geral	3
2.2 Específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 O agente	4
3.2 Biologia	5
3.2.1 Ciclo biológico e morfologia	5
3.2.2 Transmissão	9
3.3 Epidemiologia	12
3.3.1 Atores de risco	12
3.3.1.1 Presença de cães domésticos e silvestres	13
3.3.1.2 Raça e idade dos bovinos	14
3.3.1.3 Lotação e tempo de confinamento animal	15
3.3.1.4 Estação climática	15
3.3.1.5 Produção leiteira e descarte de fêmeas	16
3.3.2 Prevalência em bovinos leiteiros	16
3.3.2.1 <i>N. caninum</i> em diferentes países	16
3.3.2.2 <i>N. caninum</i> no Brasil	17
3.3.2.3 <i>N. caninum</i> no Rio Grande do Sul	18
3.4 Patogenia e sinais clínicos	20
3.5 Métodos diagnósticos	25
3.5.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	26
3.5.2 Teste de Aglutinação (NAT)	27
3.5.3 Ensaio Imuno Enzimático (ELISA)	28
3.5.4 Western-Blotting	29
3.5.5 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	29
3.5.6 Exame histopatológico e Imonohistoquímica (IH)	30
3.5.7 Ensaio biológico	31
3.6 Tratamento	32
3.7 Controle e profilaxia	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Área estudada	34
4.2 Procedimentos de amostragem	35

4.3 Coleta de sangue e dados epidemiológicos	36
4.4 Teste sorológico	37
4.5 Determinação da prevalência e análise estatística	38
5 RESULTADOS	40
5.1 Características das propriedades e do rebanho estudado	40
5.2 Sorologia	42
5.3 Associação entre as características da propriedade e os resultados sorológicos	45
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICE	70

1 INTRODUÇÃO

Neospora caninum Dubey; Carpenter; Speer; Topper; Uggla (1988) é um protozoário que foi isolado e reconhecido há cerca de duas décadas, envolvendo em seu ciclo biológico principalmente bovinos e cães.

Este protozoário está globalmente distribuído e é considerado um dos mais importantes causadores de aborto em bovinos de exploração leiteira e de corte. Ao contrário de *T. gondii* em ovinos, *N. caninum* pode ser transmitido verticalmente por gestações consecutivas em bovinos (DUBEY et al., 2003).

Cães (*Canis familiaris*) e coiotes (*Canis latrans*) são os únicos hospedeiros definitivos do *N. caninum* conhecidos até o momento, eliminando oocistos nas fezes e contaminando o meio ambiente (GONDIM et al., 2004). Os cães também podem servir de hospedeiros intermediários, podendo apresentar a infecção extra-intestinal que atinge diversos órgãos (DUBEY et al., 2004).

Existem fortes evidências que exista um ciclo silvestre de *N. caninum*, uma vez que anticorpos para este parasito foram encontrados em uma grande variedade de animais silvestres e domésticos como: gatos, ovinos, búfalos, caprinos, eqüinos, cervídeos, gambás, camelos, alpacas, lhamas, macacos e capivaras (SCHETTERS et al., 2004; GONDIM, 2006).

Vários podem ser os efeitos da presença da neosporose no rebanho bovino. O cálculo das perdas econômicas, devidas a esta enfermidade, requer a quantificação dos custos diretos e indiretos atribuídos à infecção. Para produtores leiteiros, as perdas ocasionadas são consideráveis, já que este parasito é um importante causador de aborto bovino. O abortamento é calculado de acordo com o

valor comercial do feto abortado. Na Califórnia, Lindsay (1998) estimou que um aborto pode custar ao produtor cerca de 500 a 900 dólares. Estas perdas implicam no ciclo de produção total da propriedade, pois consequentemente, aumentam o retorno das fêmeas ao período de serviço e o intervalo entre partos, reduzem a produção leiteira, diminuem o número de terneiras e novilhas de reposição, e aumentam o descarte de fêmeas em idade reprodutiva. Também estão incluídos neste cálculo custos com diagnósticos e honorários do Médico Veterinário (TRESS et al., 1999).

No Rio Grande do Sul Corbellini et al. (2002), identificaram e isolaram *N. caninum* através de exame histológico e imunohistoquímica em fetos bovinos abortados de rebanhos leiteiros de regiões distintas do Estado.

Corbellini et al. (2006b), constataram que 17,8% dos bovinos de exploração leiteira das regiões noroeste e sudoeste do Estado apresentam anticorpos para o agente. Pappen et al. (2005), encontraram associação entre soropositividade para *N. caninum* e histórico de aborto, em vacas de um rebanho leiteiro da região de Pelotas, RS, evidenciando a presença deste parasito na região.

O estudo epidemiológico da neosporose é fundamental para verificar a relação hospedeiro, agente e ambiente. A falta de informações sobre a epidemiologia do agente tem limitado a proposta de soluções práticas para prevenir a neosporose nos rebanhos bovinos.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Estudar a epidemiologia da neosporose bovina em rebanhos leiteiros da região de Pelotas, Rio Grande do Sul.

2.2 ESPECÍFICOS

Estimar a soroprevalência para *Neospora caninum* no rebanho leiteiro da região de Pelotas, RS;

Estabelecer o grau de associação entre a soroprevalência para *N. caninum* em bovinos e cães nas propriedades estudadas;

Identificar fatores de manejo e epidemiológicos que tenham influência sobre a soropositividade para *N. caninum* no rebanho estudado.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O AGENTE

Neospora caninum é um protozoário formador de cistos semelhante ao *T. gondii*, porém distinto em sua estrutura antigênica, imunogenicidade e patogenicidade relacionada ao hospedeiro (DUBEY et al., 2002). Baseado nestas características diferenciais de outros parasitos formadores de cistos pertencentes ao filo Apicomplexa, *N. caninum* foi denominado por Dubey et al. em 1988.

Segundo Levine (1985) a classificação taxonômica proposta para *Neospora caninum* é a seguinte: protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoasida, ordem Eucoccidiorida, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae.

Foi descrito pela primeira vez na Noruega, no ano de 1984, em cães de uma ninhada da raça Boxer, que apresentavam sinais clínicos neurológicos, encefalite e miosite, com cistos no cérebro e tecido muscular, causados por um protozoário semelhante ao *T. gondii*, porém com ausência de anticorpos para este parasito (BJERKAS; MOHN; PRESTHUS, 1984).

Em 1988, foi realizado um estudo retrospectivo, em 23 cães com histórico de toxoplasmose clínica atendidos em um hospital de Clínicas Veterinárias nos Estados Unidos, entre os anos de 1948 e 1987. Foram identificadas em 13 cães características estruturais e histopatológicas compatíveis com *T. gondii*. Em outros 10 animais foram observadas características semelhantes às descritas anteriormente por Bjerkas; Mohn e Presthus (1984). Os animais afetados por este

parasito também apresentavam sinais clínicos mais severos quando comparados aos dos cães com toxoplasmose (DUBEY et al., 1988).

Posteriormente, *N. caninum* foi isolado em cultivo celular de cães naturalmente infectados e cistos foram observados em camundongos inoculados com homogeneizado de tecidos destes cães (DUBEY et al., 1988). Neste mesmo estudo, foi desenvolvido o teste de imunofluorescência indireta para o diagnóstico sorológico de *N. caninum*.

Thilsted e Dubey (1989), foram os primeiros a diagnosticar neosporose bovina, em fetos abortados em uma propriedade leiteira no Novo México, onde 29 vacas de um total de 240, abortaram durante um período de 5 meses. Parish et al. (1987) já haviam encontrado cistos de um protozoário que apresentava diferenças estruturais e antigênicas de *T. gondii* e *Sarcocystis* sp. no sistema nervoso central de terneiros recém nascidos com sinais clínicos neurológicos.

Conrad et al. (1993), realizaram o primeiro isolamento de *N. caninum* em feto bovino abortado. Neste mesmo estudo, nenhuma diferença estrutural ou molecular foi observada entre o parasito encontrado em caninos e em bovinos, evidenciando que a mesma espécie acomete bovinos e caninos igualmente.

Na América do Sul, os dados sobre neosporose bovina ainda são escassos. O primeiro relato de identificação do agente foi feito por Venturini et al. (1995) na Argentina, através de teste sorológico em rebanho com histórico de aborto, que posteriormente seria confirmado por imunohistoquímica em feto abortado bovino (CAMPERO et al., 1998). No Brasil e no Uruguai, Gondim et al. (1999) e Bañales et al. (2006) respectivamente, relataram o primeiro caso de aborto em bovinos, causado por *N. caninum*.

3.2 BIOLOGIA

3.2.1 Ciclo biológico e morfologia

N. caninum é um protozoário intracelular obrigatório, pertencente à família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae, que é formada por muitas espécies de coccídios com ciclo de vida heteroxeno, que formam cistos em uma grande variedade de hospedeiros intermediários (DUBEY, 1999).

O ciclo biológico de *N. caninum* envolve três fases: 1) fase de multiplicação rápida com formação de taquizoítos; 2) fase de multiplicação lenta com formação de bradizoítos e 3) fase sexuada (no hospedeiro definitivo) com eliminação de oocistos (McALLISTER *et al.*, 1998; ATKINSON *et al.*, 2000).

A fase sexuada de desenvolvimento deste parasito ocorre no intestino dos cães, sendo estes considerados hospedeiros definitivos e tendo um importante papel na sua transmissão. As fases entero-epiteliais (esquizogonia e gametogênese) de *N. caninum* que antecedem a formação de oocistos no hospedeiro definitivo, ainda são desconhecidas, não sendo possível descrever e localizá-las no intestino dos canídeos (DUBEY *et al.*, 2002). Estágios semelhantes à esquizogonia foram relatados em cultura celular com bradizoítos isolados de cérebro de cães naturalmente infectados (DUBEY *et al.*, 2004).

Estudos recentes demonstraram que coiotes (*Canis latrans*) também podem ser hospedeiros definitivos de *N. caninum* (GONDIM *et al.*, 2004).

Evidências sorológicas sugerem que canídeos silvestres como dingo australiano (*Canis familiaris dingo*), *Pseudalopex gymnocercus* (graxaim do campo), *Cerdocyon thous* (graxaim do mato), *Chrysocium brachyurus* (lobo guará) e *Dusicyon vetulus* (raposinha do nordeste ou do campo), também possam ser responsáveis pela disseminação de oocistos, com conseqüente envolvimento na transmissão horizontal de *N. caninum* em propriedades rurais (BUXTON; McALLISTER; DUBEY, 2002; DUBEY, 2003; VITALIANO *et al.*, 2004; CAÑÓN-FRANCO *et al.*, 2004).

Steinman *et al.* (2006), em estudo realizado com canídeos silvestres de vida livre em Israel, encontraram baixas prevalências de anticorpos para *N. caninum* nestes animais, que provavelmente não tenham um papel importante na epidemiologia da neosporose neste país.

Os cães eliminam oocistos (10 -12µm de diâmetro) não esporulados nas fezes, após a ingestão de tecidos infectados pelo agente (McALLISTER *et al.*, 1998). Mais de um milhão de oocistos são excretados durante um período, que pode durar semanas. Em condições ambientais favoráveis podem esporular dentro de 24 horas, sendo bastante resistentes aos efeitos ambientais e permanecendo viáveis no solo, água e fontes alimentares dos hospedeiros intermediários por longos períodos de

tempo (DUBEY; LINDSAY, 1996; DUBEY, 1999; GONDIM et al, 2004). Os oocistos esporulados de *N. caninum* tem estrutura semelhante aos de *Isospora* sp., contendo dois esporocistos com quatro esporozoítos cada (LINDSAY; DUBEY, 1993).

Gondim; Gao e McAllister (2002), verificaram que os cães eliminam um total de 503.300 oocistos após a ingestão de tecido bovino infectado com *N. caninum*, demonstrando sua importância na transmissão horizontal da neosporose. Estes mesmos autores relataram que apenas 300 oocistos são suficientes para causar infecção em bovinos.

Schares et al. (2005), encontraram oocistos em fezes de cães naturalmente infectados, morfologicamente semelhantes aos de *Hammondia heydorni*, porém mais curtos e com a relação largura/altura menor, sugerindo como critério preliminar de identificação de *N. caninum*, a diferenciação entre essas duas espécies de protozoários.

Gondim; McAllister e Gao (2005), relataram que cães infectados experimentalmente com tecido bovino, podem se tornar refratários ao *N. caninum* alguns meses após a sua primo-infecção, não liberando oocistos novamente. Estes mesmos autores sugerem que a idade dos cães pode influenciar na produção de oocistos.

Bergeron et al. (2001), tentaram infectar nove cães com idade entre dois e quatro meses, através da ingestão de placenta e fetos bovinos naturalmente infectados por *N. caninum*. Estes cães não excretaram oocistos ou soroconverteram, além de não terem apresentado nenhum sinal clínico ou lesão compatível à infecção pelo parasito.

Os cães, mesmo após produzirem e eliminarem oocistos de *N. caninum*, podem manter-se soronegativos, não sendo possível afirmar a ausência da infecção nestes animais apenas através de testes sorológicos (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY; UPTON; DUBEY, 1999).

O hospedeiro intermediário se infecta ao ingerir oocistos esporulados juntamente com água ou alimentos. Após a ingestão, os esporozoítos atravessam a parede intestinal e alcançam a corrente sanguínea ou linfática, iniciando a fase de multiplicação rápida do parasito com formação de taquizoítos (3 a 7µm x 1 a 5 µm). Os taquizoítos penetram ativamente nas células, dividem-se rapidamente, e têm

preferência por células nervosas, mas podem-se multiplicar em diferentes tipos celulares. São capazes de ultrapassar a placenta, causando infecções fetais (INNES et al., 2000).

Quando é formada a resposta pelo sistema imune do hospedeiro intermediário, a multiplicação do parasito diminui, iniciando a fase de multiplicação lenta, com formação de bradizoítos no interior de cistos teciduais (100 a 107 μm). Os bradizoítos (6,5 x 1,5 μm) possuem núcleos localizados terminalmente com poucos grânulos de amilopectina (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006).

Cistos teciduais podem variar consideravelmente de tamanho, dependendo do número de bradizoítos que estes contêm no seu interior e do tempo de infecção. Localizam-se preferencialmente no SNC e retina, órgãos imunologicamente débeis (DUBEY et al., 2002).

Estes cistos, contendo células infectivas no seu interior, podem contribuir para a manutenção da infecção nos hospedeiros intermediários por toda a vida (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY; UPTON; DUBEY, 1999; DUBEY; SCHARES, 2006).

Segundo Gondim (2006), cervídeos são presas naturais de canídeos silvestres e suscetíveis à infecção por *N. caninum*, evidenciando a possibilidade de um ciclo de transmissão silvestre, que pode mesclar-se e também contribuir para contaminação de animais domésticos (Figura 1). Gondim et al. (2004), infectaram cães com tecido cerebral de cervídeos naturalmente infectados e estes cães eliminaram oocistos que, posteriormente, foram administrados a um terneiro, induzindo à formação de altos níveis de anticorpos contra esse protozoário.

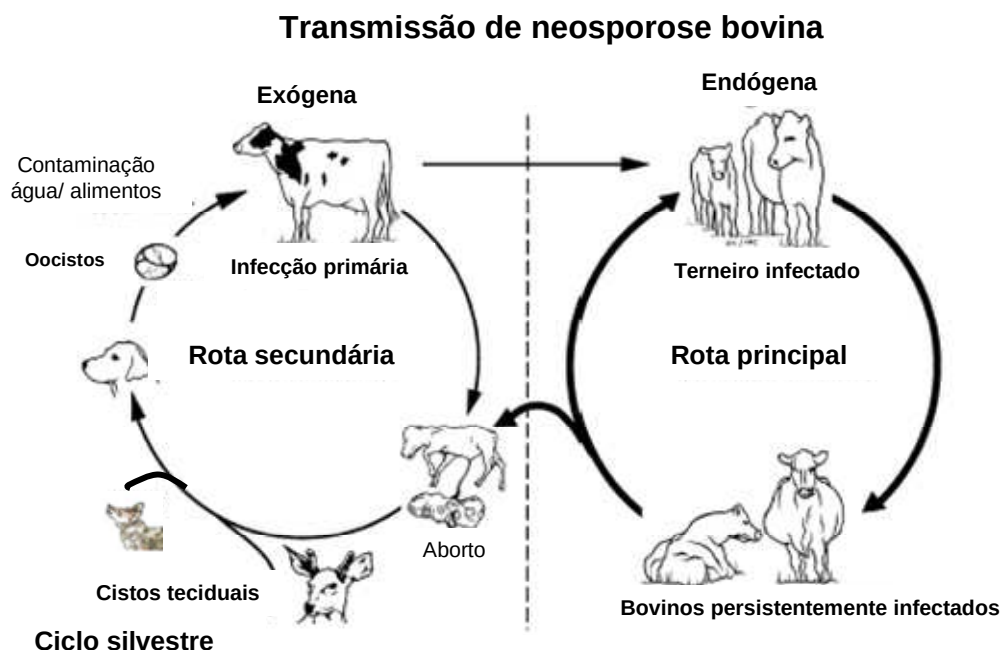


FIGURA 1 – Rotas de transmissão de *N. caninum* e envolvimento de hospedeiros silvestres (adaptado de Dubey; Buxton e Wouda, 2006)

3.2.2 Transmissão

Um importante aspecto da neosporose bovina é que o protozoário é mantido no rebanho em infecções crônicas e pode ser transmitido ao feto durante a gestação (ANDERSON; ANDRIANARIVO; CONRAD, 2000). Bovinos infectados experimentalmente com taquizoítos de *N. caninum*, durante a gestação, geralmente abortam, indicando que estes são patogênicos ao feto (SCHETTERS et al., 2004).

A baixa prevalência da infecção nos cães e o fato de serem os únicos hospedeiros definitivos domésticos conhecidos até o momento, não explicariam prevalências de anticorpos para *N. caninum* de 87%, encontradas em alguns rebanhos bovinos (McALLISTER et al., 2000; DIJKSTRA et al., 2001).

Existem duas formas de transmissão de *N. caninum* em bovinos: transmissão horizontal, que ocorre quando bovinos ingerem oocistos do parasito, eliminados nas fezes dos hospedeiros definitivos; transmissão vertical ou transplacentária, que é a principal forma de disseminação e manutenção deste protozoário nos rebanhos, sendo perpetuada por várias gerações. A presença de anticorpos específicos é detectada na progênie de vacas soropositivas, antes de os

terneiros ingerirem o colostro (BJORKMAN et al., 1996; ANDERSON et al., 1991; OBENDORF et al., 1995).

Recentemente, os termos transmissão transplacentária exógena e endógena (Fig. 1), foram propostos para descrever mais precisamente a origem e a rota da infecção no feto (TREES; WILLIAMS, 2005).

Até o momento não existem evidências de outra transmissão de *N. caninum* de bovino para bovino (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006). Modry e Lapeta (2001), sugeriram a placentofagia como um possível modo de transmissão da neosporose entre bovinos. Davison et al. (2001) em estudo de rebanhos leiteiros do Reino Unido não observaram este tipo de transmissão.

Estudos epidemiológicos evidenciam que casos de aborto epidêmico associados a *N. caninum*, em bovinos, são causados por infecção pós-natal, através da exposição à água e alimentos contaminados com oocistos (DUBEY; SCHARES, 2006).

Em rebanhos bovinos com histórico de abortamento endêmico por neosporose, a principal rota de infecção é a vertical (mãe para filha) (SCHARES et al., 2002). A transmissão vertical ocorre porque a infecção fetal frequentemente não resulta em aborto, podendo se tornar persistentemente infectado o terneiro que sobrevive. Fatores como: período da gestação em que o parasito é transmitido, reativação da infecção crônica, magnitude da parasitemia e características patogênicas da cepa atuante, vão acarretar diferentes alterações no feto. Estes fetos podem morrer no útero, serem reabsorvidos, mumificados, autolisados, natimortos, ou ainda, nascerem vivos, doentes ou clinicamente sadios, mas cronicamente infectados (ANDERSON et al., 1997; DUBEY, 2003).

Vários estudos têm detectado índices de infecção congênita, em mães soropositivas para *N. caninum*, de 40,7% (PAN et al., 2004) a 95,2% (DAVIDSON; OTTER; TRESS, 1999a). Em propriedades consideradas endêmicas para esta protozoose, as taxas de animais soropositivos geralmente são idênticas entre terns e vacas (SCHARES et al., 1998; ROMERO et al., 2002; PAPPEN et al., 2005) e as taxas de aborto anuais geralmente são superiores a 5% (ANDERSON; ANDRIANARIVO; CONRAD, 2000).

Mesmo que a transmissão vertical seja considerada a principal forma de transmissão de *N. caninum* em bovinos, existe vários indícios da ocorrência de transmissão horizontal, evidenciando a presença de cães na propriedade como um importante fator de risco para neosporose bovina (GUIMARÃES JR et al., 2004; ROMERO et al., 2005; CORBELLINI et al., 2006b).

Importantes observações epidemiológicas de rebanhos com abortamento epidêmico associado ao *N. caninum*, indicam uma forma de infecção pós-natal (horizontal) sugerindo um ponto de exposição ao agente. Nesses casos, ocorre uma falta de associação entre a soropositividade de mães e de filhas, aumento da soropositividade com a idade, e presença de uma curva epidêmica durante os surtos de abortamento (McALLISTER et al., 2000; BUXTON; McALISTER; DUBEY, 2002).

Dijkstra et al. (2002), analisaram rebanhos leiteiros na Holanda, encontrando fortes evidências de que os cães podem se infectar pela ingestão de fluidos fetais e placenta de vacas infectadas por *N. caninum* e, conseqüentemente, causar infecção pós-natal em rebanhos bovinos pela eliminação de oocistos no meio ambiente.

Fioretti et al. (2003), isolaram *N. caninum* de 20 g de amostra de placenta de três vacas naturalmente infectadas, que pariram por três vezes consecutivas terneiros infectados. Esses dados revelam que a placenta bovina pode ser uma importante fonte de infecção para cães, pela quantidade (Kg) de tecido que a constitui e pelo fácil acesso que os cães têm a este material em propriedades rurais.

As evidências epidemiológicas de infecção pós-natal nos bovinos são sustentadas pela demonstração experimental de que terneiros também podem ser infectados oralmente com oocistos de *N. caninum* (DE MAREZ et al., 1999).

Kashwazaki et al. (2004), não encontraram correlação entre o status sorológico de terneiros e suas mães em rebanhos leiteiros no Uruguai, o que confirma a ocorrência de infecção pós-natal.

Uggla et al. (1998) demonstraram a infecção de terneiros recém nascidos, quando estes foram infectados, por via oral, com leite contendo taquizoítos de *N. caninum*.

A transmissão lactogênica de taquizoítos ou a ingestão de membranas fetais e fluidos uterinos contendo taquizoítos podem contribuir para infecção pós-natal de *N. caninum*, mas essas rotas são de menor importância (DAVISON et al., 2001).

Terneiros podem ser infectados com *N. caninum* por meio de desafio oral com colostro ou substitutos de leite infectados experimentalmente com taquizoítos, até uma semana depois do nascimento. Neste mesmo trabalho os autores não conseguiram provar a infecção quando utilizaram placenta, leite ou colostro de vacas naturalmente infectadas com *N. caninum*.

Não existem evidências de que ocorra transmissão venérea ou por transferência de embriões em bovinos, desse protozoário, embora já tenha sido encontrado taquizoítos de *N. caninum* em sêmem bovino (SCHARES et al., 1998; UGLA et al., 1998; BAILLARGEON et al., 2001; MOORE, 2005).

Até o momento, não foi relatada nenhuma predisposição genética para infecção por *N. caninum* em bovinos. As diferenças no manejo de rebanhos leiteiros e de corte possivelmente expliquem as altas prevalências encontradas em bovinos de exploração leiteira, por estes últimos serem geralmente mais expostos (SCHETTERS et al., 2004; MOORE, 2005).

3.3 EPIDEMIOLOGIA

3.3.1 Fatores de Risco

São inúmeros os fatores de risco para neosporose bovina que têm sido largamente discutidos na literatura.

Bartels; Wouda e Schukken (1999) realizaram estudo na Holanda com o objetivo de analisar fatores de risco para infecção por *N. caninum*, associada a surtos de abortamento. Estes autores encontraram como fatores significantes a presença de cães e aves na propriedade e alimentação com silagem de milho úmida durante o verão. Segundo eles, a silagem de milho úmida pode conter micotoxinas que são relatadas como causadoras de imunossupressão em bovinos.

Barling et al. (2001b), em estudo realizado em bovinos de corte no Texas, não encontraram associação entre infecção por *N. caninum* e o tamanho das propriedades. Entretanto, outros fatores de risco foram associados à infecção pelo parasito, como: período de nascimento dos terneiros, densidade animal, acesso de canídeos silvestres ao concentrado dos bovinos e manejo inadequado de fêmeas prenhes (concentração e tempo de permanência no mesmo potreiro).

Schares et al. (2004), determinaram através de modelo de regressão logística, os fatores de risco significativos para infecção por *N. caninum* em bovinos leiteiros, como tamanho do rebanho, localização da propriedade, número de cães presentes e temperaturas ambientais.

Ogawa et al. (2005), não encontraram diferenças significativas entre soropositividade para *N. caninum* em bovinos leiteiros e as variáveis estudadas como manejo das vacas, problemas reprodutivos, alimentação, presença de cães, gatos e roedores.

Corbellini et al. (2006b), em propriedades leiteiras de duas regiões distintas (noroeste e sudoeste) no Rio grande do Sul encontraram forte associação entre soropositividade dos rebanhos para *N. caninum* e a presença de cães, área da propriedade, e fornecimento de pool de leite ou colostro aos terneiros. Estes autores não encontraram nenhuma associação entre a idade das vacas e a infecção com o parasito.

Bjorkman et al. (2000), em estudo realizado em rebanhos na Suíça, encontraram associação positiva entre a soropositividade para *N. caninum* e o vírus da diarreia bovina. No entanto Bartels; Wouda e Schukken (1999) e Gottstein et al. (1999) não observaram essa mesma associação.

3.3.1.1 Presença de cães domésticos e silvestres

Wouda et al. (1999), encontraram associação entre soropositividade de cães e altas prevalências de infecção de rebanhos leiteiros na Holanda, indicando a relação entre infecção por *N. caninum* em ambas as espécies.

Barling et al. (2001b), observaram em terneiros de rebanhos de corte no Texas, aumento de risco da infecção por *N. caninum* como resultado da abundância de canídeos silvestres, principalmente coiotes e gray fox (*Urocyon cinereoargenteus*), sustentando a hipótese da existência de um ciclo de transmissão silvestre na neosporose bovina.

Outros estudos também encontraram evidências epidemiológicas que indicam associação entre cães e a ocorrência de aborto por *N. caninum* (DIJKSTRA et al., 2002). Estudos realizados na Espanha e França encontraram associação

positiva entre soropositividade de *N. caninum* em bovinos, presença e número de cães (OULD-AMROUCHE et al., 1999; MAINAR-JAIME et al., 1999).

Moore et al. (2002), em estudo realizado na Argentina, em propriedades com altos índices de prevalência de anticorpos para *N. caninum* (rebanhos leiteiros e de corte), não encontraram diferenças significativas entre os rebanhos e o tipo de exploração e sim quanto à soropositividade dos cães presentes nestas propriedades.

Estudo realizado em propriedades leiteiras da Itália, revelou forte associação entre a soropositividade do rebanho e a presença de dois ou mais cães, quando comparados com propriedades sem nenhum cão (OTRANTO et al., 2003).

Sánchez et al. (2003), em estudo realizado em propriedades leiteiras de Tizayuca no México, encontraram diferenças significativas na prevalência de anticorpos para *N. caninum* em bovinos de propriedades com cães (58%) e sem cães (35%).

Guimarães Junior et al. (2004), constataram baixa correlação entre a presença de *N. caninum* em bovinos e cães infectados pertencentes às mesmas propriedades localizadas no sul do Paraná.

3.3.1.2 Raça e Idade dos bovinos

Melo et al. (2001), em estudo realizado em Minas Gerais, em fêmeas leiteiras, não observaram diferença de soropositividade para *N. caninum* entre as faixas etárias estudadas. Guimarães Júnior et al. (2004), observaram uma maior prevalência em fêmeas com idade superior a 24 meses, indicando a idade como um importante fator de risco para infecção pelo *N. caninum*.

Estudos soroepidemiológicos realizados em propriedades leiteiras do Uruguai e Paraguai, demonstraram associação entre ocorrência de aborto e soropositividade para *N. caninum*. Contudo, não foram considerados como fatores de risco para abortamento, os altos títulos de anticorpos obtidos na RIFI e a idade das vacas (entre dois e seis anos) (OSAWA et al., 2002; KASHWAZAKI et al., 2004).

Bryan et al. (1994), na Nova Zelândia, observaram abortamentos por *N. caninum* ocorrendo de forma mais freqüente em animais acima de quatro anos de

idade. No entanto Dijkstra et al. (2003) sugeriram que o risco de aborto decresce com a idade das vacas, o número de lactações e gestações consecutivas, indicando o desenvolvimento de alguns níveis de imunidade nos animais cronicamente infectados.

Não tem sido observada associação entre soropositividade para *N. caninum* e a raça de bovinos leiteiros (OULD-AMROUCHE et al., 1999).

3.3.1.3 Lotação e tempo de confinamento animal

Em rebanhos bovinos, Otranto et al. (2003) na Itália e Anderson; Andrianarivo e Conrad (2000) nos EUA, encontraram um maior risco de infecção por *N. caninum* associado com altas densidades animais.

Sanderson; Gay e Baszler (2000), realizaram estudo sobre prevalência e fatores de risco associados em bovinos, não encontrando relação entre o status sorológico individual dos animais e sua origem (compra ou criação própria). Neste mesmo estudo, os animais com menos de três anos de idade mostraram maior soropositividade quando comparados com bovinos com idade superior a seis anos.

Patitucci et al. (2000), identificaram o tempo de confinamento de rebanhos leiteiros no Chile, aproximadamente seis meses por ano, como uma possível causa dos altos índices de prevalência para *N. caninum* neste país.

3.3.1.4 Estação climática

López-Gatius; Pabon e Almerý (2004) na Espanha, encontraram níveis de aborto quatro vezes mais altos em animais que gestaram em períodos quentes do que em frios. Estes níveis também se apresentaram 3,7 vezes mais altos em fêmeas multíparas.

Segundo Mcallister et al. (1996), os abortos causados por *N. caninum* ocorrem em forma de surto ou esporadicamente, em qualquer estação do ano.

Na Holanda, de 50 casos de aborto em bovinos, no período de 1995 a 1997, 38 ocorreram durante o verão e outono (WOUDA et al., 1999; BARTELS; WOUDA; SCHUKKEN, 1999).

Na Califórnia o aumento de risco de aborto por *N. caninum* tem sido observado durante os meses de inverno, correspondendo a um clima mais ameno e mais úmido (THURMOND; ANDERSON; BLANCHARD, 1995).

3.3.1.5 *Produção leiteira e descarte de fêmeas*

Vacas soropositivas para *N. caninum* apresentam uma diminuição na produção leiteira de 2,8l/dia, quando comparadas a vacas soronegativas (HERNÁNDEZ; RISCO; DONOVAN, 2001).

Thurmond e Hietala (1997), reportaram que vacas soropositivas da raça Holandesa têm uma diminuição de 366 litros de leite/ano/vaca. Estes mesmos autores verificaram que o risco de descarte por baixa produção leiteira foi duas vezes maior para vacas soropositivas quando comparadas com soronegativas.

Estudo realizado por Hernandez; Risco e Donovan (2001), na Flórida, EUA, demonstrou um declínio de 3 a 4% na produção de leite, com queda de aproximadamente 363 Kg/vaca/ano, representando uma perda financeira de 128 dólares por animal.

Outro estudo verificou que vacas soropositivas são refugadas 6,3 meses antes e tem 1,6 vezes maior risco de serem descartados do que vacas soronegativas do mesmo rebanho (Thurmond; Hietala 1997).

López-Gatius; Santolaria e Almeria (2005), avaliaram 7518 inseminações artificiais em três rebanhos bovinos com alta incidência de aborto por *N. caninum*, não encontrando diferença na taxa de prenhez entre vacas soropositivas (32,6%) e soronegativas (34%). Os autores concluíram que a infecção pelo parasito não afeta a fertilidade em vacas leiteiras de alta produção.

3.3.2 *Prevalências em bovinos leiteiros*

3.3.2.1 *N. caninum em diferentes países*

Em alguns rebanhos de exploração leiteira, a soroprevalência do *N. caninum* pode atingir níveis bem altos, aproximando-se de 100%.

Desconsiderando a falta de uniformidade entre as técnicas usadas em levantamentos sorológicos de *N. caninum* em bovinos, são encontradas prevalências que variam de 5,6 a 60,6% em rebanhos leiteiros e de 4,1 a 26,6% em bovinos de corte (DUBEY, 2003). Na tab. 1 estão relacionados alguns estudos epidemiológicos sobre *N. caninum* realizados em bovinos de exploração leiteira provenientes de rebanhos de diferentes países do mundo durante o período de 1999 a 2006, com prevalências variando de 8,7 a 76%.

3.3.2.2 *N. caninum* no Brasil

O primeiro caso de infecção por *N. caninum* no Brasil foi diagnosticado por Gondim et al. (1999) na Bahia, em um feto bovino abortado no oitavo mês de gestação, proveniente de uma propriedade leiteira com histórico de abortamento. Os autores detectaram a presença de cisto no cérebro deste feto que foi positivo pela técnica de Imunohistoquímica.

Na tab. 2 é possível observar que *N. caninum* está amplamente distribuído nos rebanhos brasileiros, existindo a presença de anticorpos para este parasito em bovinos de todas as regiões do país. Os estudos epidemiológicos realizados utilizaram diferentes pontos de corte para RIFI, tornando difícil a comparação entre os resultados obtidos. As prevalências variam entre 10,4 e 65,5% nos grupos bovinos estudados.

Tabela 1 – Levantamentos soroepidemiológicos de *Neospora caninum* em bovinos leiteiros de diferentes países (1999 a 2006).

PAÍS	EXAMINADOS	PREVALÊNCIA (%)	TÉCNICA	AUTOR
Alemanha	100	49	ELISA	Bartels et al. (2006)
Argentina	1048	16,6	RIFI	Moore et al. (2002)
Austrália	93	38,7	ELISA	Hall;Reichel e Ellis,(2005)
Canadá	2604	19,2	ELISA	Chi et al. (2002)
Chile	371	22,4	RIFI	Patitucci et al. (2000)
Costa Rica	2743	43,3	ELISA	Romero et al. (2005)
Espanha	1121	35,9	ELISA	Quintanilla-Gonzalo et al. (1999)
EUA	2585	24	ELISA	Sanderson;Gay e Baszler, (2000)
Inglaterra	4295	17,1	ELISA	Davison;French e Trees, (1999)
Iram	337	46	ELISA	Razmi et al. (2006)
Itália	1140	8,7	ELISA	Otranto et al. (2003)
México	1003	72	ELISA	Morales et al. (2001)
Países Baixos	108	76	ELISA	Bartels et al. (2006)
Paraguai	297	36	ELISA	Osawa et al. (2002)
Portugal	114	28	RIFI	Canada et al. (2004)
Uruguai	217	56,7	RIFI	Kashwazaki et al. (2004)
Venezuela	459	11,5	iscom-ELISA	Lista-Alves et al. (2006)

3.3.2.3 *N. caninum* no Rio Grande do Sul

Embora a bovinocultura seja uma das mais importantes indústrias no sul do Brasil, estudos sobre neosporose bovina ainda são escassos no Estado do Rio Grande do Sul.

Corbellini et al. (2002), realizaram estudo sorológico do tipo caso-controle em 223 amostras de sangue de vacas da raça Holandesa, com e sem histórico de aborto no Rio Grande do Sul. As amostras foram avaliadas através de RIFI com ponto de corte de 1:200, onde 11,2% das vacas foram soropositivas para *N. caninum* com prevalência maior entre os animais com histórico de abortamento (23%) do que sem este histórico (8,3%). Nesse mesmo estudo foi observada a forte associação entre vacas soropositivas ao protozoário e abortamento, indicando que vacas soropositivas têm até 3,3 vezes mais chance de abortar do que as soronegativas. Estes mesmos autores analisaram 46 fetos bovinos provenientes de diversas propriedades leiteiras do Rio Grande do Sul através de histologia e

imunohistoquímica, identificando lesões compatíveis ao *N. caninum* em 47,8% (22) dos fetos.

Tabela 2 – Levantamentos sorológicos para *N. caninum* em bovinos leiteiros, de diferentes Estados do Brasil, no período de 1999 -2006.

Estado	nº amostras	Ocorrência(%)	Técnica	Autor
Bahia	447	14,9	RIFI	Gondim et al. (1999)
M. Grosso Sul	23	21,7	RIFI	Ragozo et al. (2003)
Minas Gerais	126	34,4	RIFI	Ragozo et al. (2003)
Minas Gerais	359	18,7	ELISA	Melo et al. (2001)
Paraná	75	21,3	RIFI	Ragozo et al. (2003)
Paraná	172	34,8*	ELISA	Locatelli Dittrich et al. (2001)
Paraná	413	21,6	RIFI	Guimarães Júnior et al. (2004)
Paraná	385	12	RIFI	Ogawa et al. (2005)
Pernambuco	469	34,8*	RIFI	Silva et al. (2002)
Rio Grande Sul	70	18,6	RIFI	Ragozo et al. (2003)
Rio Grande Sul	223	11,2	RIFI	Corbellini et al. (2002)
Rio Grande Sul	87	33,4*	RIFI	Pappen et al. (2005)
Rio Grande Sul	1549	17,8	RIFI	Corbellini et al. (2006b)
Rio de Janeiro	126	23,8	ELISA	Munhoz et al. (2002a)
Rio de Janeiro	140	33,5	ELISA	Munhoz et al. (2002b)
Rondônia	2109	10,4	RIFI	Aguiar et al. (2006)
São Paulo	150	27,3	RIFI	Ragozo et al. (2003)
São Paulo	370	38,9	ELISA	Piagentini (2002)
São Paulo	408	35,54*	ELISA	Sartor et al. (2005)
São Paulo	521	15,9	RIFI	Sartor et al. (2003)
São Paulo	521	30,5*	ELISA	Sartor et al. (2003)

*com histórico de aborto

Ragozo et al. (2003), analisaram soro de 140 vacas com idade superior a três anos, de exploração leiteira (70) e corte (70) provenientes de dez propriedades do Estado, coletadas entre os anos de 1996 e 2000, encontrando prevalências de 9,3% (leite) e 10,7% (corte). As amostras utilizadas pertenciam a um banco de soro e foram selecionadas por conveniência, sendo o diagnóstico realizado pela RIFI, com ponto de corte de 1:25.

Pappen et al. (2005), avaliaram um rebanho leiteiro da região de Pelotas, RS com índices anuais de aborto entre 25% e 35%. Todos os animais da propriedade

foram testados em dois momentos distintos em 2001 e 2004 (após as fêmeas soropositivas terem sido retiradas da reprodução) encontrando uma prevalência de anticorpos para *N. caninum* de 31,3 e 11,1% respectivamente. Os autores encontraram uma associação de 100% entre fêmeas que abortaram e soropositividade para o agente.

Corbellini et al. (2006a), avaliaram 161 fetos bovinos provenientes de propriedades (leiteiras e de corte) do Estado, dos quais 23% estavam infectados por *N. caninum*. A infecção pelo parasito foi confirmada por Imunohistoquímica e as principais lesões encontradas foram encefalites multifocais não supurativas, miocardites e miosites.

Corbellini et al. (2006b), relataram a ocorrência de anticorpos para *N. caninum* em bovinos leiteiros de duas regiões distintas do Estado (noroeste e sudoeste), onde a prevalência média foi de 17,8%. Os autores encontraram soroprevalência de 19,4% em São Lourenço do Sul, o que confirma a presença do agente em bovinos da região sul do Estado.

Estes resultados sugerem que *N. caninum* esteja presente em grande parte do rebanho bovino gaúcho, sendo provavelmente uma importante causa de abortamento e conseqüentes perdas econômicas na bovinocultura deste Estado.

3.4 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

A neosporose bovina é principalmente uma patogenia que acomete feto e placenta, onde a parasitemia materna resulta de uma infecção primária (exógena) ou da reativação de uma infecção persistente (endógena) durante a prenhez (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006).

Resultados de vários estudos indicam que 12 a 44% dos fetos bovinos abortados são infectados por *N. caninum*. Estes valores podem variar de 2,5 a 77%, indicando que estes abortos podem ocorrer tanto de forma endêmica como epidêmica no rebanho. Em rebanhos epidêmicos as fêmeas têm chance de 10 a 12,5% de abortar com seis a oito semanas de gestação (SCHARES et al., 2002).

Mesmo que existam similaridades entre *N. caninum* e *T. gondii*, há diferenças entre a neosporose nos bovinos e a toxoplasmose em ovinos. Quando ovinos são infectados com *T. gondii* durante a gestação existe a soroconversão da

ovelha e a infecção ou aborto do feto pode vir a ocorrer. Contudo, nas próximas gestações não haverá transmissão vertical, pois a ovelha torna-se resistente à infecção (BUXTON et al., 1998). Vacas infectadas congenitamente por *N. caninum*, que abortaram ou pariram um terneiro infectado, podem transmitir a infecção para o feto em subseqüentes gestações, não necessitando de reinfecções para que ocorra essa transmissão vertical (ANDERSON; ANDRIANARIVO; CONRAD, 2000).

Vacas com histórico de aborto por *N. caninum*, geralmente apresentam abortamento repetitivo em gestações subseqüentes (ANDERSON et al., 1995; WOUDA; MOEN; SCHUKKEN, 1998) ou podem parir terneiros infectados congenitamente, que são uma importante forma de manutenção da doença dentro do rebanho (BARR et al., 1993; ANDERSON; ANDRIANARIVO; CONRAD, 2000). A existência de abortos repetidos indica que a imunidade ou resistência adquirida em vacas infectadas naturalmente, em alguns casos, não é suficiente para prevenir a infecção fetal durante as gestações subseqüentes (VENTURINI et al., 1999).

Vacas soropositivas para *N. caninum* tem maior chance de abortar do que as soronegativas. Em alguns estudos, o risco de aborto entre animais soropositivos foi de 2 a 3,5 vezes maior do que dos animais soronegativos (PARÉ; THURMOND; HIETALA, 1997; WOUDA; MOEN; SCHUKKEN, 1998; DAVISON; OTTER; TRESS, 1999a). Moore (2005), constatou alta co-relação entre anticorpos para *N. caninum* a rebanhos com histórico de abortamentos.

Thurmand e Hietala (1997), observaram que o risco de aborto em novilhas infectadas congenitamente foi 7,4 vezes maior do que em novilhas soronegativas, porém o risco diminuiu significativamente com as gestações subseqüentes.

Romero et al. (2002) e Dijkstra et al. (2003), encontraram um decréscimo nas taxas de infecção congênita com o aumento do número de partições de uma mesma fêmea, sugerindo que bovinos, eventualmente, podem desenvolver um grau de imunidade que previne a transmissão transplacentária endógena.

O aumento dos níveis de anticorpos, observado durante a prenhez, decorrente da modulação da resposta imune da mãe, é um forte indicativo de que ocorra reativação da infecção em vacas cronicamente infectadas, ou seja, os bradizoítos são reativados, diferenciam-se em taquizoítos (estágio infectante)

rompendo os cistos teciduais e reagudizando a infecção (STENLUND et al., 1999; INNES et al., 2002; SCHETTERS et al., 2004).

Fêmeas consideradas de risco são definidas diferentemente dentro de rebanhos com histórico de abortamento endêmico e epidêmico. No caso de rebanhos endêmicos essas fêmeas são aquelas que estiveram prenhes durante o período de tempo em que ocorreram os abortos, isto é, nos meses ou anos envolvidos. Em rebanhos epidêmicos estas fêmeas são definidas como aquelas que estavam prenhes, com 58 a 260 dias de gestação quando o surto ocorreu (DUBEY; SCHARES, 2006). Segundo os autores essa definição diferenciada implica no resultado dos testes sorológicos quando aplicados a fêmeas de risco. Fêmeas pertencentes a rebanhos endêmicos, têm maiores níveis de anticorpos, quando comparadas às pertencentes aos rebanhos epidêmicos (infectadas recentemente), que não desenvolveram completamente a sua resposta imunológica e possuem baixos níveis de anticorpos.

Kyaw et al. (2004), relataram que os títulos de anticorpos para *N. caninum* em vacas cronicamente infectadas podem converter-se em “status” negativo no momento do parto.

Conrad et al. (1993) e Stenlud et al. (1999), observaram um aumento nos níveis de anticorpos em vacas infectadas durante o quarto e quinto mês de gestação. Também observaram que estes níveis de anticorpos decaíram três a quatro meses após estes animais abortarem fetos infectados por *N. caninum*.

Williams et al. (2000), infectaram vacas através de inoculação endovenosa de *N. caninum* em diferentes momentos antes e durante a gestação. Cinco das seis vacas que estavam no primeiro terço da gestação, tiveram reabsorção embrionária, três semanas após a inoculação. Todas as vacas que foram inoculadas no terço final da gestação pariram terneiros clinicamente saudáveis, mas congenitamente infectados. Já as vacas inoculadas sete semanas antes da prenhez, pariram terneiros clinicamente saudáveis e sem evidências de infecção transplacentária pelo *N. caninum*.

Devido ao fato de *N. caninum* ser um protozoário intracelular obrigatório, a principal resposta imune protetora contra a infecção por este parasito é mediada por células, associadas a linfócitos T helper tipo 1, que estimulam a produção de gama interferon (INF γ), interleucinas (IL-2 e 12) (INNES et al., 2002). Durante a gestação,

o aumento na concentração de IL-10 que regula (diminui) a produção de INF_{γ} , gera uma diminuição na resposta imune entre o quarto e sexto mês de prenhez, favorecendo, desta maneira, a multiplicação e transmissão vertical do parasito (WILLIAMS et al., 2003; MOORE, 2005).

No terço médio da gestação, o feto possui uma resposta imune rudimentar, evidenciada pela presença de anticorpos no soro de fetos abortados. Na maioria dos casos esta resposta é insuficiente, explicando o motivo pelo qual, a maioria dos abortos ocorre neste período (BUXTON; McALLISTER; DUBEY, 2002; MALEY et al., 2003).

Barling et al. (2001a), encontraram associação entre soropositividade e desempenho no crescimento de terneiros após o desmame. Estes dados reforçam a hipótese de reagudização da infecção com possível liberação intermitente de taquizoítos de *N. caninum* durante condições estressantes.

Em bovinos do mundo inteiro a neosporose é considerada uma das principais doenças reprodutivas, sendo o aborto o principal sinal clínico da infecção nesta espécie (ANDERSON; ADRIANARIVO; CONRAD, 2000). Fêmeas bovinas não prenhes foram infectadas experimentalmente com *N. caninum* e não desenvolveram nenhum sinal clínico de neosporose. O estudo da resposta imunológica demonstrou uma proliferação periférica das células mononucleares em resposta ao antígeno do parasito e produção de gama interferon ($IFN-\gamma$) (MARKS et al., 1998; INNES et al., 2001).

Para que ocorra aborto, o feto ou a placenta devem ser “danificados”, e, conseqüentemente sua viabilidade será diminuída. Vários fatores podem influenciar para que isso ocorra. Defeitos na placenta podem ser resultantes de comprometimentos diretos de sobrevivência fetal ou pela liberação de prostaglandinas maternas que causam luteólise e aborto. Defeitos no feto podem ocorrer pela destruição primária dos tecidos fetais durante a multiplicação do parasito ou pela nutrição e oxigenação insuficientes, secundárias à destruição placentária (ENGELAND et al., 1996; MALEY et al., 2003).

O aborto pode ocorrer do terceiro ao último mês de prenhez, mas é mais comum ocorrer entre o quarto e o sexto mês (CONRAD et al., 1993).

Os fetos abortados infectados com *N. caninum* são geralmente autolíticos, sem lesões macroscópicas consideráveis e não ocorre retenção de placenta. As principais lesões são produzidas no sistema nervoso central (SNC), onde se evidencia uma encefalite. Microscopicamente apresentam infiltrações celulares e áreas de necrose em muitos tecidos (LINDSAY; DUBEY, 1993; WOUDA; DUBEY; JEKINS, 1997; DUBEY, 2003).

Lesões inflamatórias degenerativas, causadas pela infecção por *N. caninum* em fetos abortados ou natimortos, podem ser encontradas na maioria dos tecidos fetais, mas são mais comuns no SNC, coração e fígado (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006).

Na placenta, as lesões são tipicamente localizadas nos cotilédones e consistem de área focal de necrose e inflamação não supurativa, com taquizoítos presentes nos trofoblastos (BERGERON et al., 2001; DUBEY; SCHARES, 2006).

Maley et al. (2003), demonstraram, por infecção experimental em vacas prenhes, que a severidade e a extensão das lesões vão determinar a morte fetal e o aborto. Segundo Innes et al. (2005), as lesões associadas ao *N. caninum* no cérebro e coração dos fetos bovinos abortados, são bastante severas e podem causar sua morte. Estes autores sugerem que a infecção pelo *N. caninum* desencadeie a liberação de citocinas pró-inflamatórias, e que em alguns casos, o feto pode não morrer diretamente por causa da neosporose, associada à gravidade das lesões, e sim por alterações imunológicas na interface materno-fetal, que consequentemente afeta diretamente a liberação de citocinas T helper-1, que são responsáveis pela resposta imune nesse local e que é fundamental para manter a gestação.

Até o momento não está bem esclarecido se a intensidade dos sinais clínicos está relacionada com a patogenicidade da cepa do *N. caninum* ou de fatores inerentes ao hospedeiro (PETERS et al., 2001).

Nos terneiros, os sinais clínicos são mais aparentes dentro dos primeiros cinco dias de vida, mas em alguns casos podem ser observados até duas semanas após o nascimento. Esses animais podem nascer débeis, com baixo peso, membros posteriores e anteriores hiperextendidos ou flexionados, diminuição do reflexo patelar, ataxia, perda da propriocepção, exoftalmia ou assimetria dos olhos e

ocasionalmente defeitos congênitos, incluindo hidrocefalia e estreitamento do canal medular (PARISH et al., 1987; DUBEY, 2003; DE MEERSCHMAN et al., 2005).

É provável que a maioria dos terneiros com neosporose clínica, morra dentro das quatro primeiras semanas de vida, não existindo nenhum relato de sinais clínicos ou lesões histológicas em animais maiores de quatro meses de idade (DUBEY, 2003; DUBEY; SCHARES, 2006). O diagnóstico histológico em terneiros com sinais clínicos é bastante raro, por existirem poucos casos de infecções congênitas que resultem nessa forma clínica. De Meerschman et al. (2005), ao examinarem seis terneiros com sinais clínicos compatíveis com infecção por *N. caninum*, encontraram encefalite como lesão predominante em apenas um dos terneiros.

3.5 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Para estabelecer a relação entre causa-efeito, é importante utilizar um diagnóstico apropriado através de técnicas sorológicas, imunohistoquímica e outros métodos para demonstrar a infecção na mãe e no feto abortado (DUBEY; SCHARES, 2006). Além disso, é importante encontrar e identificar taquizoítos de *N. caninum* nas lesões, excluindo outras possíveis causas de aborto (WOUDA; DUBEY; JEKINS, 1997). Provas soropositivas para *N. caninum*, indicam somente a exposição ao agente (WILLIAMS et al., 2000).

Testes sorológicos são utilizados para diagnosticar *N. caninum* como possível causa de abortamento, na seleção de bovinos para compra e venda, para prevenir a introdução de novos animais infectados no rebanho e na verificação da prevalência de determinada região (WILLIAMS et al., 2000; BAILLARGEON et al., 2001). Estes são melhor utilizados na detecção de bovinos infectados dentro do rebanho, do que como um diagnóstico individual de um animal que abortou (BJORKMAN, 1999; ANDERSON; ANDRIANARIVO; CONRAD, 2000). Como vantagem, apresenta a utilização no *ante mortem* e o fornecimento de informações sobre o estágio da infecção (DE MAREZ et al., 1999; WILLIAMS et al., 2000).

Sager et al. (2001), sugeriram que os valores de testes sorológicos podem sofrer interferências pela instabilidade no estado reativo dos anticorpos para *N. caninum* em bovinos adultos.

Nem sempre é possível estabelecer uma comparação entre os estudos sorológicos para *N. caninum* em bovinos, devido principalmente ao uso de diferentes técnicas sorológicas e/ou pontos de corte na titulação dos anticorpos. A seleção de um ponto de corte apropriado é um dos pontos críticos para alguns métodos sorológicos usados para neosporose bovina, uma vez que não existe um padrão ouro apropriado para definir um positivo-verdadeiro ou um falso-negativo (DUBEY; SCHARES, 2006).

Existem vários testes sorológicos utilizados na detecção de anticorpos para *N. caninum*, incluindo a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (DUBEY et al., 1988); o teste de aglutinação direta (NAT) (ROMAND; THULLIEZ; DUBEY, 1998); vários ensaios imunoenzimáticos em fase sólida (ELISA) (DUBEY; LINDSAY, 1996) e Western-Blotting (BJERKAS; MOHN; PRESTHUS, 1984). Todas estas técnicas são baseadas em antígenos de taquizoítos. RIFI e NAT utilizam taquizoítos de *N. caninum* fixados. Ambas as técnicas detectam anticorpos de superfície de taquizoítos, originários de antígenos neospora-específicos, como demonstrados pelos anticorpos monoclonais espécie-específicos desenvolvidos contra antígenos de membrana de taquizoítos (HOWE et al., 1998; SCHARES et al., 1999).

3.5.1 Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI)

Dubey et al. (1988) nos EUA, desenvolveram uma RIFI para *N. caninum* a partir de taquizoítos isolados em cultivo celular de tecidos de filhotes de cães (isolado NC-1).

Esta técnica é baseada no princípio da fixação de taquizoítos íntegros em lâminas, que são incubadas com o soro diluído, a ser testado, e, posteriormente, com anticorpos, marcados com fluoresceína, contra imunoglobulinas da espécie animal a ser investigada. A reação é observada em microscópio de fluorescência onde é avaliada a fluorescência periférica do parasito completa (resultado positivo) ou incompleta (negativo) (PARÉ; HIETALA; THURMOND, 1995).

É o método sorológico mais utilizado, e, embora outras técnicas como ELISA e NAT, ambas com elevada especificidade e sensibilidade, possam ser utilizadas, a RIFI é considerado referência para detecção de anticorpos específicos (RAGOZO et al., 2003).

Estudos realizados em diversas espécies animais têm demonstrado que a RIFI apresenta uma baixa reatividade cruzada com outros protozoários, consequência de características da técnica, como preservação da morfologia do parasito e detecção de antígenos de membrana. Estes fatos fazem da RIFI a prova sorológica de referência para a detecção de anticorpos para *N. caninum* (DUBEY, 2003).

Guimarães Junior et al. (2004), compararam RIFI e o NAT em amostras de soros bovinos da região norte do Estado do Paraná, encontrando valores de prevalências de 21,54 e 12,1% respectivamente.

Na RIFI, os títulos são muito dependentes da qualidade do equipamento usado, como o microscópio de fluorescência, tornando impossível padronizar o resultado do teste ou o ponto de corte, em diferentes laboratórios (MOORE, 2005; McALLISTER et al., 2005; DUBEY; SCHARES, 2006).

3.5.2 Teste de Aglutinação (NAT)

Romand; Thulliez e Dubey (1998), desenvolveram e avaliaram o primeiro NAT para *N. caninum*, utilizando soros de vacas e cães naturalmente infectados e de coelhos, ratos e ovinos experimentalmente infectados com taquizoítos ou oocistos deste parasito. Estes mesmos soros foram previamente testados pela RIFI e quando comparados os resultados do NAT houve boa concordância ($p < 0,0001$).

Uma das vantagens desta técnica em relação aos outros métodos sorológicos é de não necessitar de conjugados espécie-específicos, além do baixo custo de realização, e de sua sensibilidade ser comparável à da RIFI.

Packham et al. (1998), desenvolveram e testaram um segundo NAT para *N. caninum* que foi altamente sensível para várias espécies (alta habilidade na triagem de várias espécies animais), mas sua especificidade foi reduzida em soros de animais naturalmente infectados.

Quando os níveis de IgM específica atingem seu pico máximo em duas semanas após a infecção, estes voltam a decair abaixo dos limites detectáveis no NAT, mantendo-se baixos até 4 semanas após a infecção. Após este período os níveis de IgG aumentam e se mantêm de 3 a 6 meses pós-infecção (DE MAREZ et al., 1999).

3.5.3 Ensaio Imuno Enzimático (ELISA)

Testes de ELISA são menos subjetivos quando comparados com RIFI. Vários protocolos e Kits comerciais foram desenvolvidos para detectar anticorpos em soros bovinos, amostras individuais de pool de leite e ou colostro (SCHARES; BARWALD; CONRATHS, 2005).

Como principais protocolos pode-se citar: ELISA sandwich, Iscom-ELISA, ELISA competitivo e ELISA de avidéz (BJORKAMN et al., 1997; SCHARES; BARWALD; CONRATHS, 2005; BARTELS, 2005). No Brasil, a maioria dos laboratórios utilizam Kits comerciais para ELISA.

O teste de ELISA de avidéz é baseado na força com que ocorre a união entre anticorpos e antígenos de *N. caninum* (avidéz) que aumenta gradativamente após a infecção (BJORKMAN et al., 2005). Este teste, que mede a avidéz de IgGs específicas para *N. caninum* é também eficaz na diferenciação de infecções recentes dentro do rebanho (IgG de baixa avidéz). A interpretação de resultados de testes individuais do ELISA de avidéz deve ser feito criteriosamente, pois alguns animais podem manter uma baixa avidéz na resposta imunológica por vários anos (BJORKMAN et al., 2003). Esta técnica também pode ser utilizada em levantamentos epidemiológicos (DUBEY; SCHARES, 2006).

Em caso de rebanhos com histórico de aborto epidêmicos ou endêmicos, com ocorrência no último trimestre da gestação e em fêmeas consideradas de risco, não devem ser utilizados métodos diagnósticos de baixa sensibilidade na detecção de anticorpos para *N. caninum*, pois pode implicar em resultado falso negativo (SCHARES et al., 2000; DUBEY; SCHARES, 2006). Nestes casos, torna-se necessário realizar análises complementares para identificar a rota principal de infecção no rebanho. Para este propósito o teste de ELISA de avidéz é muito útil (SCHARES et al., 2000; BJORKMAN et al., 2003) uma vez que a presença de anticorpos específicos de baixa avidéz indica infecção recente enquanto que os de alta avidéz indicam infecções crônicas.

3.5.4 Western-Blotting

Dependendo dos valores do ponto de corte adotados, esta técnica é muito específica e de alta sensibilidade, inclusive para detectar anticorpos para *N. caninum* em amostras de soro fetal (ALVAREZ-GARCÍA et al., 2002). Vários estudos têm indicado baixa sensibilidade quando o soro fetal é analisado por RIFI ou ELISA (WOUDA et al., 1997; SCHOCK et al., 2000; ALVAREZ-GARCÍA et al., 2002). Essa baixa sensibilidade pode estar relacionada com a imunocompetência fetal, especialmente em fetos menores de seis meses de idade e com curto intervalo de tempo entre a infecção e a morte fetal (WOUDA et al., 1997).

Existem diferentes antígenos imunodominantes, específicos para *N. caninum*, que foram identificados com peso molecular de 19, 29, 30, 33 e 37 KDa (ATKINSON et al., 2000).

3.5.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O PCR é utilizado em diagnósticos e estudos epidemiológicos de neosporose para detecção do DNA de *N. caninum* em tecidos de fetos bovinos abortados ou de outros hospedeiros intermediários, líquido amniótico e cefalorraquidiano, placenta, leite, amostras de fezes de cães e coiotes, comida e água (HO et al., 1997; BUXTON et al., 2001; PETERS et al., 2001; HILL et al., 2001; GONDIN et al., 2004; SCHARES; BARWALD; CONRATHS, 2005).

As desvantagens desta técnica são o custo, tempo, equipamento e necessidade de mão-de-obra especializada para sua execução (ESTILL et al., 1998).

Fatores que podem influenciar negativamente na sensibilidade e especificidade do diagnóstico por PCR, são facilmente controlados (HOORFAR et al., 2004). Não existem relatos de quanto à autólise dos tecidos pode influenciar na sensibilidade do PCR específico para *N. caninum* (DUBEY; SCHARES, 2006).

Ferre et al. (2005), identificaram fragmentos de DNA de *N. caninum* em amostras sanguínea de bovinos cronicamente infectados e no sêmen de touros naturalmente infectados.

Vários estudos indicam que o tecido cerebral é mais apropriado para detecção do DNA de *N. caninum* por PCR, seguidos de coração, pulmão e fígado (BUXTON et al., 1998; COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2005).

É importante salientar que a carga parasitária pode ser influenciada pelo estágio gestacional. Collantes-Fernández et al. (2005) ao avaliarem fetos bovinos abortados no último trimestre de gestação, detectaram DNA do parasito apenas no cérebro e esporadicamente no diafragma, coração e linfonodos.

Outros protocolos de PCR quantitativo foram desenvolvidos, sendo considerada uma das principais técnicas para a determinação da patogênese da neosporose bovina, atividade vacinal e eficácia de drogas terapêuticas e profiláticas para este protozoário (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2005). Nested-PCR também são utilizados em estudos de epidemiologia e patogênese de neosporose bovina (BUXTON et al., 1998; BUXTON et al., 2001; TREES et al., 2002; FERRE et al., 2005).

Estudos recentes estabeleceram um PCR para detectar DNA de *N. caninum* em cortes histológicos, através dos *primers* Np6 e Np21 (DUBEY; SCHARES, 2006). Esta técnica, quando aplicada em tecido cerebral de cães naturalmente infectados, se mostrou hábil para detectar 25 taquizoítos em 5mg da amostra.

3.5.6 Exame histopatológico e Imunohistoquímica (IH)

O exame histopatológico de um feto abortado permite realizar o diagnóstico definitivo de neosporose. Para estabelecer este tipo de diagnóstico, deve-se considerar as lesões características de um feto, encontrar o parasito nas lesões e avaliar em conjunto a sorologia materna e fetal (INNES et al., 2002; DUBEY, 2003).

Devido à alta eficiência com que a infecção pelo *N. caninum* é transmitida nos bovinos verticalmente, a identificação desta infecção apenas no feto é um indicador conclusivo da causa de aborto (TREES et al., 1999).

Taquizoítos são raramente observados em cortes histológicos corados pela Hematoxilina e Eosina, sendo que a técnica de imunohistoquímica facilita sua visualização (DUBEY; SCHARES, 2006).

A semelhança estrutural de alguns cistos e ao fato de taquizoítos de *N. caninum* e *T. gondii* serem idênticos ao microscópio óptico a confirmação do diagnóstico de neosporose deve ser feita através da imunohistoquímica. O desenvolvimento da técnica de imunohistoquímica permitiu uma específica identificação do *N. caninum* em tecidos fixados em formalina, sendo possível o diagnóstico da infecção deste protozoário em uma grande variedade de espécies animais, podendo ser utilizado anticorpos mono ou policlonais (LINDSAY; DUBEY, 1989).

Através da imunohistoquímica, *N. caninum* é mais frequentemente demonstrado no cérebro e coração, raramente em outros órgãos, incluindo a placenta (DUBEY; SCHARES, 2006).

3.5.7 Ensaio biológico

O bioensaio é um método utilizado para isolar *N. caninum* viável dos tecidos do hospedeiro e posterior inoculação em camundongos, Knockout (GKO) ou BALB/c para obtenção de clones do parasito que são mantidos em cultivo celular (DUBEY e SCHARES, 2006). Camundongos imunossuprimidos são mais eficientes quando comparados ao cultivo celular na obtenção de *N. caninum* viáveis (DUBEY et al., 1998).

Camundongos da linhagem BALB/c são mais suscetíveis à infecção por *N. caninum* do que outros roedores. Gerbil da mongólia (*Meriones unguiculatus*) também é suscetível à infecção por *N. caninum*, mas estes animais são menos utilizados porque o parasito pode desaparecer espontaneamente do seu organismo (DUBEY; LINDSAY, 1996; GONDIM et al., 1999; DUBEY et al., 2004).

Embora o bioensaio seja um método bastante utilizado, não têm apresentado muito sucesso, talvez porque as fases do parasito não sejam resistentes ao processo de autólise dos tecidos (DUBEY et al., 1998; DUBEY et al., 2004; DUBEY; SCHARES, 2006).

O poder infectivo dos bradizoítos de *N. caninum* em cultivo celular ou em camundongos pode ser mais baixo quando comparados com taquizoítos (DUBEY et al., 2004).

3.6 TRATAMENTO

Até o momento não existe nenhum tratamento eficaz para neosporose bovina, ou que possam prevenir a transmissão vertical do parasito nesta espécie (ANDERSON; ANDRIANARIVO; CONRAD, 2000; DUBEY, 2003).

Experimentos realizados em camundongos infectados com *N. caninum*, evidenciaram que o uso de anticoccidianos, como toltrazuril e ponazuril, previnem a formação de lesões no SNC e diminuem a detecção do DNA deste parasito por PCR em 95% dos casos (DUBEY, 2003)

Estudos prévios *in vitro* demonstraram que o tratamento com gama interferon (IFN- γ) recombinante, inibe significativamente a multiplicação de *N. caninum* (INNES et al., 1995).

3.7 CONTROLE E PROFILAXIA

As estratégias de controle e prevenção da neosporose bovina estão basicamente focalizadas em programas para reduzir o número de animais congenitamente infectados no rebanho e de minimizar a oportunidade de infecção pós-natal através do ambiente (ANDERSON; ANDRIANARIVO; CONRAD, 2000).

No caso de infecção horizontal o controle deve buscar o bloqueio da transmissão entre cães e bovinos. O controle deve ser feito através de medidas como não utilizar água e ou alimentos contaminados com fezes de canídeos, não fornecer carne crua para estes animais, dando preferência para alimentos como concentrados comerciais, não facilitar o livre acesso destes canídeos aos restos e envoltórios fetais, dar destino adequado às carcaças de bovinos mortos (de qualquer idade). Este conjunto de medidas pode ser de grande valia para reduzir a incidência de aborto nos rebanhos bovinos (McALLISTER et al., 1998; ATKINSON et al., 2000).

A eliminação gradual (abate) de vacas com histórico de abortos repetidos e ou soropositivas para *N. caninum* deve ser adotada como uma medida de controle da doença no rebanho, pelo fato de que estes animais têm uma maior probabilidade de infectar sua progênie (ANDERSON; ANDRIANARIVO; CONRAD, 2000). O “status” sorológico do rebanho pode ser usado como critério de descarte de fêmeas bovinas, bem como, a não utilização de terneiras infectadas pelo *N. caninum* para

reposição no rebanho, são estratégias que quando tomadas em conjunto, podem diminuir o risco futuro de aborto nos rebanhos leiteiros (MOEN et al., 1998; BJORKMAN et al., 1996; THURMOND; HIETALA, 1997; HOBSON et al., 2005).

A transferência de embriões para receptoras soronegativas, utilizando o procedimento definido pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) em bovinos, é recomendada como método de controle da transmissão transplacentária endógena de *N. caninum* (BAILLARGEON et al., 2001).

Williams et al. (2000), sugerem como prevenção de abortamento em fêmeas bovinas que foram infectadas congenitamente por *N. caninum*, desafio com taquizoítos na décima semana de gestação.

Estudos indicam que a vacina para neosporose bovina, tem capacidade de reduzir a incidência de abortos, porém não gera proteção contra a transmissão vertical do parasito (ROMERO et al., 2004).

A vacina para neosporose bovina, é produzida a partir de cultura *in vitro* de taquizoítos inativados e um adjuvante comercial. Induz altos níveis de anticorpos contra o parasito e foi demonstrado ser segura (CHOROMANSKI; BLOCK, 2000). É utilizada em vários países como EUA, Costa Rica, Brasil e Nova Zelândia (ROMERO et al., 2004). Uma das desvantagens após a utilização da vacina é a dificuldade na interpretação dos resultados sorológicos do rebanho (DUBEY; SCHERES, 2006).

Moore et al. (2005), relataram o uso experimental em bovinos na Argentina, de uma vacina não comercial, com a mesma formulação da vacina comercial. Os animais inoculados com essa vacina desenvolveram altos níveis de anticorpos, que foram semelhantes aos desenvolvidos por bovinos naturalmente infectados com *N. caninum*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREA ESTUDADA

A região onde as amostras foram coletadas compreende os municípios de Pelotas, Arroio do Padre, Turuçu e Morro Redondo (Fig. 2), e está localizada no sul do Rio Grande do Sul, entre os paralelos 31° 21' e 32° S, e os meridianos 52° 05' e 52° 42' W, com altitude variando de 7 a 247m acima do nível do mar. Nesta região o clima é temperado úmido, com ocorrências de secas não muito intensas no verão. Apresenta quatro estações bem definidas: verão, primavera, outono e inverno, com temperatura média anual 17,6 °C e umidade relativa entre 70 e 85% (EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, 2006).



Figura 2 - Distribuição geográfica dos municípios estudados, na região sul do Estado do Rio Grande do Sul: Pelotas (1); Turuçu (2); Morro Redondo (3); Arroio do Padre (4).

A região é caracterizada pela agricultura familiar, minifundiária, onde 73,7% das propriedades possuem área inferior a 20 ha e rebanho bovino de até 15 animais. Os municípios estudados fazem parte da maior bacia leiteira do Rio Grande do Sul, sendo a bovinocultura leiteira o grande destaque na pecuária. A economia regional é sustentada na agropecuária e na agroindústria, tendo como principais lavouras: arroz, feijão, milho, soja, batata inglesa, cebola e pêssego e, como principais atividades pecuárias: bovinocultura leiteira, suinocultura e ovinoculturas. No setor industrial predominam os produtos alimentares, minerais e madeira.

Segundo dados da Divisão de Fiscalização e Defesa Sanitária Animal da Secretária da Agricultura e Abastecimento de Pelotas, RS, a região estudada, no ano de 2005, possuía um rebanho bovino de exploração leiteira, de 24763 animais, distribuídos em 1814 propriedades. A distribuição de propriedades e do rebanho leiteiro, por município estudado, encontra-se na tab. 3.

Tabela 3 – Número de propriedades e de bovinos de exploração leiteira, nos municípios da região de Pelotas, RS (SAA, 2005).

MUNICÍPIO	Nº PROPRIEDADES LEITEIRAS	Nº DE BOVINOS
Pelotas	1404	20608
Turuçu	65	463
Arroio do Padre	307	2876
Morro Redondo	38	816
Total	1814	24763

4.2 PROCEDIMENTOS DE AMOSTRAGEM

O número de propriedades/município a serem avaliados para obter uma amostra representativa da prevalência de anticorpos para *Neospora caninum* foi determinado através do programa Epi-Info 6.04, com prevalência estimada de 50%, precisão de 10% e nível de confiança de 95%. Do total de 1814 propriedades, segundo o programa, deveriam ser analisadas, no mínimo, 92 propriedades (72 em Pelotas, 15 no Arroio do Padre, 3 em Turuçu e 2 em Morro Redondo).

Em cada município, foi feita uma seleção aleatória simples das propriedades, previamente numeradas de 1 a n (Epi-Info 6,04). Caso não fosse

possível realizar a coleta na propriedade sorteada, esta era substituída por outra, próxima e com as mesmas características da anterior.

Para evitar a interferência de anticorpos colostrais, foram coletadas fêmeas bovinas com idade superior a seis meses. Estas fêmeas foram categorizadas de acordo com a faixa etária nos seguintes estratos: de 6 a 12 meses, 13 a 24 meses e maiores de 24 meses.

O número de animais a serem coletados em cada propriedade foi também calculado através do programa Epi-Info, levando em conta o número máximo e o mínimo de fêmeas existentes nas propriedades a serem estudadas (tab. 4).

Tabela 4 – Número de fêmeas coletadas por propriedade, segundo o tamanho do rebanho leiteiro (Epi-Info 6.04).

TOTAL DE FÊMEAS NA PROPRIEDADE	NÚMERO DE FÊMEAS COLETADAS
até 10	10
11-20	17
21-30	24
31-40	29
41-50	34
51-100	50
mais de 100	60

Para minimizar um possível efeito do tamanho dos rebanhos na ocorrência da doença, optou-se por estratificar as propriedades em três grupos, de acordo com o número médio de animais de produção leiteira, tendo sido obtidas as categorias: I (até 15 animais), II (16 a 50 animais) e III (mais que 50 animais). Esta escolha foi realizada com base nos dados obtidos junto a Secretária da Agricultura e Abastecimento de Pelotas, de acordo com a distribuição do rebanho bovino nas propriedades da região, por município, sendo obedecida à representatividade de cada categoria de propriedade, na formação da amostra do município.

4.3 COLETA DE SANGUE E DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Foram coletadas amostras sanguíneas de 1046 bovinos, em 92 propriedades da região. As coletas foram realizadas durante os meses de maio a outubro de 2006. As amostras foram coletadas da veia coccígea dos bovinos com auxílio de tubos vacutainer devidamente identificados. Posteriormente, foram

levadas ao Laboratório de Parasitologia da UFPel onde, após completarem o processo de formação do coágulo, foram centrifugadas durante 10 minutos a 3600rpm. O soro separado foi estocado em frascos plásticos de 1,5ml a -20°C, até a realização dos testes sorológicos.

No dia da coleta foi aplicado um questionário ao responsável pela propriedade (Apêndice 1). O questionário abordou aspectos epidemiológicos ligados ao agente, sistema de manejo, tamanho do rebanho, histórico de aborto na propriedade (relatado pelo proprietário), alimentação dos bovinos, presença de cães e outros animais domésticos e silvestres, esquema de vacinação, histórico de nascimento de terneiros com sinais clínicos compatíveis com neosporose. Os dados foram armazenados em planilhas eletrônicas (Microsoft Office Excel 2003) para posterior análise através dos programas Epi-Info 6.04 e Statistix 8.0.

Durante a visita às propriedades, foram coletadas amostras sanguíneas de cães que estavam presentes e possuíam algum tipo de contato com os bovinos, para posterior correlação com os resultados obtidos. A análise sorológica (RIFI, ponte de corte 1:50) desses cães faz parte de outro projeto de pesquisa e os resultados foram cedidos pelo colega Nilton Azevedo da Cunha Filho. Foram coletados 128 cães, num total de 67 propriedades.

4.4 TESTES SOROLÓGICOS

As amostras de soro foram analisadas no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP), pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), a fim de determinar a presença de anticorpos para *N. caninum*, segundo Dubey et al. (1988).

Foram utilizadas lâminas de vidro sensibilizadas com taquizoítos (concentração de 10^7 taquizoítos/ml) do isolado NC-1 de *N. caninum*, obtidos através de cultivo celular (de monócitos bovinos) e mantidas em caixas de polipropileno a -20°C até o momento do uso. Antes de serem usadas, as lâminas foram retiradas do congelador e secas à temperatura ambiente; amostras de 20µl de soro diluído (solução de diluição: Na_2HPO_4 ; NaH_2PO_4 ; NaCl, Soro Albumina bovina e água destilada) foram adicionados a cada pocinho da lâmina, que foi incubada em câmara

úmida, a 37°C por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com solução tampão carbonada pH 9,0 (NaCO₃; NaHCO₃; NaCl e água destilada) três vezes, por 5 minutos cada. Após esta etapa, as lâminas foram secas à temperatura ambiente e em cada pocinho foi adicionado uma alíquota de 20µl de solução contendo anti-IgG bovino marcado com isoticianato de fluoresceína (SIGMA F-7887), diluída em PBS (PBS + azul de evans) a 1:4000. Foi então repetido o procedimento inicial de incubação e lavagem das lâminas, como descrito anteriormente. Após as lâminas secas à temperatura ambiente, foram montadas com lamínula e glicerina tamponada pH 8,0 (90% glicerol+ 10% PBS) e examinadas ao microscópio de imunofluorescência (OLYMPUS, modelo BX-FLA), utilizando a objetiva de 40 vezes.

Inicialmente foi realizada uma triagem dos soros com ponto de corte de 1:100. Reações, a partir desta diluição, que apresentavam taquizoítos com fluorescência periférica total, foram consideradas positivas. Todas as amostras positivas foram retestadas em diluições seriadas a partir de 1:100, a fim de determinar a titulação de anticorpos, indicada pela maior diluição que apresentou fluorescência periférica completa. Soro controle positivo e negativo, provenientes do banco de soro do Laboratório de Doenças Parasitárias da USP, foram incluídos em cada lâmina.

4.5 DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA E ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estimativa de soroprevalência foi calculada entre o número de resultados positivos e o número total de testes realizados, acompanhada do respectivo intervalo de confiança de 95%. As proporções de animais soropositivos dentro das suas respectivas faixas etárias foram comparadas através do teste de Qui-quadrado. Essa análise inicial foi realizada no programa Epi-Info 6.04.

A associação entre os potenciais fatores de risco e a soroprevalência nas propriedades (variável dependente) foi construída através do modelo de regressão logística, com auxílio do programa Statistix 8.0. A análise foi realizada em duas etapas: inicialmente utilizou-se o teste de Qui-quadrado (análise univariada), onde as variáveis pré-selecionadas, que obtiveram um valor de $P \leq 0,25$, foram examinadas, e seu potencial de colinearidade testado, para posterior inclusão no modelo multivariado (regressão logística), que constituiu a segunda etapa da

análise. As variáveis foram primeiramente examinadas, com base na resposta e frequência de resposta, ou seja, variáveis com valor zero foram excluídas do modelo inicial (análise univariada).

Em ambas as etapas foram utilizadas variáveis dicotômicas que assumiam valor 1 se o animal tinha resultado do teste positivo para anticorpos para *N. caninum*, ou se esta variável era considerada de risco para neosporose bovina, e 0, se o resultado fosse negativo e a variável não representasse um risco aparente para a enfermidade.

Valores de $P < 0,05$ e OR $\neq$ de 1 para um intervalo de confiança (IC) de 95% foram considerados indicativo de uma associação significativa entre as variáveis.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DAS PROPRIEDADES E DO REBANHO ESTUDADO

A distribuição das propriedades estudadas, quanto às características de infra-estrutura e manejo, encontra-se na tab. 5.

A maioria das propriedades pertence à categoria I (70,7%), e tem área inferior 20 ha (58,6%). A área variou de 1/4 a 800 ha.

Quanto à raça, 48,9% (45) das propriedades, criavam bovinos provenientes de cruzamentos raciais, seguidos de 30,4% (28) da raça Jersey e 20,7% (19) da raça Holandesa.

A produção leiteira mensal variou de 0 a 32.000 litros, e em 84,8% das propriedades são produzidos menos de 5000 l/mês. Predomina a ordenha manual (55,4%), reprodução somente por monta natural (46,7%), água de fonte natural (91,3%) e o armazenamento dos alimentos em galpões (89,1%).

A caracterização das propriedades, quanto a possíveis fatores de risco para neosporose, encontra-se na tab. 6.

A ocorrência de aborto foi registrada em 51,1% das propriedades e somente em 10,6% delas foi feito diagnóstico específico para neosporose.

Na maioria das propriedades existem cães (94,5%) e/ou canídeos silvestres (37%) em convívio com os bovinos. O número de cães variou de 1 a 11 por propriedade, com média de 3,37. Os cães e outras espécies de animais domésticos têm acesso aos cochos e local de armazenamento do alimento dos bovinos em

96,7% e 87% das propriedades, respectivamente. Além disso, em 79,3% delas os terneiros recebem pool de colostro.

Tabela 5 - Caracterização da infra-estrutura e manejo das propriedades analisadas na região de Pelotas, RS.

VARIÁVEL/CARACTERÍSTICA	N	%
Categoria		
I	65	70,7
II	23	25
III	4	4,3
Área		
até 20 ha	54	58,6
21-50 ha	19	20,7
> 50 ha	19	20,7
Produção		
até 1000l/mês	38	41,3
1001-5000l/mês	40	43,5
> 5000l/mês	14	15,2
Tipo de ordenha		
mecânica	41	44,6
manual	51	55,4
Manejo reprodutivo		
monta natural	43	46,7
inseminação artificial	30	32,6
ambas	19	20,7
Manejo alimentar		
campo natural	88	95,7
pastagem	36	39,1
silagem	41	44,6
concentrado comercial	41	44,6
conc. fabricação caseira	43	46,7
sal mineral	20	21,7
Origem da água		
encanada	8	8,7
fonte natural	84	91,3
Armazenagem de alimentos		
galpão	82	89,1
paio	5	5,4
silo	3	3,3

Tabela 6 – Perfil sanitário das propriedades analisadas na região de Pelotas, RS, quanto a possíveis fatores de risco para neosporose bovina.

CARACTERÍSTICA	N	%
Ocorrência de aborto bovino		
não	45	48,9
sim	47	51,1
Diagnóstico¹	17	36,2
Diagnóstico²	5	10,6
Histórico de aborto bovino repetido		
não	72	78,3
sim	20	21,7
Natimortos ou nascidos c/ sinais neurológicos		
não	70	76,1
sim	22	23,9
Destino dado à carcaça de bovinos		
não recolhe	28	30,4
recolhe	64	69,6
Numero de cães/propriedade		
nenhum	5	5,4
1-5	74	80,4
6-11	13	14,1
Presença de cães soropositivos p/ <i>N. caninum</i>		
sim	18	26,9
não	49	73,1
Presença de canídeos silvestres		
não	58	63
sim	34	37
Utilização de vacinas		
não	6	6,5
aftosa	86	93,5
doenças reprodutivas	13	14,1
mastite	3	3,3
clostridiose	34	37
brucelose	36	39,1
leptospirose	13	14,1
pasteurelose	1	1,1
Utilização de pool de colostro p/ terneiros		
não	19	20,7
sim	73	79,3
Acesso cocho³		
sim	89	96,7
não	3	3,3
Acesso alimento⁴		
sim	80	87
não	12	13

¹diagnóstico etiológico de aborto em bovinos

²diagnóstico específico para *N. caninum* em bovinos que abortaram

³acesso de outros animais aos cochos dos bovinos

⁴acesso de outros animais aos locais de armazenamento da comida dos bovinos

5.2 SOROLOGIA

Foram analisados 1046 soros bovinos provenientes de 92 propriedades de exploração leiteira da região de Pelotas. Anticorpos para *N. caninum* foram encontrados em 126 bovinos (12,04%) distribuídos em 43 (46,7%) propriedades, com títulos variando de 100 a 800 (tab. 7). A porcentagem de fêmeas soropositivas, por propriedade, variou de 2,6 a 100%. A frequência de animais soropositivos, bem como o número de propriedades com pelo menos um animal positivo, segundo o município estudado, encontra-se na tab. 8.

Do total de fêmeas amostradas, 41 pertenciam à categoria etária de 6 a 12 meses, 155 de 13 a 24 meses e 850 com mais de 24 meses. Na Fig. 3 encontra-se a distribuição das fêmeas soropositivas segundo a idade.

Das 67 propriedades em que foi coletado e analisado soro dos cães, 18 (26,9%) tinham pelo menos um cão positivo para *N. caninum*, e 49,3% (33/67) apresentavam bovinos soropositivos para o parasito. Na figura 4 encontra-se a frequência das propriedades estudadas quanto ao resultado sorológico de bovinos e caninos, que conviviam nestes estabelecimentos.

Tabela 7 – Frequência de bovinos soropositivos na região estudada, segundo o título de anticorpos para *N. caninum* por RIFI.

TÍTULO	Nº DE ANIMAIS POSITIVOS	%
100	26	20,6
200	87	69,1
400	10	7,9
800	3	2,4
Total	126	100

Tabela 8 – Distribuição da freqüência de bovinos soropositivos para *N. caninum* (RIFI) segundo o município estudado.

Município	Propriedades			Bovinos		
	Examinadas	Positivas	%	Examinados	Positivos	%
Pelotas	72	34	47,2	777	97	12,5
Arroio do Padre	15	5	33,3	193	13	6,7
Morro Redondo	2	2	100	32	8	25
Turuçu	3	2	66,7	44	8	18,2
Total	92	43	46,7	1046	126	12,04

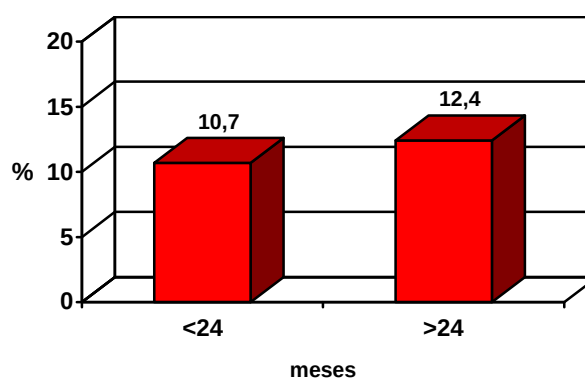


FIGURA 3 – Distribuição de bovinos soropositivos para *N. caninum*, (RIFI) segundo a faixa etária.

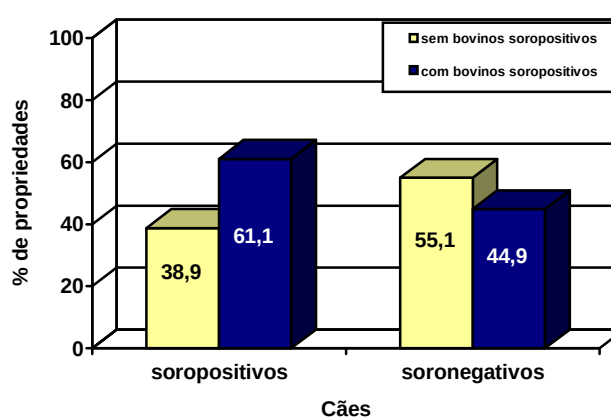


FIGURA 4 – Relação entre a soropositividade (RIFI) para *N. caninum* de bovinos e cães, nas propriedades estudadas na região de Pelotas, RS.

5.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS DA PROPRIEDADE E OS RESULTADOS SOROLÓGICOS

Na tab. 9 encontram-se listadas as variáveis consideradas de risco para neosporose bovina e o resultado do teste sorológico realizado nos animais da região.

Tabela 9 – Distribuição das propriedades com pelo menos um bovino soropositivo, segundo os possíveis fatores de risco para *N. caninum*.

VARIÁVEL INDEPENDENTE	PROPRIEDADE		
	N	POSITIVOS	%
Categoria Propriedade			
I até 15 animais	65	28	43,1
II de 16 a 50 animais	23	13	56,5
III > 50 animais	4	4	100
Área Propriedade			
até 20ha	54	26	48,1
21-50ha	19	7	36,8
>50ha	19	10	52,6
Produção Leiteira			
até 1000l/mês	38	13	52,6
1001-5000l/mês	40	23	57,5
>5000l/mês	14	7	50
Tipo de ordenha			
mecânica	41	22	53,6
manual	51	21	41,2
Manejo reprodutivo			
monta natural	43	17	39,5
inseminação artificial	30	15	50
ambas	19	11	57,9
Ocorrência de aborto bovino			
não	45	20	44,4
sim	47	23	48,9
Histórico de aborto bovino repetido			
não	72	35	48,6
sim	20	8	40
Terneiros³			
não	70	33	47,1
sim	22	10	45,5
Destino dado à carcaça de bovinos			
não recolhe	28	17	60,7
recolhe	64	26	40,6
Raça			
Jersey	28	16	57,1
Holandês	19	8	42,1
cruzamento	45	19	42,2
Numero de cães/propriedade			
nenhum	5	2	40
1-5	74	33	44,6
6-11	13	8	61,5

VARIÁVEL INDEPENDENTE	PROPRIEDADES		
	N	POSITIVOS	%
Presença de canídeos silvestres			
não	58	30	51,7
sim	34	13	38,2
Utilização de pool de colostro p/ terneiros			
não	19	9	47,4
sim	73	34	46,6
Acesso alimento¹			
não	12	1	8,3
sim	80	42	52,5
Acesso cocho²			
não	3	1	33,3
sim	89	42	47,2
Tipo de alimento dos bovinos			
campo natural	88	40	45,5
pastagem cultivada	36	19	52,8
concentrado comercial	43	23	53,5
concentrado fabricação caseira	41	15	36,6
silagem	41	21	51,2

¹ acesso de outros animais ao local de armazenamento da comida dos bovinos

² acesso de outros animais ao cocho dos bovinos

³ terneiros natimortos ou nascidos com algum tipo de sinal neurológico

As variáveis que foram utilizadas no modelo de regressão logística (que apresentaram valor de $P \leq 0,25$ na análise univariada) correspondem somente à frequência de resposta observada nas propriedades das categorias I e II. Nove variáveis foram utilizadas na análise multivariada: produção leiteira mensal, raça, número de cães/propriedade, manejo reprodutivo, presença de canídeos silvestres, acesso à comida dos bovinos, destino dado à carcaça de bovinos, tipo de ordenha e tipo de alimento dos bovinos (concentrado comercial e de fabricação caseira e silagem).

No modelo final (multivariado), as variáveis, produção leiteira mensal (nos níveis até 1000 l/mês e de 1001 a 5000 l/mês) e acesso de outros animais à comida de bovinos, foram significativamente associados à soroprevalência para *N. caninum* ($P < 0,05$). Na tab. 10 encontram-se os resultados obtidos na regressão logística das propriedades pertencentes à categoria I e II.

Não foi identificada associação entre a soropositividade e as outras variáveis estudadas. Foi evidenciada a existência de colinearidade entre as variáveis, manejo reprodutivo, raça e tipo de ordenha.

A proposta inicial deste estudo foi estratificar as propriedades (I, II e III) quanto ao tamanho do rebanho, tendo como base o levantamento prévio realizado

na região, onde foi constatada uma maior representatividade de propriedades com rebanhos de até 15 bovinos de exploração leiteira, ou seja, da categoria I. Na análise estatística, propriedades da categoria “III” (> 50 animais) precisaram ser excluídas do modelo, uma vez que todas tiveram pelo menos um animal soropositivo para *N. caninum*, logo, ocorreu frequência zero para uma das respostas (propriedades negativas). Como esse estrato é formado por propriedades com infraestrutura e manejo diferenciado, e o tamanho da amostra foi reduzido (n=4), pois são raras na região, optou-se por utilizar como unidade de observação os indivíduos (fêmeas bovinas), sendo construído um novo modelo estatístico para avaliar a associação dos fatores de risco para neosporose bovina nestas propriedades. O resultado da análise univariada (Qui-Quadrado) está representado na tab. 11.

A maioria das variáveis não difere entre essas propriedades, estando, todos os animais expostos a condições idênticas. Entre as variáveis analisadas, constatou-se associação estatisticamente significativa entre a soropositividade dos bovinos e o histórico de abortamento repetido na propriedade, indicando que, nessa situação, os animais estão expostos a um maior risco de infecção por *N. caninum*.

Tabela 10 – Resultado da análise multivariada dos fatores associados com soropositividade para *N. caninum* nas propriedades estudadas, pertencentes à categoria I e II.

VÁRIÁVEL	OR	IC 95%	P
Acesso alimento¹			
não	1		---
sim	15.13	1.86-122.81	0.0110
Produção Leiteira			
até 1000l/mês	2.78	1.07-7.21	0.0359
1001-5000l/mês	3.13	0.76-12.83	0.1124

¹ acesso de outros animais ao local de armazenamento da comida dos bovinos

Tabela 11 – Análise da associação entre possíveis fatores de risco e a soropositividade de bovinos, em propriedades com rebanho superior a 50 animais, na região de Pelotas, RS.

VARIÁVEL	BOVINOS		X ²	P
	%	POSITIVOS		
Histórico aborto bovino repetido				
sim	160	20	3,90	0,048
não	50	12		
Acesso alimento¹				
sim	171	28	0,92	0,33
não	39	4		
Terneiros²				
sim	171	28	0,92	0,33
não	39	4		

¹acesso de outros animais ao local de armazenamento da comida dos bovinos

²terneiros natimortos ou nascidos com algum tipo de sinal neurológico

6 DISCUSSÃO

A pecuária leiteira é uma das atividades mais importantes do setor agropecuário do Rio Grande do Sul, desenvolvida em 80% dos municípios gaúchos.

Os municípios estudados fazem parte da maior bacia leiteira do Estado, e é formada principalmente por pequenas propriedades (70,7%), com rebanho menor ou igual a 15 bovinos, proveniente de cruzamentos raciais (48,9%), principalmente com gado europeu, com área inferior a 20 ha (58,6%) e produção leiteira de até 5000 litros/mês (em 84,8% das propriedades), caracterizando uma região minifundiária, pouco tecnificada e mão de obra essencialmente familiar. Este tipo de sistema de produção (peculiar desta região) se assemelha com o que Aguiar et al. (2006) observaram no Estado de Rondônia, RO, diferindo da maioria dos levantamentos sorológicos realizados no Brasil e no mundo que utilizam propriedades altamente tecnificadas e com rebanhos de grande produção leiteira (ROMERO et al. 2002; GUIMARÃES JR et al. 2004; SARTOR et al. 2005; LISTA-ALVES et al., 2006).

A grande variação observada na frequência de anticorpos para *N. caninum* entre os rebanhos leiteiros no Brasil (tab. 2) e no mundo (tab. 1), possivelmente seja explicada pelo uso de diferentes testes sorológicos e na escolha do ponto de corte adequado. Além disso, as diferentes técnicas de amostragem, provenientes de rebanhos com histórico de abortamento, certamente, influenciam os níveis de anticorpos para o agente sendo bem maiores nestes casos, como verificado por Stobbe (1999); Locatelli-Dittrich et al. (2001), do que quando comparados a amostras oriundas de levantamentos epidemiológicos, cujas propriedades são sorteadas e as coletas realizadas ao acaso, como foi realizado no presente estudo.

Os resultados de prevalência obtidos neste estudo (12,02%) são semelhantes aos obtidos por outros estudos com metodologia semelhantes realizados em outras regiões produtoras de leite no Brasil (GONDIM et al., 1999; MELO et al., 2001; CORBELLINI et al., 2002; SARTOR et al., 2003; OGAWA et al., 2005; AGUIAR et al., 2006).

Não foi encontrada diferença significativa, quanto a propriedades com animais soropositivos, entre os municípios estudados. A difusão do *N. caninum* nas propriedades estudadas foi relativamente baixa (46,7%), inferior à constatada por Corbellini et al. (2006b), na região noroeste e sudoeste do RS, Guimarães Jr et al. (2004) no norte do Paraná e Aguiar et al. (2006) em Rondônia, de 93,3, 91,3 e 70% respectivamente das propriedades com pelo menos um animal soropositivo.

A grande variação no percentual de fêmeas soropositivas por propriedade, encontrada nos rebanhos estudados (2,6 a 100%) é sugestiva de que as características e práticas de manejo utilizadas nas propriedades, possam influenciar a probabilidade de um animal se tornar mais ou menos exposto ao *N. caninum*.

Segundo Dubey (1999) e Lindsay; Upton e Dubey (1999), os títulos de 1:800 são considerados altos e sugestivos de infecção ativa pelo *N. caninum*. Neste estudo três animais apresentaram títulos de 1:800 (tab. 7). Estes bovinos eram provenientes de rebanhos distintos e com histórico de abortamento. Dois destes animais tinham mais de 24 meses e apresentavam histórico de problemas reprodutivos (retorno ao cio ou aborto), a terceira fêmea tinha idade inferior a 24 meses, era primípara e estava prenhe no momento da coleta. Contudo, a interpretação dos resultados de testes sorológicos deve ser cautelosa, pois animais que abortaram ou que estão gestando, apresentam flutuação dos títulos de anticorpos (STENLUND et al., 1999).

Neste estudo foi observada uma baixa ocorrência (26,8%) de propriedades com cães soropositivos para *N. caninum*, que conviviam diretamente com os bovinos nas propriedades avaliadas, inferior ao constatado por Guimarães Jr et al. (2004), que observaram 65,2% das propriedades leiteiras norte do Paraná, com pelo menos um cão soropositivo para *N. caninum*. A presença de cães soropositivos, embora não tenha apresentado associação estatisticamente significativa com a soropositividade dos bovinos, pode significar uma fonte de infecção através de contaminação ambiental com oocistos, uma vez que, 61,1% das propriedades com

cães soropositivos também tinham bovinos soropositivos, enquanto que, entre aquelas cujos cães eram soronegativos para *N. caninum*, esse índice foi de 44,9%.

Nas propriedades estudadas existia pelo menos um cão (94,5%), ou canídeo silvestre (37%) em convívio com os bovinos, valores semelhantes foram encontrados por Corbellini et al. (2006b) e Guimarães Jr et al. (2004) de 95 e 95,7 % respectivamente, sendo que estes últimos autores, relataram a presença de canídeos silvestres em 34,8% das propriedades estudadas. Mesmo que neste estudo não tenha sido observada nenhuma associação entre a presença de canídeos domésticos ou silvestres e a soropositividade para *N. caninum* no rebanho, fatores como a existência de um ciclo silvestre do parasito, o desconhecimento de aspectos epidemiológicos, sobretudo do envolvimento de canídeos silvestres, aliados às condições produtivas no Rio Grande do Sul, possivelmente contribuam para a transmissão e manutenção da neosporose no rebanho bovino neste Estado. Ogawa et al. (2005) e Aguiar et al. (2006) não observaram associação entre bovinos criados em poteiros juntamente a encostas de mato, e conseqüentemente com algum tipo de contato com animais silvestres, além da presença de cães nas propriedades, e soropositividade para *N. caninum* em rebanho bovinos. Guimarães Jr et al. (2004) e Corbellini et al. (2006b), embora tenham observado uma fraca correlação entre soropositividade para *N. caninum* em bovinos e a presença de cães nas propriedades, salientaram que o fator de risco mais importante é a área das propriedades, que sendo pequena permitiram o acesso destes cães e bovinos a água, alimentos e placentas, e restos fetais contaminados.

Não foi observada nenhuma associação entre soropositividade para *N. caninum*, e a área da propriedade, a lotação animal e a categoria da propriedade (I, II ou III), sendo que 100% (4/4) das propriedades da categoria III (rebanho > 50 bovinos) apresentaram pelo menos um animal positivo para o protozoário. No entanto Dijkstra et al. (2001) e Corbellini et al. (2006b), verificaram que a área da propriedade (ha) pode ser um importante fator de risco à exposição ao *N. caninum*, pois em propriedades com áreas menores os bovinos se encontrariam mais concentrados e conseqüentemente os cães teriam maior acesso a carcaças de bovinos, fetos abortados, placenta e descargas uterinas do que em propriedades com áreas maiores.

Corbellini et al. (2006b), também não encontraram, a exemplo deste estudo, associação com o número de bovinos no rebanho nem a lotação animal como fator de risco para neosporose bovina. Ao contrário, Aguiar et al. (2006), em Rondônia, AM, encontraram associação entre soropositividade para *N. caninum* e tamanho do rebanho, sobretudo em propriedades que possuíam mais que 25 bovinos, estes tinham 9,7 vezes mais chance de se infectarem com o parasito.

Neste estudo não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as diferentes faixas etárias dos bovinos, demonstrando com isso, que não existem evidências suficientes nos animais selecionados de infecção horizontal. A transmissão vertical é considerada a rota mais importante de transmissão do *N. caninum*, sendo que fêmeas cronicamente infectadas podem transmitir o agente em gestações subseqüentes, o que determina que a prevalência de soropositivas na população, seja similar entre as diferentes faixas etárias (BJORKMAN et al., 1996, ANDERSON et al., 1997, DAVISON; OTTER; TRESS, 1999b). No Brasil, resultados semelhantes foram encontrados por Melo et al. (2001) e Locatelli-Dittrich et al. (2001) que também encontraram falta de associação entre a presença de *N. caninum* e as diferentes faixas etárias, envolvendo animais jovens e adultos. Porém, Guimarães Jr et al. (2004) observaram um número menor de animais soropositivos na faixa de 12-24 meses em relação aos animais maiores de 24 meses ($p = 0,017$), caracterizando a idade como um importante fator de risco para neosporose bovina. A ausência de epidemias nas propriedades estudadas, e diferenças significativas entre as faixas etárias, indicam que a principal rota de transmissão dos rebanhos estudados no presente trabalho é a vertical.

Os possíveis fatores de risco para infecção por *N. caninum* que apresentaram significância estatística no modelo univariado ($P \leq 0,25$), e que posteriormente, na análise por regressão logística, revelaram associação significativa com a soropositividade ao agente, nas propriedades, foram: acesso de outros animais domésticos ou silvestres à comida dos bovinos e produção leiteira ≤ 5000 litros/mês, estes resultados podem estar relacionados com as precárias condições sanitárias e nutricionais observadas nos rebanhos da região e que consequentemente aumentam o risco de infecção pelo *N. caninum*.

Em outros estudos realizados no Brasil, muitos destes fatores considerados neste estudo como de risco à infecção pelo *N. caninum* (tab. 9), foram associados à

soroprevalência para o agente em rebanhos de exploração leiteira. Ogawa et al. (2005) no Paraná, não encontraram diferenças significativas entre sorologia para *N. caninum* e alimentação, presença de cães e/ou outros animais e produção leiteira. Corbellini et al. (2006b), encontraram associação entre rebanhos soropositivos para *N. caninum* e o fornecimento de pool de colostro para os terneiros, aumentando a probabilidade de exposição ao agente e promovendo a transmissão horizontal da neosporose. Guimarães Jr et al. (2004), encontraram como fatores de proteção para neosporose bovina, o tipo de alimentação fornecido ao gado, como silagem e concentrado de fabricação caseira. Estes mesmos autores não encontraram associação com o acesso de outros animais ao local de armazenamento e fornecimento do alimento aos bovinos.

Os resultados obtidos com este estudo indicam que *N. caninum* está presente nos rebanhos leiteiros da região de Pelotas, RS, e provavelmente esteja difundido nos rebanhos de todo o Estado, como demonstram os trabalhos realizados por Corbellini et al. (2002), Ragozo et al. (2003), Pappen et al. (2005) e Corbellini et al. (2006b).

O estudo epidemiológico da região, considerando a seleção das propriedades estudadas (técnica de amostragem) e a representatividade da amostra, reflete a prevalência média para *N. caninum* nos bovinos provenientes de rebanhos leiteiros de Pelotas, Turuçu, Morro Redondo e Arroio do Padre. Mesmo que estes municípios façam parte da maior bacia leiteira gaúcha, com produção superior a de outras regiões mais tecnificadas no Estado, as condições sanitárias e de manejo dos rebanhos avaliados são precárias, bem como o estado nutricional destes animais. Estes dados refletem a realidade das unidades produtoras de leite no Rio Grande do Sul que é completamente diferenciada daquelas estudadas no restante do país.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que na região estudada:

- a soroprevalência para *N. caninum* entre bovinos leiteiros é de 12,04%;
- essa soroprevalência independe do tamanho do rebanho;
- a principal rota de infecção entre os bovinos leiteiros é a transplacentária, uma vez que a soroprevalência foi similar entre as diferentes faixas etárias;
- o acesso de outros animais domésticos e/ou silvestres à comida dos bovinos, aumenta o risco de infecção por *N. caninum*;
- não existe associação significativa entre soropositividade de cães e bovinos, comprovando uma menor importância da infecção pós-natal em bovinos;
- rebanhos de baixa produção leiteira apresentam maior soroprevalência para *N. caninum* do que aqueles de alta produção.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; RODRIGUES, A.A.R.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; CAMARGO, E.P.; 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.

ALVAREZ-GARCÍA, G.; PEREIRA-BUENO, J.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.; ORTEGA-MORA, L.M. Pattern of recognition of *Neospora caninum* tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted fetuses. **Veterinary parasitology**, v.107, p.15–27, 2002

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, p.242-244, 1991.

ANDERSON, M.L.; PALMER, C.W.; THURMOND, M.C.; PICANSO, J.P.; BLANCHARD, P.C.; BREITMEYER, R.E.; LAYTON, A.W.; MCALLISTER, M.; DAFT, B.; KINDE, H. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.207, p.1206-1210, 1995.

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* sp. 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. neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.417-431, 2000.

ATKINSON, R.A.; COOK, R.W.; REDDAKLIFF, L.A.; ROTHWELL, J.; BROADY, K.W.; HARPER, P.A.W.; ELLIS, J.T. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection

following an abortion outbreak in a dairy cattle herd. **Aust. Vet. Journal**, v.78, p.262-266, 2000.

BAILLARGEON, P.; FECTEAU, G.; PARÉ, J.; LAMOTHE, P.; SAUVÉ, R. Evaluation of the embryo transfer society as a method of controlling vertical transmission of *N. caninum* in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, p. 1803-1806, 2001.

BANÑALES, P.; FERNANDEZ, L.; REPISO, M.V.; GIL, A.; DARGATZ, D.A.; OSAWA, T. A nationwide survey on seroprevalence of *Neospora caninum* infection in beef cattle in Uruguay. **Veterinary Parasitology**, v.139, p.15-20, 2006.

BARLING, K.S., LUNT, D.K., SNOWDEN, K.F., THOMPSON, J.A. Association of serologic status for *Neospora caninum* and postweaning feed efficiency in beef steers. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, p. 1259–1262, 2001a.

BARLING, K.S.; MCNEILL, J.W.; PASCHAL, J.C.; MCCOLLUM, F.T.; CRAIG, T.M.; ADAMS, L.G.; THOMPSON, J.A. Ranch-Management factors associated with antibody seropositivity for *Neospora caninum* in consignments of beef calves in Texas, USA. **Preventive Veterinary Med.**, v. 52, p. 53-61, 2001b

BARR, B.C.; CONRAD, P.A.; BREITMEYER, R.E.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M.L.; REYNOLD, J.V.; CHAUVET, A.E.; DUBEY, J.P.; ARDANS, A.A. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.202, p.113-117, 1993.

BARTELS, C.J.; WOUDA, W.; SCHUKKEN, Y.H. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995–1997). **Theriogenology**, v.52, p.247-257, 1999.

BARTELS, C.J.M.; VAN MAANEN, C.; VAN DER MEULEN, A.M.; DIJKSTRA, T.; WOUDA, W. Evaluation of three enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Neospora caninum* in bulk milk. **Veterinary Parasitology**, v.131, p.235-246, 2005.

BARTELS, C.J.M.; ARNAIZ-SECO, J.I.; RUIZ-SANTA-QUITERA, A.; BJÖRKMAN, C.; FRÖSSLING, J.; VON BLUMRÖDER, D.; CONRATHS, F.J.; SCHARES, G.; VAN MAANEN, C.; WOUDA, W.; ORTEGA-MORA, L.M. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. **Veterinary Parasitology**, v.137, p.17-27, 2006.

BERGERON, N. ; FECTEAU, G. ; BILLENEUVE, A. ; GIRARD, C. ; PARE, J. Failure of dogs to shed oocysts after being fed bovine fetuses naturally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v.97, p.145-152, 2001.

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

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

BJÖRKMAN, C.; HOLMDAHL, O.J.M.; UGGLA, A. An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. **Veterinary Parasitology**, v.68, p.251-260, 1997.

BJÖRKMAN, C.; NÄSLUND, K.; STENLUND, S.; MALEY, S.W.; BUXTON, D.; UGGLA, A. An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, p.41-44, 1999.

BJÖRKMAN, C.; ALENIUS, S.; EMANUELSSON, U.; UGGLA, A. *Neospora caninum* and bovine virus diarrhoea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. **Veterinary Journal**, v.159, p.201-6, 2000.

BJÖRKMAN, C.; MCALLISTER, M.M.; FRÖSSLING, J.; NÄSLUND, K.; LEUNG, F.; UGGLA, A. Application of the *Neospora caninum* IgG avidity ELISA in assessment of chronic reproductive losses after an outbreak of neosporosis in a herd of beef cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.15, p.3-7, 2003.

BJÖRKMAN, C.; GONDIM, L.F.P.; NÄSLUND, K.; TREES, A.J.; MCALLISTER, M.M. IgG avidity pattern in cattle after ingestion of *Neospora caninum* oocysts. **Veterinary Parasitology**, v.128, p.195-200, 2005.

BRYAN, L.A.; GAJADHAR, A.A.; DUBEY, J.P.; HAINES, D.M. Bovine neonatal encephalomyelitis associated with a *Neospora* sp. protozoan. **Can. Veterinary Journal**, v.35, n.2, p.111-113, 1994.

BUXTON, D.; MALEY, S.W.; WRIGHT, S.; THOMSON, K.M.; RAE, A.G.; INNES, E.A. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v.118, p.267-279, 1998.

BUXTON, D.; WRIGHT, S.; MALEY, S.W.; RAE, A.G.; LUNDEN, A.; INNES, E.A. Immunity to experimental neosporosis in pregnant sheep. **Parasite Immunol.**, v.23, p.85-91, 2001.

BUXTON, D.; MCALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, v.18, n.12, p.125-131, 2002.

CAMPERO, C.M.; ANDERSON, M.L.; CONOSCIUTO, G.; ODRIOZOLA, H.; BRETSCHNEIDER, G.; POSO, M.A.. *Neospora Caninum*–associated abortion in a dairy herd in Argentina. **The Veterinary Record**, v.143, p.228-229, 1998.

CANADA, N.; CARVALHEIRA, J.; MEIRELES, C.S.; CORREIA DA COSTA, J.M.; ROCHA, A. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cows and its consequences for reproductive management. **Theriogenology**, v.62, n.7, p.1229-35, 2004.

CANÓN-FRANCO, W.A.; YAI, L.E.O.; SOUZA, S.L.P.; SANTOS, L.C.; FARIAS, N.A.R.; RUAS, J.; ROSSI, F.W.; GOMES, A.A.B.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Detection of antibodies to *Neospora caninum* in two species of wild canids: *Lycalopex gymnocercus* and *Cerdocyon thous* from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.123, p.275-277, 2004.

CONRAD, P.A.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M.L.; ROWE, J.; BONDURANT, R.; TUTER, G.; BREITMEYER, R.E.; PALMER, C.W.; THURMOND, M.C.; ARDANS, A.; DUBEY, J.P.; DUHAMEL, G.; BARR, B.C. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.5, p.572-578, 1993.

CHI, J.; VANLEEUEWEN, J.A.; WEERSINK, A.; KEEFE, G.P. Management factors related to seroprevalences to bovine viral-diarrhoea virus, bovine-leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in dairy herds in the Canadian Maritimes. **Preventive Veterinary Med.**, v.55, p.57-68, 2002.

CHOROMANSKI, L.; BLOCK, W. Humoral immune responses and safety of experimental formulations of inactivated *Neospora* vaccines. **Parasitology Res.**, v.86, p.851-853, 2000.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; RODRIGUEZ-BERTOS, A.; ARNAIZ-SECO, I.; MORENO, B.; ADURIZ, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine foetuses. **Theriogenology**, v.65, p.629-641, 2005.

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, p.195-202, 2002.

CORBELLINI, L.G.; PESCADOR, C.A.; FRANTZ, F.; WUNDER, E.; STEFFEN, D.J.; 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.78, p.2-7, 2006a.

CORBELLINI, L.G.; SMITH, D.R.; PESCADOR, C.A.; SCHMITZ, M.; CORREA, A.; STEFFEN, D.J.; DRIEMEIER, D.. Herd-level risk factors for *Neospora caninum*

seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. **Preventive Veterinary Med.**, v.74, n.2-3, p.130-141, 2006b.

DAVISON, H.C.; FRENCH, N.P.; TREES, A.J. Herd-specific and age-specific seroprevalence of *Neospora caninum* in 14 British dairy herds. **Veterinary Rec.**, v.144, p.547-550, 1999.

DAVISON, H.C.; OTTER, A.; TREES, A.J.. Significance of *Neospora Caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1189-1194, 1999a.

DAVISON, H.C.; OTTER, A.; TREES, A.J. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p.1683-1689, 1999b.

DAVISON, H.C.; GUY, C.S.; MCGARRY, J.W.; GUY, F.; WILLIAMS, D.J.L.; KELLY, D.F.; TREES, A.J. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. **Research Vet. Science**, v.70, p.163-168, 2001.

DE MAREZ, T.; LIDDELL, S.; DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C.; GASBARRE, L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1647-1657, 1999.

DE MEERSCHMAN, F.; FOCANT, C.; DETRY, J.; RETTIGNER, C.; CASSART, D.; LOSSON, B. Clinical, pathological and diagnostic aspects of congenital neosporosis in a series of naturally infected calves. **Veterinary Rec.**, v.157, p.115-118, 2005.

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H.W.; EYSKER, M.; WOUDA, W. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.209-215, 2001.

DIJKSTRA, T. H.; BARKEMA, H. W.; EYSKER, M.; HESSELINK, J. W.; WOUDA, W. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. **Veterinary Parasitology**, v.105, n.8, p.99-104, 2002.

DIJKSTRA, T.H.; 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, p.89–98, 2003.

DUBEY, J.P.; CARPENTER, J.L.; SPEER, C.A.; TOPPER, M.J.; UGGLA, A. A newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.192, n.9, p.1269-1285, 1988.

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

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

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; HILL, D.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; KWOK, O.C.H.; SILVA, J.C.R.; OLIVEIRA-CAMARGO, M.C.; GENNARI, S.M. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Sarcocystis neurona* in sera of domestic cats from Brazil. **Journal of Parasitology**, v.88, p.1251-1252, 2002.

DUBEY, J.P. Neosporosis in Cattle. **Journal of Parasitology**, v.89 (suppl.), p.42-56, 2003.

DUBEY, J.P.; SREEKUMAR, C.; KNICKMAN, E.; MISKA, K.B.; VIANNA, M.C.B.; KWOK, O.C.H.; HILL, D.E.; JENKINS, M.C.; LINDSAY, D.S.; GREENE, C.E. Biologic, morphologic, and molecular characterisation of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. **International Journal for Parasitology**, v.34, p.1157-1167, 2004.

DUBEY, J.P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, v.134, p.267-289, 2006.

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

ELLIS, J.T. Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.1053-1060, 1998.

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<http://www.embrapa.gov.br/>> Acesso em: 12 fev. 2007.

ENGELAND, I.V.; WALDELAND, H.; KINDAHL, H.; ROPSTAD, E.; ANDRESEN, O. Effect of *T. gondii* infection on the development of pregnancy and on endocrine foetal-placental function in the goat. **Veterinary parasitology**, v.67, p.61-74, 1996.

EPI-INFO 6.04d JANEIRO 2001. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/>> Acesso em: 18 dez. 2006.

FERRE, I.; ADURIZ, G.; DEL-POZO, I.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ATXAERANDIO, R.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; HURTADO, A.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L.M. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, v.63, p.1504-1518, 2005.

FIORETTI, D.P.; PASQUAI, P.; DIAFERIA, M.; MANGILI, V.; ROSIGNOLI, L. *Neospora caninum* infection and congenital transmission: serological and

parasitological study of cows up to the fourth gestation. **Journal Veterinary Med. Series B**, v.50, p.399-404, 2003.

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

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

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

GONDIM, L.F.P.; McALLISTER, M.M.; GAO, L. Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. **Veterinary Parasitology**, v.134, p.33-39, 2005.

GONDIM, L.F.P. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends in Parasitology**, n.6, v.22, p.247-252, 2006.

GOTTSTEIN, B.; HENTRICH, B.; WYSS, R.; THÜR, B.; BUSATO, A.; STÄRK, K.D.C.; MÜLLER, N. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.679-91, 1999.

GUIMARÃES JR, 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 Paraná State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.124, p.1-8, 2004.

HALL, C.A.; REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. **Veterinary Parasitology**, v.128, p.231-241, 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.

HILL, D.E.; LIDDELL, S.; JENKINS, M.C.; DUBEY, J.P. Specific detection of *Neospora caninum* oocyst in fecal samples from experimentally-infected dogs using the polymerase chain reaction. **Journal of Parasitology**, v.87, p.395-398, 2001.

HO, M.S.Y.; BARR, B.C.; ROWE, J.D.; ANDERSON, M.L.; SVERLOW, K.W.; PACKHAM, A.; MARSH, A.E.; CONRAD, P.A. Detection of *Neospora* sp. from

infected bovine tissues by PCR and probe hybridization. **Journal of Parasitology**, v.83, p.508-514, 1997.

HOBSON, J.C.; DUFFIELD, T.F.; KELTON, D.; LISSEMORE, K.; HIETALA, S.K.; LESLIE, K.E.; MCEWEN, B.; PEREGRINE, A.S. Risk factors associated with *Neospora caninum* abortion in Ontario Holstein dairy herds. **Veterinary Parasitology**, v.127, p.177–188, 2005.

HOORFAR, J.; WOLFFS, P.; RADSTROM, P. Diagnostic PCR: validation and sample preparation are two sides of the same coin. **Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.**, v.112, p.808-814, 2004.

HOWE, D.K.; CRAWFORD, A.C.; LINDSAY, D.; SIBLEY, L.D. The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infect. Immun.**, v.66, p.5322-5328, 1998.

INNES, E.A.; PANTON, W.; MARKS, J.; TREES, A.; HOLMDAHL, J.; BUXTON, D. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum* as shown by incorporation of 3H Uracil. **Journal of Comparative Pathology**, v.113, n.1, p. 95-100, 1995.

INNES, E. A.; BUXTON, D.; MALEY, S.; WRIGHT, S.; MARKS, J.; ESTEBAN, I.; RAE, A.; SCHOCK, A.; WASTLING, J. Neosporosis. Aspects of epidemiology and host immune response. **Annals of the New York Academic Science**, v.916, n.93, p.93-101, 2000.

INNES, E.A.; WRIGHT, S.E.; MALEY, S.; RAE, A.; SCHOCK, A.; KIRVAR, E.; BARTLEY, P.; HAMILTON, C.; CAREY, I.M.; BUXTON, D. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.1523-1534, 2001.

INNES, E.A.; WRIGHT, S.; BARTLEY, P.; MALEY, S.; MACALDOWIE, C.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D. The host–parasite relationship in bovine neosporosis. **Veterinary Immunol. Immunopathol**, v.108, p.29–36, 2005.

INNES, E.; ANDRIANARIVO, A.; BJÖRKMAN, C.; WILLIAMS, D.; CONRAD, A. Immune response to *Neospora caninum* and prospect for vaccination. **Trends in Parasitology**, v.18, p.497-504, 2002.

KASHWAZAKI, Y.; GIANNEECHINI, R.E.; LUST, M.; GIL, J. Seroepidemiology of neosporosis in dairy cattle in Uruguay. **Veterinary Parasitology**, v.120, p.139–144, 2004.

KYAW, T. ; SUWIMONTEERABUTR, J. ; VIRAKUL, P. ; LOHACHIT, C. ; KALPRAVIDH, W. Seronegative conversion in four *Neospora caninum*-infected cows,

with a low rate of transplacental transmission. **Veterinary Parasitology**, v.131, p.145-150, 2004.

LEVINE, N D. **Veterinary protozoology**. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 414 p., 1985.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. *Neospora*-Induced protozoal abortions in cattle. **Comp.Cont.Educ.Pract.Veterinary**, v.15, n.6, p.882-888, 1993.

LINDSAY, D.S. Question: What is the economic impact of the disease? **Veterinary Exchange**, v.20, n.11, p.13, 1998.

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

LISTA-ALVES, D.; PALOMARES-NAVEDA, R.; GARCIA, F.; OBANDO, C.; ARRIETA, D.; HOET, A.E. Serological evidence of *Neospora caninum* in dual-purpose cattle herds in Venezuela. **Veterinary Parasitology**, v.136p.347-349, 2006.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V. T.; RICHARTZ, R. R.; GASINO-JOINEAU, M. E.; VINNE, R.; PINCKNEY, R. D. Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in southern Brazil. **The Journal of Parasitology**, v.87, n.6, p.1493-1494, 2001.

LOPEZ-GATIUS, F.; PABON, M.; ALMERÝ, S. *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. **Theriogenology**, v.62, p.606-613, 2004.

LOPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; ALMERIA, S. *Neospora caninum* infection does not affect the fertility of dairy cows in herds with high incidence of *Neospora*-associated abortions. **Journal Veterinary Med. Series B**, v.52, n.1, p.51-53, 2005.

MAINAR-JAIME, R.C.; THURMOND, M.C. ; BERZAL-HERRANZ, B. ; HIETALA, S.K. Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. **Veterinary Rec.**, v.145, p.72-75, 1999.

MALEY, S.W.; BUXTON, D.; RAE, A.G.; WRIGHT, S.E.; SCHOCK, A.; BARTLEY, P.M.; ESTEBAN-REDONDO, I.; SWALES, C.; HAMILTON, C.M.; SALES, J.; INNES, E.A. The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation. **Journal of comparative pathology**, v.129, p.186-195, 2003.

MARKS, A.E.; BARR, B.C.; PACKHAM, A.E.; CONRAD, P.A. Description of new *Neospora* specie (protozoa: apicomplexa: sarcocystidae). **Journal of Parasitology**, v.84, p.983-991, 1998.

McALLISTER, M., HUFFMAN, E.M., HIETALA, S.K., CONRAD, P.A., ANDERSON, M.L., SALMAN, M.D. Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of

bovine abortion due to neosporosis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.8, p.355-357, 1996.

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 for Parasitology**, v.28, p.1473-1475, 1998.

McALLISTER, M.M.; BJÖRKMAN, C.; ANDERSON-SPRECHER, R.; ROGERS, D.G. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.217, p.881-887, 2000.

McALLISTER, M.M.; WALLACE, R.L.; BJÖRKMAN, C.; GAO, L.; FIRKINS, L.D. A probable source of *Neospora caninum* infection in an abortion outbreak in dairy cows. **Bovine Pract.**, v.39, p.69-74, 2005.

MELO, C. B.; LEITE, R. C.; SOUZA, G. N.; LEITE, R. C. Frequência de infecção por *Neospora caninum* em dois diferentes sistemas de produção de leite e fatores predisponentes à infecção em Bovinos Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, n.2, v.10, p.67-74, 2001.

MODRY, D.; LAPETA, J. R. S. Placentophagia – an alternative way for horizontal transmission of *Neospora caninum* in cattle? **Trends in Parasitology**, n.12, v.17, p.573, 2001.

MOEN, A.R.;WOUDA,W.; MUL, M.F.; GRAAT, E.A.M.; VAN WERVEN, T. Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. **Theriogenology**, v.49, p.1301-1309, 1998.

MOORE, D.; CAMPERO, C.; ODEÓN, A.; POSSO, M.; CANO, D.; LEUNDA, M.; BASSO, W.; VENTURINI, M.; SPÄTH, E. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.107, p.303-316, 2002.

MOORE D.P. Neosporosis in South America. **Veterinary Parasitology**, v.127, p.87-97, 2005.

MOORE, D.; LEUNDA, M.; ZAMORANO, P.; ODEÓN, A.; ROMERA, S.; CANO, A.; DE YANIZ, G.; VENTURINI, M.; CAMPERO, C. Immune response to *Neospora caninum* in naturally infected heifers and heifers vaccinated with inactivated antigen during the second trimester of gestation. **Veterinary Parasitology**, v.130, p.29-39, 2005.

MORALES, E.; TRIGO, F. J.; IBARRA, F.; PUENTE, E.; SANTACRUZ, M. Seroprevalence study of bovine neosporosis in Mexico. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, n.5, p.413-415, 2001.

MUNHOZ, A. D.; SILVA, R. T.; FLAUSINO, W.; TEIXEIRA, M.; ALBUQUERQUE, G. R.; LOPES, C. W. G. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas, no rebanho leiteiro do município de Resende, estado do Rio de Janeiro: dados preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12, 2002, Rio de Janeiro. **Anais do...** Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002a. CD-ROM.

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, 12, 2002, Rio de Janeiro. **Anais do...** Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002b. CD-ROM.

OBENDORF, D.L.; MURRAY, N.; VELDHUIS, G.; MUNDAY, B.L.; DUBEY, J.P. Abortion caused by neosporosis in cattle. **Australian Veterinary Journal**, v.72, n.3, 1995.

OGAWA, L.; FREIRE, R.L.; VIDOTTO, O.; GONDIM, L.F.P.; NAVARRO, I.T. Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil. **Arquivos Bras. Med. Veterinária Zootec.**, v.57, n.3, p.312-316, 2005.

OSAWA, T.; WASTILING, J.; ACOSTA, L.; ORTELLADO, C.; IBARRA, J.; INNES, E.A. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle in Paraguay. **Veterinary Parasitology**, v.110, p. 17-23, 2002.

OTRANTO, D.; LLAZARI, A.; TESTINI, G.; TRAVERSA, D.; FRANGIPANE, D.I.; REGALBONO, A.; BADAN, M.; CAPELLI, G. Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. **Veterinary Parasitology**, v.118, p.7-18, 2003.

OULD-AMROUCHE, A.; KLEIN, F.; OSDOIT, C.; MOHAMMED, H.O.; TOURATIER, A.; SANAA, M.; MIALOT, J.P. Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Normandy, France. **Veterinary Res.**, v.30, p.531-8, 1999.

PACKHAM, A.E., SVERLOW, K.W., CONRAD, P.A., LOOMIS, E.F., ROWE, J.D., ANDERSON, M.L., MARSH, A.E., CRAY, C., BARR, B.C. A modified agglutination test for *Neospora caninum*: development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.5, p.467-473, 1998.

PAN, Y.; JANSEN, G.B.; DUFFIELD, T.F.; HIETALA, S.; KELTON, D.; LIN, C.Y.; PEREGRINE, A.S. Genetic Susceptibility to *Neospora caninum* Infection in Holstein Cattle in Ontario. **Journal Dairy Science**, v.87, p.3967-3975, 2004.

PAPPEN, F.; CUNHA, 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. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14., 2005, Pelotas. **Anais do ...** Pelotas: UFPel, 2005.

PARÉ, J.; HIETALA, S.K.; THURMOND, M.C. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.7, p.352-359, 1995.

PARÉ, J.; THURMOND, M.C.; HIETALA, S.K. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. **Journal of Parasitology**, v.83, p.82-87, 1997.

PARISH, S.M.; MAAG-MILLER, L.; BESSER, T.E.; WEIDNER, J.P.; McELWAIN, T.; KNOWLES, D.P.; LEATHERS, C.W. Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.12, p.1599-1600, 1987.

PATITUCCI, A.N.; PEREZ, M.J.; ISRAEL, K.F.; ROZAS, M.A. Prevalence of *Neospora caninum* in two dairy herds of the IX region of Chile. **Archieve Medicine Veterinary**, v.32, p.209-214, 2000.

PETERS, M.; LÜTKEFELS, E.; HECKEROTH, A.R.; SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.1144-1148, 2001.

PIAGENTINI, M. **Dinâmica da infecção por *Neospora caninum* e propriedades leiteiras do município de Avaré/SP**. 2002. 37f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu.

QUINTANILLA-GONZALO, A.; PEREIRA-BUENO, J.; TABARES, E.; INNES, E.A.; GONZALEZ-PANIELLO, L.; ORTEGA-MORA, M.. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cattle and beef cattle in Spain. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1201-1208, 1999.

RAGOZO, A.M.A.; PAULA, V.S.O.; SOUZA, S.L.P.; BERGAMASCHI, D.P.; GENNARI, S.M. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis Estados brasileiros. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v.12, n.01, p.33-37, 2003.

RAZMI, G.R.; MOHAMMADI, G.R.; GARROSI, T.; FARZANEH, N.; FALLAH, A.H.; MALEKI, M. Seroepidemiology of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Mashhad area, Iran. **Veterinary Parasitology**, v.135, p.187-189, 2006.

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

ROMERO, J.J.; PÉREZ, E.; DOLZ, G.; FRANKENA, K. Factors associated with *Neospora caninum* serostatus in cattle of 20 specialised Costa Rican dairy herds. **Preventive Veterinary Med.**, v.53, n.4, p.263-73, 2002.

ROMERO, J.J.; PÉREZ, E.; FRANKENA, K. Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v.123, p.149-159, 2004.

ROMERO, J.J.; VAN BREDA, S.; VARGAS, B.; DOLZ, G.; FRANJEN, K. Effect of neosporosis on productive and reproductive performance of dairy cattle in Costa Rica. **Theriogenology**, v.64, p.1928-1939, 2005.

SAGER, H.; FISCHER, I.; FURRER, K.; STRASSER, M.; WALDVOGEL, A.; BOERLIN, P.; AUDIGE, L.; GOTTSTEIN, B. A Swiss case control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. **Veterinary Parasitology**, v.102, p.1-15, 2001.

SÁNCHEZ, G.F.; MORALES, S.E.; MARTÍNEZ, M.J.; TRIGO, J.F. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. **Can. Journal Veterinary Res.**, v.67, n.2, p.142-145, 2003.

SANDERSON, M.S.; GAY, J.M.; BASZLER, T.V. *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. **Veterinary Parasitology**, v.90, p.15-24, 2000.

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. **Ciências Agrárias**, v.24, p.3-10, 2003.

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 Instituto Biologia de São Paulo**, v.72, n.4, p.413-418, 2005.

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

SCHARES, G.; DUBREMETZ, J.F.; DUBEY, J.P.; BÄRWALD, A.; LOYENS, A.; CONRATHS, F.J. *Neospora caninum*: identification of 19-, 38-, and 40-kDa surface antigens and a 33-kDa dense granule antigen using monoclonal antibodies. **Exp. Parasitology**, v.92, p.109-119, 1999.

SCHARES, G.; HEYDORN, A.O.; CUPPERS, A.; MEHLBORN, H.; GEUE, L.; PETERS, M.; CONRATHS, F.J. p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **Veterinary Parasitology**, v.106, p.293-305, 2002.

SCHARES G; BARWALDA; STAUBACH C; ZILLER M; KLÖSS D; SCHRODER R; LABOHM R; DRÄGER K; FASEM W; HESS RG; CONRATHS FJ. Potential risk factors for bovine *N. caninum* infection in Germany are not under the control of the farmers. **Veterinary Parasitology**, v.129, p.301-309, 2004.

SCHARES, G.; BÄRWALD, A.; CONRATHS, F.J. Adaptation of a surface antigen-based ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. **Journal Veterinary Med. Series B**, v.52, p.45-48, 2005.

SCHARES, G.; PANTCHEV, N.; BARUTZKI, D.; HEYDDORN, A.O.; BAUER, C.; CONRATHS, F. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. **International Journal for Parasitology**, p.1525-1537, 2005.

SCHETTERS, T.; DUBEY, J.P.; ADRIANARIVO, A.; FRANKENA, K.; ROMERO, J.J.; PÉREZ, E.; HEUER, C.; NICHOLSON, C.; RUSSELL, D.; WESTO, J. Intervet symposium: bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.125, p.137-146, 2004.

SCHOCK, A.; BUXTON, D.; SPENCE, J.A.; BAIRD, A.; LOW, J.C. Histopathological survey of aborted bovine fetuses in Scotland with special reference to *Neospora caninum*. **Veterinary Rec.**, v.147, p.687-688, 2000.

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. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros do município de Gravatá, Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA. 12, **Anais do ...** Rio de Janeiro. 2002, CD-ROM.

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

STEINMAN, A.; SHPIGEL, N.Y.; MAZAR, S.; KING, R.; BANETH, G.; SAVITSKY, I.; SHKAP, V. Low seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in wild canids in Israel. **Veterinary Parasitology**, n.137, p. 155-158, 2006.

STENLUND, S.; KINDAHL, H.; MAGNUSSON, U.; UGGLA, A.; BJORKMAN, C. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v.85, p.227-234, 1999.

STOBBE, N. S. **Estudo interativo entre a presença de anticorpos anti-*Neospora caninum* e a ocorrência de abortamentos em bovinos no Noroeste do Estado de São Paulo**. 1999. 33 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e

Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

THILSTED, J.P.; DUBEY, J.P. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.9, p.44-49, 1989.

THURMOND, M.C.; ANDERSON, M.L.; BLANCHARD, P.C. Secular and seasonal trends of *Neospora* abortion in California dairy cows. **Journal of Parasitology**, v.81, p.364-367, 1995.

THURMAND, M.C.; HIETALA, S.K. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. **American journal of Veterinary Reserch**, v.210, p.672-674, 1997.

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

TREES, A.J., MCALLISTER, M.M., GUY, C.S., MCGARRY, J.W., SMITH, R.F., WILLIAMS, D.J.L. *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. **Veterinary Parasitology**, v.109, p.147-154, 2002.

TREES, A.J.; WILLIAMS, D.J.L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, v.21, p.558-561, 2005.

UGGLA, A.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O.J.M.; JAKUBEK, E.-B.; THEBO, P.; KINDAHL, H.; BJÖRKMAN, C. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.1467-1472, 1998.

VENTURINI, L.; DiLORENZO, C.; VENTURINI, C.; ROMERO, J. Anticuerpos anti-*Neospora* sp. en vacas que abortaron. **Veterinary Argentina**, v.12, p.167-170, 1995.

VENTURINI, M.C.; VENTURINI, L.; BACIGALUPE, D.; MACHUCA, M.; ECHAIDE, I.; BASSO, W.; UNZAGA, J.M.; DI LORENZO, C.; GUGLIELMONE, A.; JENKINS, M.C.; DUBEY, J.P. *Neospora caninum* infections in bovine foetuses and dairy cows with abortions in Argentina. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1705-1708, 1999.

VITALINO, 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 brachiurus*) from southeastern and midwestern regions of Brazil. **Veterinary Parasitology**, n.122, p.253–260, 2004.

WILLIAMS, D.J.L.; GUY, C.S.; MCGARRY, J.W.; GUY, F.; TASKER, L.; SMITH, R.F.; MACEACHERN, K.; CRIPPS, P.J.; KELLY, D.F.; TREES, A.J. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitemia

during gestation determines foetal survival. **Veterinary Parasitology**, v.121, p.347–358, 2000.

WILLIAMS, D.; GUY, C.; SMITH, R.; GUY, F.; MCGARRY, J.; MCKAY, J.; TREES, A. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, v.33, p.1059-1065, 2003.

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

WOUDA, W.; MOEN, A.R.; VISSER, I.J.R.; VAN KNAPEN, F. Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.9, p.180-185, 1997.

WOUDA, W.; MOEN, A.R.; SCHUKKEN, Y.H. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. **Theriogenology**, v.49, p.1311-1316, 1998.

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

Apêndice

Nº.:	Nº. Secretaria:	Data:
Nome do Proprietário:		
Nome da Propriedade:	Tel. contato:	
Município:	Localidade:	
Área total da propriedade:	Área destinada à pecuária:	
Área destinada à agricultura:	Nº. Total de bovinos:	
Produção <u>mensal</u> leiteira:	Nº vacas lactação:	
Raça:		
Cães - () Sim () Não Quantos:		
Gatos - () Sim () Não Quantos:		
Eqüinos - () Sim () Não Quantos:		
Ovinos - () Sim () Não Quantos:		
Suínos - () Sim () Não Quantos:		
Caprinos - () Sim () Não Quantos:		
Aves - () Sim () Não Quantos:		
Bovinos de corte - () Sim () Não Quantos:		
Já observou aborto na propriedade:		
() Sim () Não Quantos:	Espécie animal:	Mês/ano:
Realizou algum tipo de diagnóstico:		
() Sim () Não Qual(is):		
Vacas com histórico de abortos repetidos:		
() Sim () Não Quantos:		
No caso de aborto em bovinos, recolhe fetos abortados do campo:		
() Sim () Não Destino:		
Destino dado a animais mortos no campo:		
Intervalo entre partos:		
Inseminação ou monta natural:		
Taxa de natalidade em bovinos:		
Existem sorros na propriedade:		
() Sim () Não Época do ano:		

Proximidade da casa:

☐ Sim ☐ Não Contato com os bovinos: ☐ Sim ☐ Não

Alimentação fornecida aos bovinos:

☐ Silagem ☐ Pastagem ☐ concentrado – Qual:

Onde armazena:

Acesso de outros animais - ☐ Sim ☐ Não

Utiliza cochos:

☐ Sim ☐ Não Local:

Outros animais têm acesso aos cochos

☐ Sim ☐ Não

Procedência e como é fornecida água para os animais:

Já observou nascimento de terneiros fracos:

☐ Sim ☐ Não Quantos:

Utiliza algum tipo de vacina nos bovinos:

☐ Sim ☐ Não Qual (is):

Utiliza pool de colostro ou leite em balde para os terneiros:

☐ Sim ☐ Não