

**Universidade Federal do Pará  
Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental  
Universidade Federal Rural da Amazônia**

**Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**Sandro Patroca da Silva**

**PRESENÇA DE ANTICORPOS IgG ANTI-*Neospora caninum*  
E ANTI-*Toxoplasma gondii* EM BÚFALAS CRIADAS NO  
ESTADO DO PARÁ, BRASIL**

**Belém  
2009**

**Sandro Patroca da Silva**

**PRESENÇA DE ANTICORPOS IgG ANTI-*Neospora caninum*  
E ANTI-*Toxoplasma gondii* EM BÚFALAS CRIADAS NO  
ESTADO DO PARÁ, BRASIL**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia. Área de concentração: Produção Animal. Orientadora: Dra. Hilma Lúcia Tavares Dias

**Belém  
2009**

Sandro Patroca da Silva

**PRESENÇA DE ANTICORPOS IgG ANTI-*Neospora caninum*  
E ANTI-*Toxoplasma gondii* EM BÚFALAS CRIADAS NO  
ESTADO DO PARÁ, BRASIL**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia. Área de concentração: Produção Animal.

Data: 07/01/2009

Banca Examinadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Hilma Lúcia Tavares Dias - Orientadora  
Universidade Federal do Pará - UFPA

---

Prof. Dr. Leonildo Bento Galiza da Silva - Membro  
Titular  
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

---

Dra. Andréa Maria Góes Negrão - Membro Titular  
Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará –  
ADEPARA

## **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) –**

### **1. Biblioteca Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural / UFPA, Belém-PA**

---

Silva, Sandro Patroca da

Presença de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em búfalas criadas no Estado do Pará, Brasil / Sandro Patroca da Silva; orientadora, Hilma Lúcia Tavares Dias - 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Belém, 2009.

1. Búfalo – Parasito - Pará. 2. *Toxoplasma gondii* - Pará. 3. Toxoplasmose em animais - Pará. 4. Parasitologia veterinária - Pará. I. Título.

CDD – 22.ed. 636.293098115

---

Aos meus pais, Ademir da Silva e Sandra Maria Patroca da Silva, pelo esforço incondicional em me proporcionar uma educação de qualidade para que eu pudesse chegar a este momento, sem eles esta dissertação nunca aconteceria.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) pela graduação em Medicina Veterinária.

À Universidade Federal do Pará (UFPA), por meio do curso de pós-graduação em Ciência Animal, pela oportunidade de aperfeiçoamento.

Ao professor Dr. Alexandre do Rosário Casseb pela ajuda na graduação, amizade, por me mostra a beleza da Microbiologia Veterinária e auxílio na coleta de matérias.

À professora Dra. Hilma Lúcia Tavares Dias, pela orientação, conhecimento transmitido, amizade e confiança em todos os momentos.

À EMBRAPA Amazônia Oriental, na pessoa do Dr. José Ribamar Felipe Marques, por auxiliar na coleta de matérias.

Ao professor Dr. Rinaldo Aparecido Mota pelo apoio oferecido na execução dos testes de Imunofluorescência Indireta (RIFI) na Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE.

Ao mestrando da UFRPE, Eduardo B. Faria, pelas importantes orientações no processamento da RIFI, pelos conselhos em manter os olhos fechados, e pela amizade formada.

Aos demais amigos do Laboratório de Bacterioses da UFRPE pela ajuda oferecida, pelos momentos de alegria e pela amizade formada.

Agradeço a professora Dra. Maristela Gomes da Cunha, responsável pelo Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal do Pará - UFPA, por disponibilizar o leitor de ELISA na execução das minhas análises, juntamente com seu orientado de mestrado Tiago da Silva Medina, pelas orientações de manuseio do leitor de ELISA.

A Carol Silva por sua ajuda na tradução do resumo.

A Lívia Medeiros Casseb pela grande ajuda com a execução da parte estatística.

A toda diretoria e agregados do sindicato do Panorama XXI pelos momentos de alegria e descontração.

E a todos que de forma direta ou indireta ajudaram na execução deste trabalho.

“Água mole em pedra dura, tanto bate até que fura.”

(autor desconhecido)

## RESUMO

Com o objetivo de verificar a ocorrência de búfalas sororreagentes para *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em 15 unidades produtivas localizadas em 14 municípios do estado do Pará, foram coletados amostras de soro sanguíneo de 401 búfalas. Os soros foram submetidos à Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI), utilizando as diluições 1:200 e 1:64 como ponto de corte para *N. caninum* e *T. gondii*, respectivamente, e um teste de ELISA indireto para detectar anticorpos anti-*N. caninum*. Foram testadas 374 amostras para anticorpos IgG anti-*N. caninum*, enquanto que, 401 amostras foram analisadas para detectar a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, utilizando-se a RIFI como método diagnóstico contra ambos os protozoários. Em outra verificação, 315 amostras foram testadas através do ELISA indireto, para verificar a presença de anticorpos IgG anti-*N. caninum*. Dentre os soros das búfalas testados, 153 (40,91%) foram reagentes ( $\geq$  1:200) para *N. caninum*, e quatro animais (1%) reagiram ( $\geq$  1:64) contra *T. gondii*, e uma búfala (0,27%) foi reagente aos dois protozoários na RIFI. No ELISA, 53 búfalas (16,82%) foram reagentes. A alta ocorrência de anticorpos IgG anti-*N. caninum* demonstra que o parasito pode estar circulando entre búfalas criadas no estado do Pará, quanto a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, mesmo apresentando uma baixa ocorrência, este parasita também pode estar presente nas propriedades criadoras de bubalinos no estado do Pará, demonstrando que ambos os protozoário podem representar um risco para a saúde pública e uma fonte de infecção para outros animais, assim como um possível causador de enfermidades reprodutivas nesta espécie.

**Palavras-chave:** búfalas, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, RIFI, ELISA

## ABSTRACT

With the objective to investigate the incidence of seroreactivity of buffalo cows sera for *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*, blood samples were collected from 401 buffalo cows originated from 15 production units located in 14 counties of the state of Pará. The serum samples were subjected to indirect immunofluorescence assay (IFA). The serum dilutions used in this test were 1:200 and 1:64 as cut off points for *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*, respectively. In addition, an indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) was used to detect antibodies anti-*N. caninum*. Three hundred and seventy four samples were tested for anti-*N. caninum* IgG antibodies, whereas 401 samples were tested for anti-*T. gondii* IgG antibodies, making use of IFA as diagnostic method against both protozoan parasites. In another analysis, 315 samples were tested for anti-*N. caninum* IgG antibodies by an indirect ELISA. Among the serum of the buffalo cows tested, 153 (40,91%) were reactive ( $\geq$  1:200) against *N. Caninum*, four animals (1%) were reactive ( $\geq$  1:64) against *T. gondii*, and one buffalo cow (0,27%) was reactive against the two protozoan parasites in the IFA. In the ELISA test, 53 buffalo cows (16,82%) were reactive. The high incidence of anti-*N. caninum* IgG antibodies found shows that this parasite can be circulating between buffalo cows raised in the state of Pará. Although the incidence of anti-*T. Gondii* IgG antibodies found was low, this parasite can also be present in the properties where buffalos are raised in the state of Pará. Thus, both protozoan parasites can represent a risk for the public health and a source of infection for other animals, as well as a possible cause of reproductive illnesses in this species.

**Key-words:** buffalo cows, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, IFA, ELISA

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Layout da lâmina de RIFI para neosporose (triagem); (C -) Controle negativo; (C +) Controle positivo; (AM) Amostra testada.....	38
Figura 2 - Layout da lâmina de RIFI para neosporose (titulação); (C -) Controle negativo; (C +) Controle positivo; (AM) Amostra testada.....	38
Figura 3 - Layout da placa de ELISA. (C -) Controle negativo; (C +) Controle positivo; (B) branco; (AM) Amostra testada.....	41
Figura 4 - Layout da lâmina de RIFI para toxoplasmose (triagem); (C -) Controle negativo; (C +) Controle positivo; (AM) Amostra testada.....	44
Figura 5 - Layout da lâmina de RIFI para toxoplasmose (titulação); (C -) Controle negativo; (C +) Controle positivo; (AM) Amostra testada.....	45
Fotografia 1 - Kit de ELISA, para o diagnóstico de neosporose.....	40
Gráfico 1 - Título de anticorpos anti- <i>N. caninum</i> , através da RIFI por fazendas, estado do Pará, 2008.....	48
Gráfico 2 - Número de búfalas positivas e negativas no ELISA indireto para anticorpos anti- <i>N. caninum</i> em propriedades rurais do estado do Pará, 2008.....	49
Gráfico 3 - Valores de S/P positivos no ELISA Indireto para anticorpos anti- <i>N. caninum</i> , em propriedades rurais do estado do Pará, 2008.....	49
Gráfico 4 - Valores de S/P negativos no ELISA Indireto para anticorpos anti- <i>N. caninum</i> , em propriedades do estado do Pará, 2008.....	50
Mapa 1 - Municípios amostrados.....	34

Quadro 1 - Demonstração de trabalhos, para pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum*, realizado em diferentes espécies animais, localidades e testes diagnósticos. .... 17

Quadro 2 - Demonstração de trabalhos, para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, realizado em diferentes espécies animais, localidades e testes diagnósticos. .... 28

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Número e porcentagem de búfalas examinadas segundo o município e a propriedade rural no estado do Pará, 2008..... 35
- Tabela 2 - Frequência de anticorpos anti-*N. caninum* em búfalas reagentes e não reagentes na RIFI, de acordo com as propriedades rurais e Municípios do estado do Pará, 2008..... 47
- Tabela 3 - Distribuição dos soros de búfalas de acordo com os resultados das provas de RIFI e ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum*. ..... 50
- Tabela 4 - Número de búfalas reagentes na RIFI e no ELISA indireto, para anticorpos anti-*N. caninum*, em propriedades do estado do Pará, 2008.. 51
- Tabela 5 - Comparação de resultados obtidos na RIFI e no ELISA indireto para anticorpos anti-*N. caninum* por fazendas estado do Pará, 2008..... 52
- Tabela 6 - Número de búfalas reagentes para toxoplasmose na RIFI de acordo com a fazenda e a titulação (64 a 1024), estado do Pará, 2008..... 53

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	15
2.1. NEOSPOROSE .....	15
2.1.1. Definição .....	15
2.1.2. Histórico .....	15
2.1.3. Etiologia .....	16
2.1.4. Epidemiologia .....	17
2.1.5. Ciclo de Vida e Transmissão .....	19
2.1.6. Sinais Clínicos .....	21
2.1.7. Alterações Patológicas .....	21
2.1.8. Diagnóstico .....	22
2.1.9. Tratamento e Profilaxia .....	24
2.1.10. Saúde Pública .....	25
2.2. TOXOPLASMOSE .....	26
2.2.1. Definição .....	26
2.2.2. Histórico .....	26
2.2.3. Etiologia .....	27
2.2.4. Epidemiologia .....	28
2.2.5. Ciclo de Vida e Transmissão .....	29
2.2.6. Sinais Clínicos .....	30
2.2.7. Diagnóstico .....	31
2.2.8. Tratamento e Profilaxia .....	31
2.2.9. Saúde Pública .....	32
3. METODOLOGIA .....	33
3.1. ÁREA DE ESTUDO .....	33
3.2. ANIMAIS .....	34
3.3. COLETA DAS AMOSTRAS .....	35
3.4. PROVAS SOROLÓGICAS .....	36
3.4.1. Neosporose .....	36
3.4.1.1. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) .....	36
3.4.1.2. Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA) .....	39

3.4.1.3. Cálculos dos Resultados no ELISA.....	42
3.4.2. Toxoplasmose .....	43
3.4.2.1. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) .....	43
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
4. RESULTADOS.....	47
5. DISCUSSÃO.....	54
6. CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXOS.....	72
ANEXO 1.....	73
ANEXO 2.....	85
ANEXO 3.....	86

## 1. INTRODUÇÃO

A neosporose é uma doença parasitária que acomete bovinos, suínos, ovinos, animais silvestres, cães, gatos e búfalos, podendo causar distúrbios reprodutivos e neurológicos (DUBEY et al., 1998a; HUONG et al., 1998; VENTURINI et al., 1999; HELMICK et al., 2002; DUBEY et al., 2003; BRESCIANI et al., 2007).

Estes distúrbios também estão relacionados à redução significativa no ganho de peso e na deficiência alimentar de bezerros bovinos, pós-desmame (BARLING et al., 2001).

Esta enfermidade foi descrita pela primeira vez em 1988, até então era confundida com a toxoplasmose, devido à proximidade taxonômica do *Neospora caninum* com o *Toxoplasma gondii* (DUBEY et al., 1988a).

A toxoplasmose é uma infecção parasitária cosmopolita de comum ocorrência na população humana e em animais, cujo agente etiológico é o *T. gondii*, parasita que infecta qualquer vertebrado terrestre homeotérmico. Este atua como hospedeiro intermediário, exceto os membros da Família *Felidae*, que exercem papel fundamental na perpetuação deste agente por serem os hospedeiros definitivos (DUBEY, 1994; DUBEY et al., 2004).

A toxoplasmose também é uma preocupação importante em pacientes imunocomprometidos (transplantados, quimioterápicos, portadores de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), e é causa de aborto e encefalite em animais domésticos e selvagens (McALLISTER, 2005).

Devido à similaridade entre o *N. caninum* e o *T. gondii* foi necessário desenvolver testes específicos que diferencie estes agentes, garantindo um diagnóstico rápido, específico e sensível para animais com neosporose e toxoplasmose (ROMERO; FRANKENA, 2004).

No estado do Pará, existe apenas um trabalho sobre a neosporose em bubalinos publicado no ano de 2005 por Gennari e colaboradores, no qual demonstram a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em búfalas procedentes de três fazendas, utilizando a RIFI, como teste padrão.

No que se refere à Toxoplasmose, apenas Barros et al. (1999), descreveu a presença de anticorpos contra este agente, através do ELISA e Teste de Aglutinação em látex (LAT).

De acordo com Barbosa (2005), o estado do Pará ainda possui muitos entraves à produção racional de búfalos. No entanto, alguns criadores já vêm desenvolvendo trabalhos isolados, visando à melhoria dos rebanhos.

Segundo Dubey et al. (1998b) o búfalo é muito importante para o desenvolvimento agropecuário de vários países, justificando-se assim a importância de estudos que verifiquem a participação do mesmo na transmissão da neosporose e toxoplasmose.

A despeito de carências de informações, referente ao estado do Pará, é importante a realização de inquéritos soros-epidemiológicos para obtenção de dados que confirme a presença de animais soronegativos e/ou soropositivos contra o *N. caninum* e *T. gondii*, viabilizando estratégias de controle epidemiológico do rebanho bubalino paraense.

Com este intuito, o presente trabalho vem contribuir para determinar a presença de anticorpos contra *N. caninum* e *T. gondii* em fêmeas bubalinas oriundas do estado do Pará, verificando a ocorrência de búfalas sororreagentes para ambos protozoários, através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI); demonstrando o número de municípios com búfalas sororreagentes para *N. caninum* e *T. gondii*; determinando a ocorrência de fêmeas bubalinas soropositivas para neosporose utilizando o Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA); e paralelamente realizar uma comparação entre as provas de RIFI e ELISA em amostras de soro de búfalas, para detecção de anticorpos anti-*N. caninum*.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. NEOSPOROSE

#### 2.1.1. Definição

A neosporose é uma enfermidade contagiosa causada pelo *Neospora caninum*, um protozoário formador de cistos em tecidos de animais, tendo como hospedeiro definitivo o cão. Até 1988 era confundido com *T. gondii*, devido as suas estruturas similares, porém os agentes são distintos em sua ultra-estrutura, imunogenicidade e patogenicidade ao hospedeiro (DUBEY et al., 1988a; RAGOZO et al., 2003).

#### 2.1.2. Histórico

O primeiro comunicado da neosporose refere-se a um protozoário com características semelhante à do *T. gondii*, causando encefalomielite e miosite em cães entre dois a seis meses de idade, que apresentavam desordens neurológicas. Este organismo foi encontrado em lesões do sistema nervoso central (SNC) e músculos destes cães, soronegativos para toxoplasmose (BJERKAS et al., 1984).

Em 1988, este mesmo agente observado por Bjerkas e colaboradores em 1984, foi encontrado em 10 cães nos Estados Unidos, após estudos mais detalhados, chegou-se a conclusão de se tratar de um novo agente, sendo nomeado a partir de então, *N. caninum* (DUBEY et al., 1988a).

Um ano depois, este parasito foi identificado como agente causador de abortamentos em bovinos, por estar presente em diversos tecidos de abortos (THILSTED; DUBEY, 1989).

De acordo com Gondim et al. (2007), até o momento não existe confirmação do *N. caninum* como causador de abortamento em búfalas, entretanto não descartaram esta possibilidade, sendo necessárias maiores investigações sobre a ação deste agente em distúrbios reprodutivos.

### 2.1.3. Etiologia

Estudos morfológicos realizados por microscopia eletrônica verificaram que o *N. caninum* tem estruturas típicas da Família Sarcocystidae, subclasse Coccidiasina, Filo Apicomplexa (ELLIS et al., 1994).

Os estágios de infecção conhecidos do *N. caninum* são semelhantes ao do *T. gondii*, apresentando taquizoítos, cistos nos tecidos contendo os bradizoítos e oocistos (DUBEY, 2003b).

Os taquizoítos do *N. caninum* são lanceolados em forma de lua ou globulares, com aproximadamente 6 x 2µm, podendo ser encontrados parasitando diversas células do hospedeiro definitivo e intermediário (DUBEY, 2003b).

Os cistos de *N. caninum* presentes nos tecidos são circulares ou ovais maiores que 65µm de diâmetro, com parede cística acima de 4,5µm de espessura, sendo encontrados no sistema nervoso central, nervos periféricos, retina e músculo. (DUBEY et al., 2004).

Barr et al. (1991) encontraram, na secção de cistos de *N. caninum*, bradizoítos com 5,9 x 1,4µm. Speer et al. (1999), mensuraram 16 bradizoítos com 8,1 x 2µm. Dubey et al. (2004), observaram bradizoítos medindo de 6,5 x 1,5µm, supondo que a variação de tamanho, destes bradizoítos, relatada por diferentes autores, está relacionada à técnica de exame histológico que não foi devidamente descrita.

McAllister et al. (1998) demonstraram que os oocistos do *N. caninum* presente nas fezes de cão não eram esporulados. A esporulação ocorria três a cinco dias após liberação dos mesmos nas fezes, sendo que em cada oocisto havia dois esporocistos e cada esporocisto possuía quatro esporozoítos.

Na microscopia ótica, o oocisto do *N. caninum* possui uma estrutura similar ao oocisto de *T. gondii*, presente em fezes de gatos, tendo 11µm x 12µm, com parede lisa, pouca cor e possuindo de 0,6-0,8µm de espessura (LINDSAY et al., 1999).

#### 2.1.4. Epidemiologia

No Quadro 1, está demonstrado diversos levantamentos sorológicos com a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em diferentes regiões e espécies animais do mundo.

REFERÊNCIA	LOCAL	ESPÉCIE	TESTE
DUBEY et al., 1998a	EUA	Cães	ELISA, NAT, RIFI e PCR
DUBEY et al., 1999a	EUA	Veados	NAT
VENTURINI et al., 1999	Argentina	Bovinos	RIFI e ELISA
HELMICK et al., 2002	Inglaterra	Ovinos e Suínos	RIFI e ELISA
DUBEY et al., 2003	EUA	Lontra, Morsa, Leão Marinho, Foca e Golfinho	NAT
HOANE et al., 2005	Brasil	Eqüinos	ELISA
GAFFURI et al., 2006	Itália	Camurças	RIFI
HURKOVÁ; MODRÝ, 2006; SEDLÁK; BÁRTOVÁ, 2006	Republica Tcheca e Eslováquia	Raposa, Lobo, Chita, Leão indiano, Peixe, Bison europeu e Búfalo africano	RIFI e PCR
SADREBAZZAZ et al., 2006	Irã	Camelos	RIFI
OMATA et al., 2006	Japão	Orca	ELISA e PCR
BRESCIANI et al., 2007	Brasil	Gatos	RIFI

Quadro 1 - Demonstração de trabalhos, para pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum*, realizado em diferentes espécies animais, localidades e testes diagnósticos. (ELISA) ensaio imunoenzimático; (NAT) teste de aglutinação para *Neospora*; (PCR) reação em cadeia mediada pela polimerase; (RIFI) reação de imunofluorescência indireta

Em cães, Franco et al. (2003) obtiveram uma prevalência de 8,3% e Mineo et al. (2004) chegaram a uma ocorrência de 9,2% para anticorpos anti-*N. caninum*.

Levantamentos realizados por Sager et al. (2006) verificaram uma incidência de 7,8%, sendo esta maior em cães que habitam propriedades leiteiras, do que cães residentes na zona urbana. No entanto, Teixeira et al. (2006) afirmam que estes índices, da zona urbana, são maiores em cães de rua, no qual observaram 45% de positividade para neosporose.

Em Pernambuco, 177 cães (28,3%) foram reagentes na RIFI para neosporose (FIGUEREDO et al., 2008).

No Egito, 68% dos búfalos testados apresentaram anticorpos contra o *N. caninum* (DUBEY et al., 1998b). Entretanto, Huong et al. (1998) no Vietnã, verificaram uma prevalência de 1,5% e 5,5% de búfalos e bovinos, respectivamente, sororreagentes para neosporose.

Na Itália, 34,6% dos búfalos testados, foram considerados positivos, sendo que animais adultos apresentavam uma positividade maior quando comparados com os animais jovens (GUARINO et al., 2000).

Análises sorológicas realizadas no Japão encontraram 40,3% de fêmeas bovinas soropositivas para neosporose (KOIWAI et al., 2005).

Levantamentos sorológicos realizados por Yu et al. (2007), na República da China, não encontraram búfalos soropositivos para *N. caninum*, entretanto em fêmeas de bovinos a soroprevalência contra *N. caninum* foi de 17,2%.

Trabalhos realizados no Brasil também têm demonstrado a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em bubalinos e bovinos, sendo que na região do Vale do Ribeira-SP, 64% dos búfalos testados foram positivos para esta enfermidade (FUJII et al., 2001). Enquanto que em 12 municípios de São Paulo, 56,0% foram reagentes para *N. caninum* (SOUZA et al., 2001).

Em trabalho realizado por Ragozo et al. (2003), os autores verificaram em bovinos, a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em seis estados brasileiros: Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo, com 28,2%, 29,0%, 22,2%, 14,7%, 20,0% e 23,6% de animais soropositivos, respectivamente, com média de 23,6% de positividade.

No Pará, existe apenas um trabalho realizado por Gennari et al. (2005) demonstrando uma ocorrência de 70,9% nas 196 búfalas testadas, proveniente de três propriedades, onde todas apresentaram animais sororreagentes para *N.*

*caninum*. Os autores não encontram relação significativa entre a idade dos animais e a soroprevalência da doença.

Nas cidades de Registro e Ilha Solteira em São Paulo, 23 das 29 búfalas testadas (79%), foram positivas para neosporose. Sendo que 17 bezerros, nascidos destas 23 búfalas, apresentaram título positivo para *N. caninum*, aos sete meses de idade, sugerindo a manutenção deste agente através da via placentária e/ou via lactogênica (RODRIGUES et al., 2005).

Santos et al. (2005) relataram que 14,3% de vacas, com histórico de abortamento, foram positivas para anticorpos anti-*N. caninum*, no Paraná. Enquanto que na Bahia, 117 búfalos adultos foram testados para neosporose, onde 35,9% foram soropositivos para a mesma enfermidade (GONDIM et al., 2007).

#### **2.1.5. Ciclo de Vida e Transmissão**

O ciclo evolutivo completo do *N. caninum* é desconhecido, mas acredita-se que seja semelhante ao do *T. gondii*. Desta forma, os três estágios conhecidos do parasita são: esporozoítos, contidos nos oocistos; taquizoítos, estágio de multiplicação e bradizoítos, estágio de latência contido no cisto tecidual (DUBEY et al., 2002).

McAllister et al. (1998) verificaram que os cães domésticos são os hospedeiros definitivos e intermediários do *N. caninum*, com o estágio sexual ocorrendo no interior do intestino destes animais.

Além do hospedeiro definitivo, diversos trabalhos demonstraram a participação do bovino (MAREZ et al., 1999), do búfalo (RODRIGUES et al., 2005), e do veado (GAFFURI et al., 2006), como hospedeiros intermediários do *N. caninum*.

O cão se infecta ingerindo tecidos do hospedeiro intermediário contendo cistos de *N. caninum*. Após a ingestão, a parede do cisto é digerida no estômago do cão, liberando os bradizoítos que ao chegarem ao intestino, penetram nas células da parede intestinal, culminando na produção de oocistos (MCALLISTER et al., 1998).

Gondim; McAllister; Gao (2005) verificaram através de infecção experimental, feita em cães, que a idade e a fonte de contaminação (tecidos, cérebro ou medula) podem influenciar na produção destes oocistos eliminados por esta espécie.

A transmissão horizontal nos hospedeiros intermediários ocorre pela ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos eliminados pelo hospedeiro definitivo (ROMERO; FRANKENA, 2004).

Estudos realizados por Davison et al. (2001) confirmaram que a transmissão experimental da neosporose pode ocorrer em bezerros, através da ingestão de colostro ou leite contaminado com taquizoítos, no entanto não encontraram evidências desta transmissão em infecções naturais.

Seguindo esta linha de pesquisa, Moskwa et al. (2007) verificaram a presença de DNA do *N. caninum* em colostro de vacas soropositivas para a neosporose, implicando na possibilidade da contaminação de bezerros através da ingestão de colostro. No entanto, não foi avaliada a infectividade deste parasita mediante a presença de anticorpos IgG anti-*N. caninum* presente neste colostro.

De acordo com Moskwa; Cabaj (2007), a grande quantidade de taquizoítos presentes no colostro ou leite pode potencializar o risco de contaminação através dessa via de infecção.

López-Gatius et al. (2004) observaram casos de neosporose em fazendas que não tinha cães a mais de sete anos. Neste caso considerou a transmissão vertical do *N. caninum* como a principal rota de infecção em rebanhos leiteiros, e colaborando significativamente para manutenção da infecção dentro do rebanho. Os autores, no entanto, não excluíram a possibilidade de contaminação pela raposa.

A via vertical pode ser responsável pela manutenção do parasito nestes rebanhos, visto que Rodrigues et al., (2004), demonstraram, em bezerros de búfalos com um dia de vida, presença de anticorpos anti-*N. caninum*, sendo um indicativo de infecção neonatal.

### 2.1.6. Sinais Clínicos

Tanto o hospedeiro definitivo quanto o intermediário podem ser portadores assintomáticos das formas latentes da neosporose, podendo ser reativadas ou exacerbadas por imunossupressão natural ou iatrogênica (vacinações ou terapias com glicocorticóides) (GIRALDI; BRACARENSE; VIDOTTO, 2001).

Cães jovens positivos para neosporose podem apresentar dificuldade de engolir, paralisia da mandíbula, tetraplegia, disfagia, flacidez e atrofia muscular, tremores de cabeça, ataxia, miocardite e diarreia (BASSO et al., 2005).

No bovino o principal sinal observado na neosporose é o abortamento, que ocorre principalmente entre o quinto e sétimo mês de gestação, sendo que vacas soropositivas estão mais sujeitas ao abortamento que as soronegativas (DUBEY, 2003a; CAMPEIRO et al., 2003) podendo apresentar morte, retenção de placenta, reabsorção ou mumificação do feto; os bezerros podem nascer a termo, com algum sinal clínico ou clinicamente normal, porém, podendo apresentar infecção crônica (FIORETTI et al., 2003; ELENI et al., 2004).

Apesar das altas prevalências de anticorpos nos animais, a frequência da neosporose clínica tem sido pouco registrada, provavelmente devido à doença apresentar sinais clínicos comuns a outras enfermidades (ALMEIDA, 2004).

### 2.1.7. Alterações Patológicas

O *N. caninum* é um parasita intracelular nas formas de taquizoítos e cisto no tecido, podendo causar morte celular devido à multiplicação destes taquizoítos. As lesões são resultantes da reação inflamatória contra o parasita, que podem ocorrer em poucos dias destruindo várias células (DUBEY, 1992).

Alterações macroscópicas e microscópicas observadas no cão incluem encefalite, numerosas áreas focais com malária no cérebro; necrose focal com exsudato e células inflamatórias no pulmão; edema, degeneração e necrose

hepática; miosite; necrose focal no baço, linfonodos e intestino, sendo que a presença dos taquizoítos estava associada a estas lesões. A presença do megaesofago pode estar associada à infecção por *N. caninum* (BASSO et al., 2005).

Em abortos de vacas com neosporose, foram observadas a presença de encefalites multifocais não supurativas, miosite, miocardite e hepatites com ou sem necrose focal, porém estas alterações não são suficientes para fechar o diagnóstico sendo necessária realização de testes como a imunohistoquímica (WOUDA et al., 1997; RAZMI et al., 2007).

Em trabalho realizado por Corbelini et al. (2000), seis dos 30 fetos, provenientes de abortamentos, apresentaram lesões histológicas compatíveis com as causadas por *N. caninum* como: lesões inflamatórias não supurativas, multifocais, compostas por células inflamatórias mononucleares. Alguns dos focos inflamatórios distribuíam-se ao redor de um centro de necrose. Dentre estes seis casos, três foram confirmados pela imunohistoquímica, para *N. caninum*.

### **2.1.8. Diagnóstico**

Nos primeiros anos após a descoberta do *N. caninum*, o diagnóstico era feito através dos sinais clínicos e exames histopatológicos das lesões encontradas no Sistema Nervoso Central (SNC), músculos e fetos abortados, contudo, estes resultados apresentavam problemas com diagnósticos errôneos de toxoplasmose, devido à similaridade entre estes parasitas (DUBEY, 1992).

A cultura e o isolamento são determinantes para confirmação da presença de *N. caninum* no processo patológico (DUBEY et al., 1998a), porém Rodrigues et al. (2004) verificaram que o isolamento do agente é difícil e trabalhoso, necessitando de laboratório especializado para a realização deste cultivo em célula.

De acordo com Okuda et al. (2005), um fator importante para o sucesso do isolamento de *N. caninum*, em cultivo celular, depende da qualidade do material, o qual não pode ser submetido à temperatura de congelamento, não apresentar sinais de autólise e da quantidade do parasita presente nos tecidos.

Além do isolamento do *N. caninum*, Romero; Frankena (2004) destacam a importância da utilização da imunohistoquímica, dos testes sorológicos e de testes moleculares para um diagnóstico específico, sensível e rápido em animais com neosporose.

Os testes de imunohistoquímica são realizados nos tecidos fetais, sendo de excelência, a coleta de cérebro e medula, para identificação do parasito e das lesões, nestes e em outros tecidos (LOPES, 1999).

A neosporose induz a produção de anticorpos pelo hospedeiro (ANDRIANARIVO et al., 2005), proporcionando assim a detecção de animais soropositivos através de testes sorológicos. No entanto, Moore (2005) afirma que a sorologia positiva na vaca indica exposição, mas não necessariamente que o *N. caninum* tenha causado o abortamento, sendo os exames no feto de suma importância para o diagnóstico definitivo.

Diversos testes sorológicos vêm sendo usados no diagnóstico da neosporose, incluindo a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA) e o Immunoblot, porém a RIFI e o ELISA são mais frequentemente utilizados, por serem relativamente mais baratos (ROMERO; FRANKENA, 2004).

Devido os taquizoítos, utilizados nos testes de RIFI, serem intactos, detectam anticorpos direcionados para os antígenos de superfície celular do parasita, sendo estes considerados mais específicos que os componentes intracelulares (TREES et al., 1993).

A RIFI foi o primeiro teste sorológico utilizado para detecção de anticorpos anti-*N. caninum*, ele é considerado um teste de referência (padrão ouro) por apresentar uma boa sensibilidade e especificidade, sendo frequentemente comparado com outros testes (BJORKMAN; UGGLA, 1999). Entretanto Dubey (2003b) afirma que esta técnica não apresenta um ponto de corte definitivo, que se justifica pela incerteza do diagnóstico sorológico em animais cronicamente infectados e da viabilidade dos soros testados.

Entre 1994 e 1995, o diagnóstico da neosporose em cães e em bovinos foi implantado pela técnica de ELISA, que possui uma maior especificidade e sensibilidade no diagnóstico sorológico de vacas infectadas com o *N. caninum*, quando comparado com a RIFI (BJORKMAN et al., 1997).

Outros ELISAs foram desenvolvidos para o diagnóstico da neosporose, sendo que Schares et al. (2000) demonstraram uma maior especificidade devido à

utilização de antígenos de superfície p38 de taquizoítos, para verificar a presença de anticorpos anti-*N. caninum*, em soro de bovinos. Mantendo esta linha de pesquisa, Schares et al. (2005) desenvolveram um ELISA para verificar a presença de anticorpos anti-*N. caninum* no leite de vacas.

A técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) foi utilizada inicialmente por Brindley et al. (1993), para diferenciação do *T. gondii* de outros agentes coccídeos, dentre eles o *N. caninum*. A partir deste trabalho confirmou-se, através da seqüência de DNA, que o *N. caninum* se diferenciava do *T. gondii*, tratando-se de uma espécie diferente.

Desde então, vários PCR foram desenvolvidos com o objetivo de identificar o *N. caninum*, sendo usado para confirmar a presença do parasita em infecções naturais e experimentais. O uso do PCR pode identificar o parasito nos tecidos e fluidos fetais e maternos contaminados (LIDDELL et al., 1999).

O PCR tem uma maior sensibilidade e especificidade, quando comparado com a imunohistoquímica (MAANEN et al. 2004). Por este motivo diversos trabalhos vêm demonstrando a presença do DNA de *N. caninum* em cérebro de cão (BASSO et al., 2005); cérebro de raposas (HURKOVÁ; MODRÝ, 2006); colostro de vacas (MOSKWA et al. 2007); e cérebro de bovinos (RAZMI et al., 2007).

Estudos realizados por Collantes-Fernandez et al. (2006), verificaram que fetos bovinos abortados no primeiro (42 a 120 dias) e segundo (120 a 195 dias) período de gestação apresentam maior probabilidade de serem detectados no PCR, comparado a fetos abortados no terceiro (mais de 195 dias) período de gestação.

### **2.1.9. Tratamento e Profilaxia**

Dubey et al. (1998a) observaram que o uso da clindamicina em cães com neosporose demonstrou ser ineficiente em alguns casos, visto que um animal após o tratamento apresentou cistos e taquizoítos no cérebro, sugerindo que a curta duração do tratamento não pode eliminar os taquizoítos.

Sulfadiazina, Trimetoprim e a Pirimetamina também são utilizados no tratamento de cães com neosporose, embora, a maioria dos tratamentos não seja bem sucedida. Hoje já existem vacinas para bovinos produzidas pela empresa Intervet nos EUA (ANDREOTTI, 2001). No entanto Santos et al. (2005) afirmam que estas vacinas não estão disponíveis para prevenir a eliminação de oocistos pelo cão.

Métodos de controle para o *N. caninum*, incluem seleção de vacas soropositivas, controle do acesso de cães na propriedade, cuidados com a alimentação dos animais da propriedade e controle do material fetal eliminado após o parto (HALL et al., 2005).

Em rebanhos que tenham uma taxa alta de transmissão vertical e uma baixa taxa de transmissão pós-natal, deve-se fazer uma seleção, destes animais infectados, para uma criação controlada; eliminação dos animais infectados ou uma combinação dos dois (FRENCH et al., 1999). No entanto, Hall et al. (2005) afirmaram que estas medidas são práticas somente em rebanhos com uma baixa prevalência de infecção, caso contrário haverá um grande número de animais eliminados.

#### **2.1.10. Saúde Pública**

O *N. caninum* não é considerado patogênico para o homem (DUBEY, 1999), no entanto, Lobato et al. (2005) observaram uma taxa alta de anticorpos, para neosporose, em humanos com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) positiva ou com desordens neurológicas, quando comparado com recém-nascidos e pessoas saudáveis. Estes resultados podem trazer uma preocupação nova, principalmente para os portadores de SIDA.

## 2.2. TOXOPLASMOSE

### 2.2.1. Definição

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial causada por um protozoário, *Toxoplasma gondii*, parasito intracelular obrigatório que infectam células de vertebrados (DUBEY, 1994).

### 2.2.2. Histórico

A toxoplasmose foi descrita primeiramente em 1908 por Nicolle e Manceaux, que observaram o parasita num roedor africano, o gondi (*Ctenodactylus gondi*), a princípio os autores o nomearam de *Leishmania gondii*. No mesmo ano Splendore (1908), no Brasil descreveu o parasito em coelhos. Em 1909, Nicolle e Manceaux renomearam o parasita para *Toxoplasma gondii* (nome derivado da junção dos termos *toxon*, vocábulo grego para aludir ao formato de arco do parasito e *plasma*, vocábulo que significa forma) (NICOLLE; MANCEAUX, 1909 apud UENO, 2005).

O primeiro relato de toxoplasmose clínica em gatos foi em Nova Iorque em 1942, mas, apenas no ano de 1970 seu ciclo biológico foi definido (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970). Sendo que os felídeos, silvestres e domésticos, são os hospedeiros definitivos e neles estão presentes os estágios sexuais do parasito, culminando com a produção e eliminação de oocistos pelas fezes que contaminam o meio ambiente (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

### 2.2.3. Etiologia

O *T. gondii* pertence à Família Sarcocystidae, subclasse Coccidiasina, Filo Apicomplexa. Os estágios de infecção conhecidos do *T. gondii*, são: taquizoítos, cistos nos tecidos contendo os bradizoítos e oocistos (TAYLOR; WEBSTER, 1998; DUBEY, 2006).

Os taquizoítos têm formato de arco ou ovalado, medindo 4,7 x 2,1µm, os quais penetram nas células ativamente ou por fagocitose e se multiplicam rapidamente por endodiogenia dentro do vacúolo parasitóforo. A célula hospedeira se rompe quando não suporta mais o crescimento dos taquizoítos, que então invadem células vizinhas (SPEER et al., 1999; SPEER; DUBEY, 2005).

Os cistos desenvolvem-se, principalmente, dentro do citoplasma das células do sistema nervoso central, nervos periféricos e músculo. Mas também podem ser encontradas em órgãos viscerais. Cistos intactos não promovem reação inflamatória podendo persistir por meses ou talvez por toda a vida do hospedeiro (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998), medindo 70µm de diâmetro, com parede elástica tendo 0,5µm de espessura, dentro destes cistos estão presentes os bradizoítos (HILL et al., 2005).

Segundo Dubey; Lindsay; Speer (1998), estes bradizoítos tem aproximadamente 7 por 1,5µm e são formas de divisão lenta.

Os oocistos de *T. gondii* presentes em fezes de gatos não são esporulados, esta esporulação ocorre três a cinco dias após liberação nas fezes, sendo que em cada oocisto tem dois esporocistos, e cada esporocisto possui quatro esporozoítos (HILL et al., 2005).

## 2.2.4. Epidemiologia

O parasito possui distribuição mundial (DUBEY, 1994), onde o Quadro 2, mostra alguns trabalhos com freqüências de anticorpos anti-*T. gondii* em diferentes regiões e espécies de animais.

REFERÊNCIA	LOCAL	ESPÉCIE	TESTE
Dubey et al., 1999b	Argentina	Cavalos	MAT
Fialho; Araujo, 2003	Brasil	Suínos	HAI
Dangolla et al., 2006	Siri Lanka	Elefantes	MAT
Dubey et al., 2003	EUA	Lontra, Morsa, Leão marinho, Foca e Golfinho	MAT
Sadrebazzaz et al., 2006	Irã	Camelos	RIFI
Hurková; Modrý, 2006	Republica Tcheca	Raposas	PCR
Zia-ali et al., 2007	Irã	Ovelhas, Cabras, Galinhas, Patos e Gatos	LAT e PCR
Figueredo et al., 2008	Brasil	Cães	RIFI
Waap et al., 2008	Portugal	Pombos	DAT e PCR
Dubey et al., 2008a	EUA	Veados	DAT

Quadro 2 - Demonstração de trabalhos, para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, realizado em diferentes espécies animais, localidades e testes diagnósticos.

(DAT) teste de aglutinação direta; (HAI) hemaglutinação indireta; (LAT) teste de aglutinação em látex; (MAT) teste de aglutinação modificado; (PCR) reação em cadeia pela polimerase; (RIFI) reação de imunofluorescência indireta.

Devido à importância epidemiológica do gato, na toxoplasmose, alguns trabalhos vêm demonstrando a freqüência do mesmo em diferentes localidades, com 109 (46%) na Costa Rica (RUIZ; FRENKEL, 1980); 100 (25%) em Araçatuba-Brasil (BRESCIANI et al., 2007); 37 (21,8%) no México (BESNÉ-MÉRIDA et al., 2008) e 140 (24,9%) na Bélgica de gatos com anticorpos anti-*T. gondii* (CRAEYE, et al., 2008).

Diversos levantamentos sorológicos, também foram feitos em búfalos e bovinos, para demonstrar a presença de anticorpos anti-*T. gondii*.

No Vietnã, Huong et al. (1998) verificaram anticorpos contra *T. gondii* em 3% dos búfalos e em 10,5% das vacas. No Irã, 34 dos 385 (8,8%) búfalos, reagiram positivamente para a toxoplasmose (NAVIDPOUR; HOGHOOGHI-RAD, 1998).

Levantamentos sorológicos realizados por Yu et al. (2007), na República da China, não encontraram nenhum dos 40 búfalos soropositivos para o *T. gondii*. Entretanto, em vacas, a soroprevalência para o parasito foi de 2,3%.

No Brasil, trabalhos realizados por Gondim et al. (1999a) na Bahia, encontraram uma frequência de 3,85%, enquanto que, na região do Vale do Ribeira-SP, sete dos 122 (3,2%) animais testados foram positivos para toxoplasmose (FUJII et al., 2001), em outros 12 municípios de São Paulo, 205 de 411 búfalos (49,9%) reagiram contra *T. gondii* (SOUZA et al., 2001).

No Pará, Barros et al. (1999) encontraram, respectivamente, 12,2% (15/123) e 22,8% (28/123) de búfalos sorologicamente positivos, utilizando o ELISA e o LAT, respectivamente. A proporção de propriedades com animais infectados foi de 42,8% pelo teste ELISA, ou seja, seis das 14 fazendas examinadas e 71,4% (10/14) pelo LAT.

### **2.2.5. Ciclo de Vida e Transmissão**

Os três estágios unicelulares infectantes do parasito são: os taquizoítos, os bradizoítos contidos nos cistos teciduais e os oocistos. As duas primeiras são formas assexuadas, presente em vários tecidos do hospedeiro intermediário e definitivo, enquanto a última é a forma sexuada presente apenas no intestino do hospedeiro definitivo (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

A ingestão de comida ou água contaminada com oocistos de fezes de gato ou a ingestão de cistos de tecido presente no alimento animal, são as duas maiores vias de transmissão, pós-natal, do *T. gondii* (DUBEY, 1998).

Os felídeos são os hospedeiros definitivos do *T. gondii* que após a ingestão dos cistos teciduais, ocorre liberação dos bradizoítos no intestino do felino que se diferenciam em outras formas, formando várias gerações do parasito culminando na

produção de gametas masculinos e femininos, iniciando a fase sexuada da reprodução e originando o oocisto, que são eliminados nas fezes 3-10 dias após a ingestão dos bradizoítos (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970; JEWELL et al., 1972; DUBEY, 1998).

Hospedeiros intermediários geralmente se infectam pela ingestão de oocistos, com liberação do esporozoítos, no intestino, onde se diferenciam em taquizoítos, que se disseminam pelo sangue, linfa e depois se diferenciam em bradizoítos, formando cistos no tecido; ou ingerindo bradizoítos, estes se diferenciam em taquizoítos e novamente em bradizoítos para encistarem-se em tecidos (HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005).

Outra via de infecção é a transplacentária ocorrendo quando o animal se infecta, pela primeira vez durante a prenhez (DUBEY et al., 2008b).

#### **2.2.6. Sinais Clínicos**

Os gatos geralmente não apresentam sinais clínicos quando parasitados pelo *T. gondii* e raramente acontecem manifestações clínicas severas. No entanto, sinais clínicos como letargia, distúrbios neurológicos, miosites, anorexia, dispnéia causada por pneumonia e uveíte, podem estar presente (DUBEY; FENNER, 1993).

Em bovinos, a toxoplasmose pode causar aborto, no entanto este sinal clínico não tem sido indicado como fator importante nesta espécie (OGAWA et al., 2005), porém, Buxton et al., (2007), afirmam que o *T. gondii* é um importante causador de aborto em ovinos.

### 2.2.7. Diagnóstico

Os testes para o diagnóstico da toxoplasmose podem ser de forma indireta através da sorologia, ou de forma direta por meios de demonstração da presença do agente, seja por PCR ou isolamento do *T. gondii* em inoculação feitas em camundongos ou culturas celulares (MONTROYA; LIENSENFELD, 2004). A técnica de PCR é o teste direto, mais recente utilizado nos laboratórios (MORÉ et al., 2008).

A RIFI é um método de baixo custo, de fácil execução e que apresenta boa especificidade e sensibilidade (CAMARGO, 1974). Sendo que o testes de RIFI, assim como os de aglutinação, utilizam o parasito integro para demonstrar anticorpos contra este antígeno (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

Segundo Moré et al. (2008), o teste Imunoenzimático (ELISA), também é amplamente utilizado no diagnóstico da toxoplasmose.

Porém, Klevar (2007), afirma que o diagnóstico da toxoplasmose como causa de aborto depende do quadro clínico e da análise pós-morte do feto, sendo necessário uma investigação para identificação do agente através da imunohistoquímica ou PCR, para confirmação do abortamento pelo *T. gondii*.

### 2.2.8. Tratamento e Profilaxia

As sulfonamidas e pirimetamina podem ser utilizados como quimioterápicos no tratamento da toxoplasmose em cães, gatos e cabra (ARAÚJO; SILVA; LANGONI, 1998; RAMADAN; ABDEL-MAGEED; KHATER, 2007).

Além do tratamento é importante a adoção de medidas de controle populacional de gatos errantes a fim de reduzir a contaminação do ambiente com oocistos, já que gatos errantes usam a terra para eliminar seus dejetos (HILL; DUBEY, 2002).

Não permitir o acesso de gatos em granjas de suínos, salas de ordenhas, depósito de farelos, rações, grãos e nos comedouros. Outras medidas incluem a

remoção imediata seguida de incineração ou enterro de abortamentos e membranas fetais (DUBEY, 1994; VENTURINI et al., 2004).

### 2.2.9. Saúde Pública

Acredita-se que um terço da população mundial tenha sido infectada pelo *T. gondii*, entretanto em pessoas imunocompetentes a toxoplasmose, via de regra, assume caráter benigno, pois o rápido desenvolvimento de imunidade celular e humoral restringem eficientemente a ação patogênica do parasito (CAMARGO, 1995; KIJLSTRA; JONGERT, 2008).

No entanto, mesmo em pacientes sem comprometimento imunológico a toxoplasmose vem sendo associada a linfadenopatia, febre, fraqueza, debilidade, oftalmite, infecções multisistêmicas e recentemente à esquizofrenia e outras desordens psiquiátricas (MCALLISTER, 2005).

Com o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), observou-se um crescimento de infecções oportunistas, principalmente pela toxoplasmose cerebral e pulmonar, decorrente de distúrbios na imunidade deste pacientes (RICHARDS; KOVACS; LUFT, 1995; PETERSEN et al., 2006).

No homem, fatores como: as freqüentes faltas de boas práticas de manipulação e consumo de alimentos contaminados; presença de gatos domésticos ou de rua; contato com solo em jardins e hortas; consumo de água não tratada; manipulação de carnes cruas diariamente; consumo de carne mal passada e não higienização de frutas ou hortaliças representam riscos de infecção oral pelo *T. gondii* (BRAGA; MAIMONI; MACHADO, 2007).

Porém, Kijlstra; Jongert (2008), afirmam que o congelamento, o uso de tecnologias de irradiação, altas temperaturas e pressão, são alternativas importantes para garantir alimentos mais seguros. Entretanto a influência de culturas e religiões pode predispor a uma infecção, devendo-se adequar medidas preventivas a estes diferentes hábitos sociais e regionais do mundo.

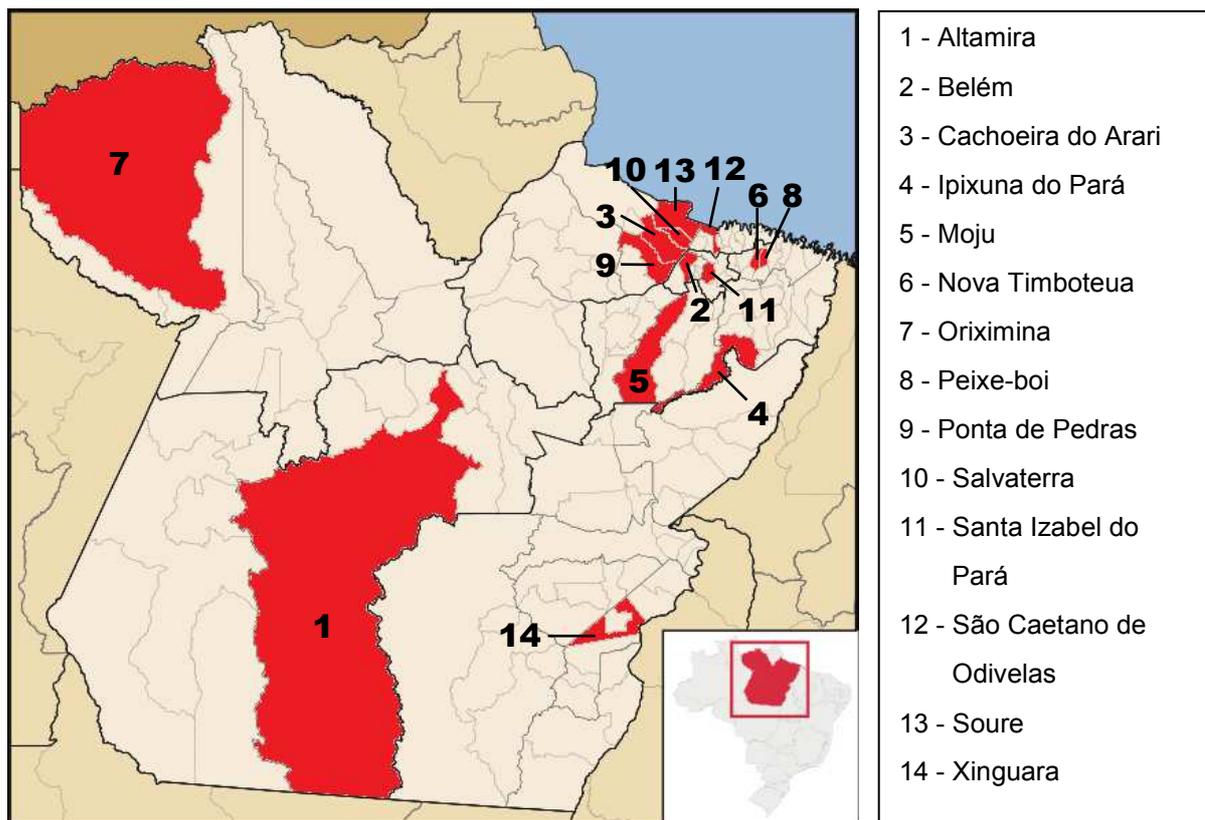
### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. ÁREA DE ESTUDO

O estado do Pará compreende uma área de 1.247.683,515Km<sup>2</sup>, está dividido geograficamente em cinco circuitos pecuários (Baixo Amazonas, Marajó e Metropolitana de Belém, Nordeste, Sudoeste e Sudeste Paraense) e possui uma população de búfalos estimada em 336.868 animais (IBGE, 2006).

Na presente pesquisa foram coletadas amostras em 15 propriedades rurais pertencentes a 14 municípios (Mapa 1) localizados entre estes cinco circuitos pecuários que adotam sistema extensivo, visando a produção de animais para corte e leite.

Estas propriedades foram escolhidas sem comprometimento estatístico, por conveniência, levando-se em consideração custos, acesso junto ao proprietário e tempo de execução da coleta.



Mapa 1 - Municípios amostrados.  
Fonte: WIKIPEDIA, 2008

### 3.2. ANIMAIS

Dentro de cada propriedade foram selecionadas aleatoriamente apenas fêmeas adultas com idade entre dois a dez anos, de diferentes raças (Murrah, Mediterrâneo, Carabao, Jafarabadi) e mestiços (Tabela 1).

A amostragem de fêmeas testadas foi realizada de acordo com a fórmula (THRUSFIELD, 2004):

$$n = \frac{P_{esp} (1 - P_{esp})}{d^2}$$

Onde:

$n$  = tamanho necessário da amostra

$P_{esp}$  = prevalência esperada (50%)

$d$  = precisão absoluta desejada (95%)

Tabela 1 - Número e porcentagem de búfalas examinadas segundo o município e a propriedade rural no estado do Pará, 2008.

MUNICÍPIO	PROPRIEDADE RURAL	Nº	%
Xinguara	1	50	12,47
Altamira	2	20	4,99
Salvaterra	3	29	7,23
Santa Izabel do Pará	4	13	3,24
Oriximina	5	30	7,48
São Caetano de Odivelas	6	07	1,75
Moju	7	23	5,74
Soure	8	32	7,98
Cachoeira do Arari	9	12	2,99
Ponta de Pedras	10	19	4,74
Peixe-boi	11	44	10,97
Ipixuna do Pará	12	28	6,98
Salvaterra	13	25	6,24
Belém	14	27	6,73
Nova Timboteua	15	42	10,47
<b>TOTAL</b>		<b>401</b>	<b>100</b>

### 3.3. COLETA DAS AMOSTRAS

Foram coletados 15 mL de sangue da veia jugular direita ou esquerda dos animais, utilizando agulhas descartáveis (40 x 12 mm), acopladas em tubos *vacuntainer* sem anti-coagulante devidamente identificados. Após a coleta, os tubos foram mantidos em repouso em temperatura ambiente e protegidos da luz, para a

retração do coágulo e obtenção do soro sanguíneo. Posteriormente os mesmos foram transferidos para microtubos (tipo *Eppendorf*), previamente identificados, e encaminhados sob refrigeração ao Laboratório de Investigação e Diagnóstico de Enfermidades Animais - LIDEA da Universidade Federal do Pará - UFPA, onde ficaram congelados, a -20°C, até o momento dos testes.

### 3.4. PROVAS SOROLÓGICAS

#### 3.4.1. Neosporose

##### 3.4.1.1. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

O teste foi realizado no Laboratório de Bacterioses do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE. Dentre as 401 amostras de soro coletadas apenas 374 foram testadas na RIFI para neosporose, sendo que, 27 amostras referentes à fazenda 14, não foram processadas devido a problemas na produção de antígenos. A RIFI foi realizada segundo metodologia preconizada por Souza et al. (2001).

- Preparo das lâminas

Para a pesquisa de anticorpos contra *N. caninum* utilizou-se lâminas para imunofluorescência com 12 círculos (extremidade fosca) contendo taquizoítos íntegros de *N. caninum* da cepa NC-1 (DUBEY et al., 1988b), produzidos a partir de

suspensões de taquizoítos que foram depositados em garrafas contendo uma monocamada de células Vero. Após a multiplicação dos mesmos nas células, utilizou-se uma haste de borracha (*scraper*) estéril para remoção de células infectadas e dos taquizoítos livres, que foram depositados em uma nova garrafa e assim sucessivamente. As lâminas contendo o substrato antigênico foram conservadas em caixas de polipropileno a -20°C até o momento do uso.

- Triagem

Utilizou-se como ponto de corte, na prova de RIFI, uma diluição única dos soros testes, soros controles positivos e negativos em 1:200 de acordo com as recomendações descritas por Guarino et al. (2000) e Gondim et al. (2007). Nos quais as amostras foram diluídas em solução salina tamponada (SST) com fosfato em pH 7,2. Posteriormente acrescentou-se 20 µL do soro diluído em cada poço da lâmina (Figura 1), previamente sensibilizada com o *N. caninum*. Em seguida cada lâmina foi colocada em câmara úmida e deixada para incubar por 30 minutos em estufa a 37°C. Decorrido este período, as lâminas foram submetidas a três lavagens com duração de cinco minutos cada. As lavagens foram realizadas por imersão em uma cuba de vidro contendo SST com fosfato, pH 7,2 e, posteriormente as lâminas foram secas em estufa a 37°C. Em seguida, em cada poço colocou-se 20 µL do conjugado (IgG de coelho contra IgG de bovino, marcada com isotiocianato de fluoresceína - Sigma/F-7887), contendo azul de Evans a 0,01%, previamente diluído a 1:450 e novamente as lâminas foram incubadas a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Posteriormente as lâminas foram lavadas como descrito anteriormente e colocadas para secar. A montagem das lâminas foi feita com lamínulas (24 x 60 mm) e glicerina tamponada em pH 8,0. Em cada lâmina foi possível testar no máximo dez animais além dos controles positivo e negativo.

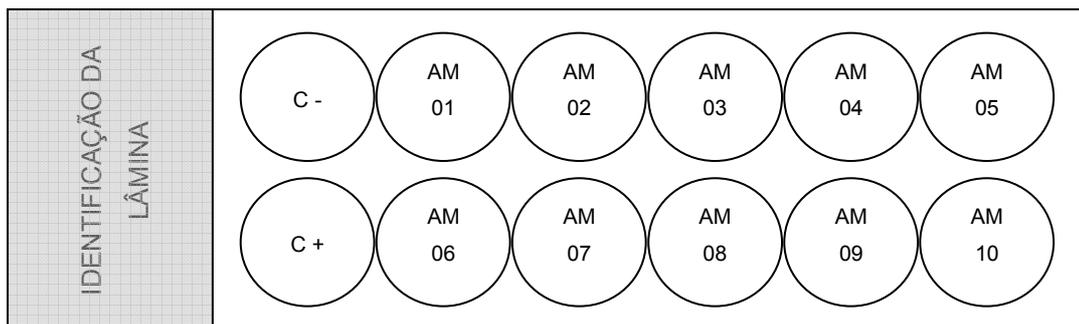


Figura 1 - Layout da lâmina de RIFI para neosporose (triagem); (C -) Controle negativo; (C +) Controle positivo; (AM) Amostra testada.

- Titulação

As amostras de soros reagentes na triagem, na diluição inicial 1:200, foram submetidas à titulação em diluições seriadas na razão dois até a obtenção da maior diluição positiva na RIFI. O título do soro foi a recíproca da maior diluição que apresentou resultado positivo.

A diluição dos soros foi realizada em serie na razão dois: 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:3200, em solução salina tamponada (SST) com fosfato e pH 7,2. Foram adicionados 20 µL do soro diluído em cada poço da lâmina (Figura 2) repetindo assim o mesmo procedimento descrito na triagem, a partir da primeira incubação em câmara úmida por 30 minutos em estufa à 37°C. Os soros controle positivo e negativo foram diluídos apenas em 1:200. Em cada lâmina foi possível titular até dois animais além dos controles positivo e negativo.

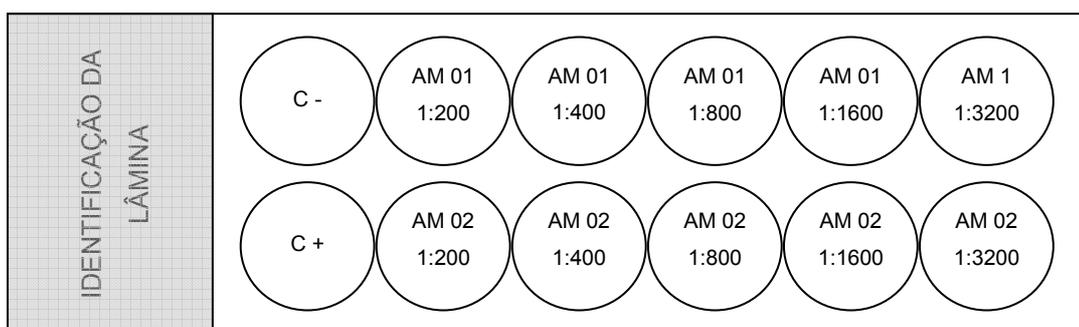


Figura 2 - Layout da lâmina de RIFI para neosporose (titulação); (C -) Controle negativo; (C +) Controle positivo; (AM) Amostra testada.

- Leitura e interpretação

A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência (Olympus - modelo BX 60 F5) com aumento de 400X.

Considerou-se como reação positiva a visualização de um verde fluorescente intenso e total na superfície dos taquizoítos, reagentes na diluição inicial 1:200. Para reação negativa foi considerada a ausência de fluorescência ou fluorescência apical parcial.

#### 3.4.1.2. Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA)

As análises foram processadas utilizando o *kit* comercial HerdChek Anti-*Neospora caninum* (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, USA) destinado a detectar a presença de anticorpos contra *N. caninum* em soro bovino. Um formato de microtitulação foi desenvolvido no qual os antígenos de *N. caninum* foram revestidos previamente na microplaca de 96 cavidades. A técnica foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (IDEXX Laboratories) no Laboratório de Investigação e Diagnóstico de Enfermidades Animais - LIDEA-UFPA.

Os quatro kits utilizados foram adquiridos através de projeto PROINT/UFPA, sendo que cada *kit* continha duas placas mais os reagentes (Fotografia 1).

Dentre as 401 amostras de soro coletadas, apenas 315 foram testadas no ELISA indireto, visto que o número de placas disponíveis permitia apenas a realização desta quantidade de amostras.



Fotografia 1 - Kit de ELISA, para o diagnóstico de neosporose.

- Procedimento

Inicialmente os soros das búfalas eram diluídos a 1:100 com o diluente que acompanhava o kit do fabricante, posteriormente 100  $\mu$ L desta diluição, foram adicionados em duplicata nas cavidades apropriadas das microplacas (Figura 3). Em seguida, os soros controle positivo e negativo, sem diluente, foram acrescentados também em duplicata, e as placas incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Decorrido o tempo de incubação, foi aspirado o conteúdo de todas as cavidades, que foram lavadas quatro vezes com 300  $\mu$ L da solução de lavagem que acompanhava o kit, estas lavagem foram realizadas automaticamente na lavadora de microplacas (Thermo Plate, Modelo TP-Washer/Tipo B). Após a eliminação dos materiais não ligados, por lavagem das cavidades das placas, 100  $\mu$ L do conjugado anti-IgG bovina: peroxidase raiz forte foram adicionados e as placas incubadas por mais 30 minutos à temperatura ambiente, para que o mesmo se ligasse aos anticorpos das búfalas ligados às cavidades. Em seguida, o conjugado não ligado foi eliminado por nova lavagem, semelhante à descrita acima, após esta última lavagem

se adicionou a quantidade de 100  $\mu\text{L}$  de substrato enzimático (peróxido de hidrogênio -  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) com um cromógeno 3,3',5,5' tetrametilbenzidine (TMB) em cada cavidade e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente.

Finalmente foram acrescentados ao TMB, 100  $\mu\text{L}$  de solução *stop* com a finalidade de estacionar a reação e proceder à medição no leitor de ELISA (Labsystems Multiskan MS - tipo 325) usando-se filtro de 630nm. A coloração subsequente foi proporcional à quantidade de anticorpo presente na amostra.

Para que o ensaio fosse válido, a diferença (P-N) entre a média do controle positivo (PCx) e a média do controle negativo (NCx) deveria ser igual ou maior a 0,150. Além disso, o NCx deveria ser menor ou igual a 0,20.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C -	C -	Am 06	Am 06	Am 14	Am 14	Am 22	Am 22	Am 30	Am 30	Am 38	Am 38
B	C +	C +	Am 07	Am 07	Am 15	Am 15	Am 23	Am 23	Am 31	Am 31	Am 39	Am 39
C	B	B	Am 08	Am 08	Am 16	Am 16	Am 24	Am 24	Am 32	Am 32	Am 40	Am 40
D	Am 01	Am 01	Am 09	Am 09	Am 17	Am 17	Am 25	Am 25	Am 33	Am 33	Am 41	Am 41
E	Am 02	Am 02	Am 10	Am 10	Am 18	Am 18	Am 26	Am 26	Am 34	Am 34	Am 42	Am 42
F	Am 03	Am 03	Am 11	Am 11	Am 19	Am 19	Am 27	Am 27	Am 35	Am 35	Am 43	Am 43
G	Am 04	Am 04	Am 12	Am 12	Am 20	Am 20	Am 28	Am 28	Am 36	Am 36	Am 44	Am 44
H	Am 05	Am 05	Am 13	Am 13	Am 21	Am 21	Am 29	Am 29	Am 37	Am 37	Am 45	Am 45

Figura 3 - Layout da placa de ELISA. (C -) Controle negativo; (C +) Controle positivo; (B) branco; (AM) Amostra testada.

## 3.4.1.3. Cálculos dos Resultados no ELISA

- a) Cálculo da média dos controles negativo (NCx)

$$NCx = \frac{A1 + A2}{2}$$

$$Exemplo: NCx = \frac{0,012 + 0,012}{2} = 0,012$$

- b) Cálculo da média dos controles positivos (PCx)

$$PCx = \frac{B1 + B2}{2}$$

$$Exemplo: PCx = \frac{0,187 + 0,184}{2} = 0,186$$

- c) Cálculo de Validade do Ensaio

$$VE = PCx - NCx$$

$$VE = 0,186 - 0,012 = 0,174$$

- d) Cálculo da razão S/P

$$SP = \frac{amostra - NCx}{PCx - NCx}$$

$$Exemplo: SP = \frac{0,111 - 0,012}{0,186 - 0,012} = 0,568$$

As amostras de soro com razão S/P menor que 0,50 foram classificadas como negativas para anticorpos anti-*N. caninum*. Quando a razão S/P foi igual ou maior a 0,50, as amostras foram classificadas como positivas para anticorpos IgG anti-*N. caninum*.

### **3.4.2. Toxoplasmose**

#### **3.4.2.1. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)**

O teste foi realizado no Laboratório de Bacterioses do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, onde todas as 401 amostras coletadas foram testadas para toxoplasmose de acordo com protocolo descrito por Camargo (1974).

- Preparo das lâminas

No preparo das lâminas, foi utilizada uma suspensão de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* obtidos através de lavado intraperitoneal de camundongos (albinos suíços), infectados experimentalmente para esta finalidade. Cada lâmina continha doze cavidades os quais foram sensibilizadas com 20 µL cada, com suspensão de taquizoítos preparada anteriormente. Posteriormente as lâminas foram deixadas para secar a temperatura ambiente e em seguida acondicionadas em caixas de polipropileno à temperatura de -20°C até o momento do uso.

- Triagem

Foi considerado como ponto de corte, na prova de RIFI, uma diluição única dos soros testes, soros controles positivos e negativos em 1:64 de acordo com as recomendações descritas por Souza et al. (2001), nos quais as amostras foram diluídas em solução salina tamponada (SST) com fosfato em pH 7,2 e posteriormente acrescentou-se 20 µL do soro diluído em cada poço da lâmina (Figura 4), previamente sensibilizada com o *T. gondii*. Em seguida cada lâmina foi colocada em câmara úmida e deixada para incubar por 30 minutos em estufa à 37°C. Decorrido este período as lâminas foram submetidas a três lavagens com duração de 10 minutos cada. As lavagens foram realizadas por imersão em uma cuba de vidro contendo SST com fosfato, pH 7,2 e posteriormente foram secas em estufa à 37°C. Em seguida, em cada poço colocou-se 20µL do conjugado (IgG de coelho contra IgG de bovino, marcada com isotiocianato de fluoresceína - Sigma/F-7887), contendo azul de Evans a 0,01%, previamente diluído a 1:450 e novamente incubadas a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Posteriormente as lâminas foram lavadas como descrito anteriormente e colocadas para secar. A montagem das lâminas foi feita com lamínulas e glicerina tamponada em pH 8,0. Em cada lâmina foi possível testar no máximo dez animais além dos controles positivo e negativo.

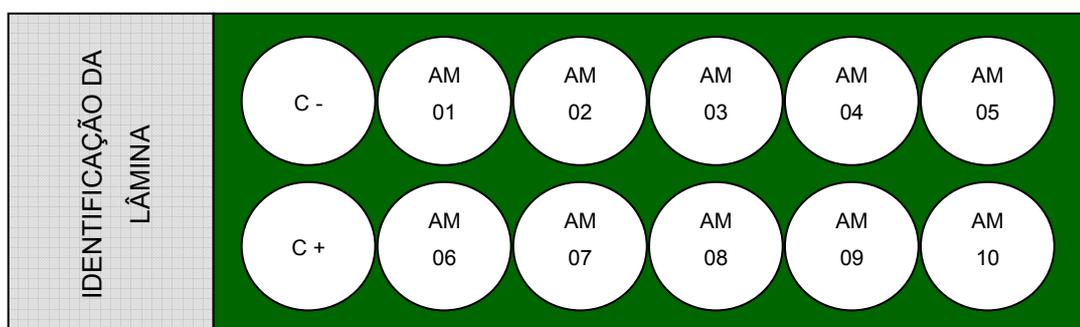


Figura 4 - Layout da lâmina de RIFI para toxoplasmose (triagem); (C -) Controle negativo; (C +) Controle positivo; (AM) Amostra testada.

- Titulação

As amostras de soros reagentes na triagem na diluição inicial 1:64 foram submetidas a titulação em diluições seriadas na razão dois até a obtenção da maior diluição positiva na RIFI. O título do soro foi a recíproca da maior diluição que apresentou resultado positivo.

A diluição dos soros foi realizada em série na razão dois a partir das diluições: 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 e 1:1024 em SST com fosfato e pH 7,2. Foi adicionado 20 $\mu$ L do soro diluído em cada poço da lâmina (Figura 5), repetindo assim o mesmo procedimento descrito na triagem, a partir da primeira incubação em câmara úmida por 30 minutos em estufa à 37°C. Os soros controle positivo e negativo foram diluídos apenas em 1:64. Em cada lâmina era possível titular até dois animais além do controle positivo e negativo.

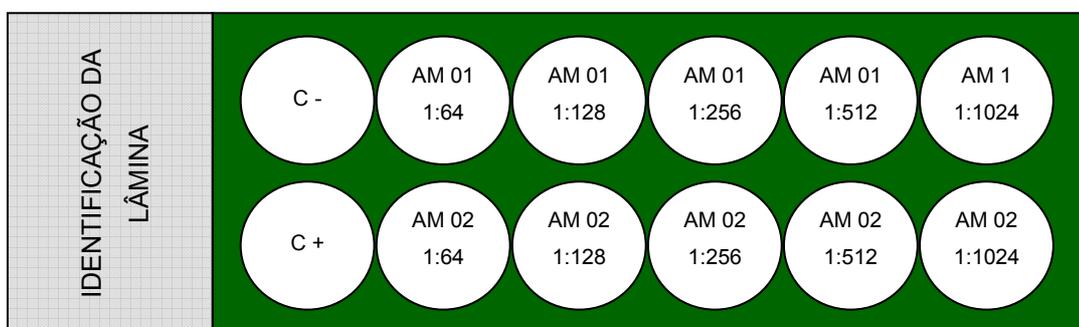


Figura 5 - Layout da lâmina de RIFI para toxoplasmose (titulação); (C -) Controle negativo; (C +) Controle positivo; (AM) Amostra testada.

- Leitura e interpretação

A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência (Olympus - modelo BX 60 F5) com aumento de 400X.

Considerou-se como reação positiva a visualização de um verde fluorescente intenso e total na superfície dos taquizoítos reagentes na diluição inicial 1:64 e negativa a ausência de fluorescência ou fluorescência apical ou parcial.

### 3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O cálculo da média dos controles negativo (NCx) e positivo (PCx), e razão S/P foram realizadas com o software *Microsoft Office Excel 2007 for Windows*<sup>®</sup>.

Trata-se de um estudo de corte transversal onde os dados foram tabulados e tratados estatisticamente pelo percentual simples para verificar a ocorrência de neosporose e toxoplasmose em fêmeas bubalinas do estado do Pará e a diferença entre as fazendas foi verificada pelo teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), quando possível, ou através do teste exato de Fischer, tendo nível alfa de 0,05 utilizando o *software BioEstat 5.0* (AYRES et al., 2007).

Os valores foram agrupados em gráficos para demonstrar o título na RIFI, teste de ELISA indireto e valores de S/P positivos e negativos no ELISA indireto para anticorpos anti-*N. caninum*. Para elaboração destes utilizou-se o software *Microsoft Office Excel 2007 for Windows*<sup>®</sup>.

#### 4. RESULTADOS

Do total de 374 amostras processadas na RIFI, para verificar a presença de anticorpos IgG anti-*N. caninum* observou-se que 153 (40,91%) búfalas foram reagentes e 221 amostras (59,09%) não apresentaram positividade a este agente (Tabela 2, Anexo I).

Com relação à unidade produtora foram consideradas positivas aquelas que contivessem a partir de um animal reagente na RIFI. Desse modo, a ocorrência de rebanhos positivos foi de 100% uma vez que todas as 14 propriedades tiveram pelo menos um animal positivo, com frequência variando de 8% a 84,62% (Tabela 2).

No teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), quando confrontadas, algumas propriedades obtiveram valor de  $p < 0,05$ , caracterizando diferença significativa entre os resultados observados nestas propriedades, para anticorpos anti-*N. caninum* através da RIFI (Anexo II).

Tabela 2 - Frequência de anticorpos anti-*N. caninum* em búfalas reagentes e não reagentes na RIFI, de acordo com as propriedades rurais e Municípios do estado do Pará, 2008.

PROPRIEDA DE RURAL	MUNICÍPIO	ANIMAIS		ANIMAIS NÃO		TOTAL
		REAGENTES		REAGENTES		
		Nº	%	Nº	%	
1	Xinguara	19	38	31	62	50
2	Altamira	10	50	10	50	20
3	Salvaterra	14	48,28	15	51,72	29
4	Santa Izabel do Pará	11	84,62	02	15,38	13
5	Oriximina	24	80	06	20	30
6	São Caetano de Odivelas	03	42,86	04	57,14	07
7	Moju	11	47,83	12	52,17	23
8	Soure	11	34,38	21	65,62	32
9	Cachoeira do Arari	03	25	09	75	12
10	Ponta de Pedras	10	52,63	09	47,37	19
11	Peixe-boi	13	29,55	31	70,45	44
12	Ipixuna do Pará	09	32,14	19	67,86	28
13	Salvaterra	02	8	23	92	25
15	Nova Timboteua	13	30,95	29	69,05	42
<b>TOTAL</b>		<b>153</b>	<b>40,91</b>	<b>221</b>	<b>59,09</b>	<b>374</b>

Fonte: Resultados obtidos através de testes realizados pelo autor desta dissertação.

Os títulos de anticorpos nas 153 búfalas reagentes variaram de 200 a 3200 com animais apresentando título de 200 (40,52%), 400 (22,88%), 800 (20,92%), 1600 (9,15%) e 3200 (6,54%), com o título 200 apresentando a maior frequência (Gráfico 1).

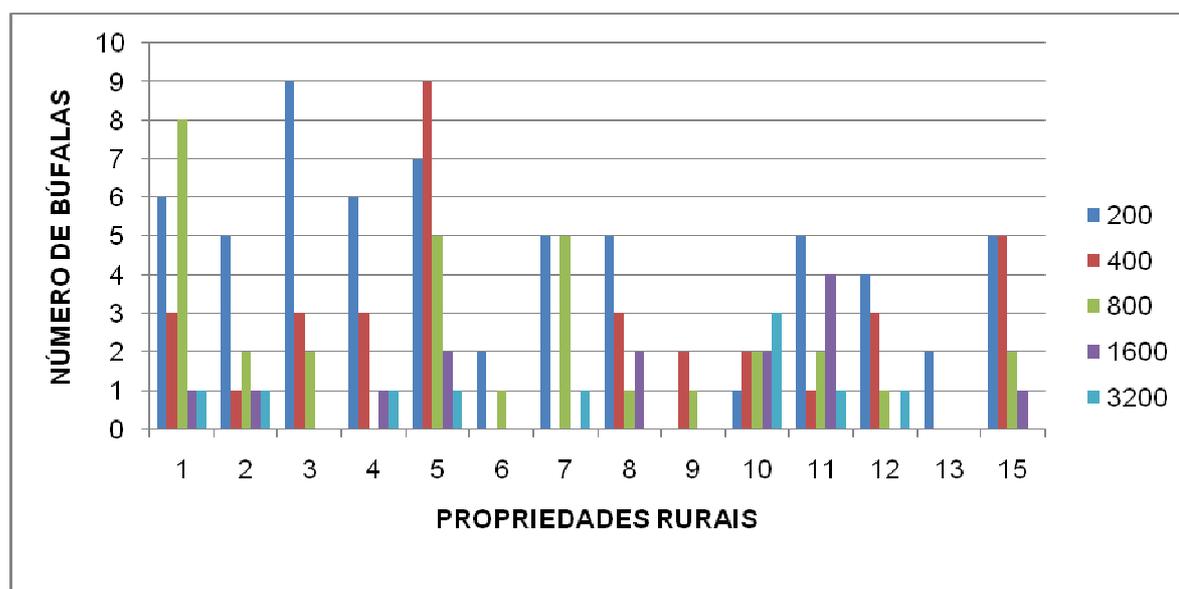


Gráfico 1 - Título de anticorpos anti-*N. caninum*, através da RIFI por fazendas, estado do Pará, 2008. Fonte: Resultados obtidos através de testes realizados pelo autor desta dissertação.

Na determinação de anticorpos IgG para *N. caninum* utilizando o ELISA comercial observou-se que de 315 exames realizados, 53 búfalas (16,82%) reagiram positivamente e 262 (83,18%) não reagiram ao teste ELISA. Os resultados do teste de ELISA indireto estão dispostos no Gráfico 2.

Dentre as 15 propriedades analisadas 12 obtiveram pelo menos uma búfala positiva. Desse modo, a frequência de rebanhos positivos foi de 80%, enquanto que três fazendas (20%) não apresentaram búfalas reagentes no ELISA indireto (Gráfico 2).

No teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), quando confrontadas, algumas propriedades obtiveram valor de  $p < 0,05$ , caracterizando diferença significativa entre os resultados observados nestas propriedades, para anticorpos anti-*N. caninum* através do ELISA indireto (Anexo III).

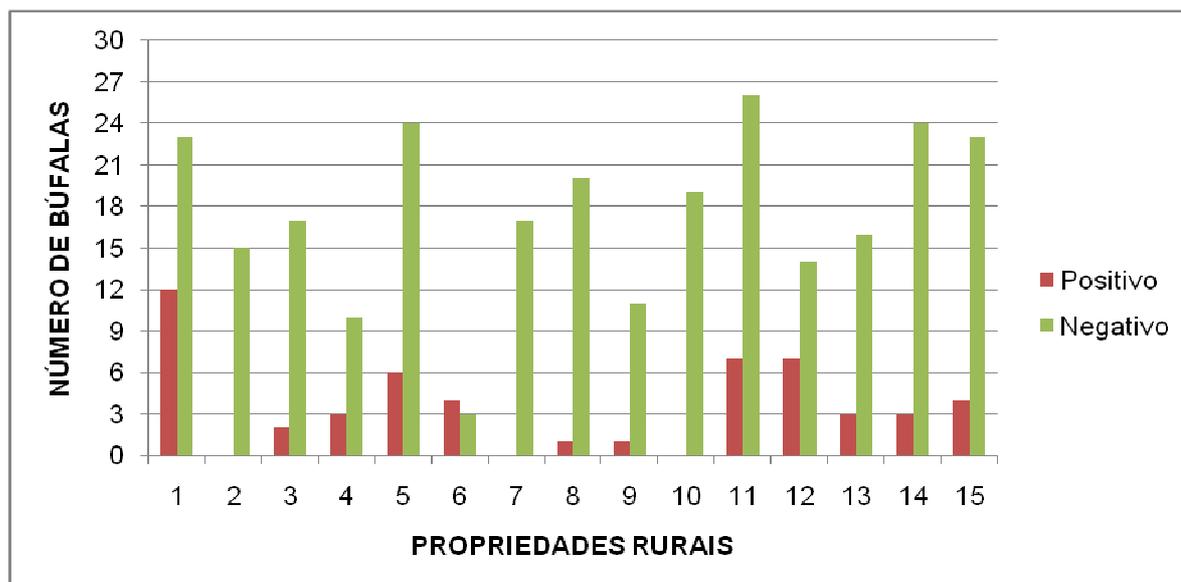


Gráfico 2 - Número de búfalas positivas e negativas no ELISA indireto para anticorpos anti-*N. caninum* em propriedades rurais do estado do Pará, 2008.

Fonte: Resultados obtidos através de testes realizados pelo autor desta dissertação.

As 53 búfalas que obtiveram razão S/P  $\geq 0,50$  foram consideradas positivas para neosporose, com valores variando de 0,50 à 4,821, Gráfico 3.

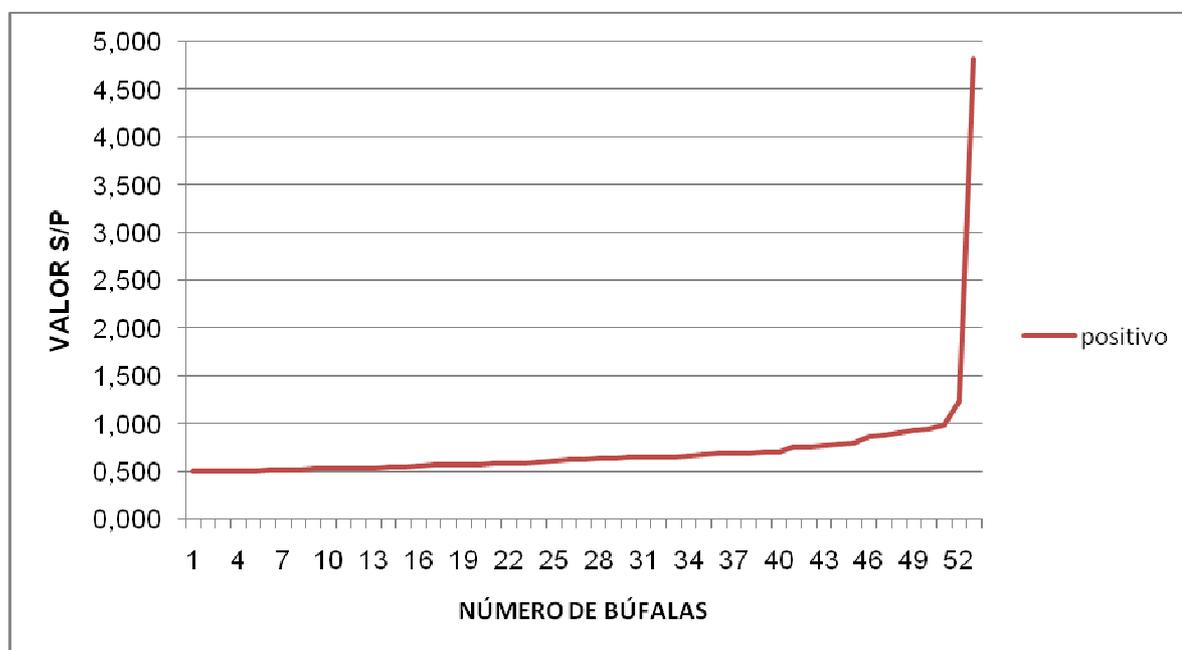


Gráfico 3 - Valores de S/P positivos no ELISA Indireto para anticorpos anti-*N. caninum*, em propriedades rurais do estado do Pará, 2008.

Fonte: Resultados obtidos através de testes realizados pelo autor desta dissertação.

O Gráfico 4 demonstra as 262 búfalas que obtiveram razão S/P < 0,50 e foram consideradas negativas para neosporose, com valores variando de -0,063 à 0,498 (Anexo I).

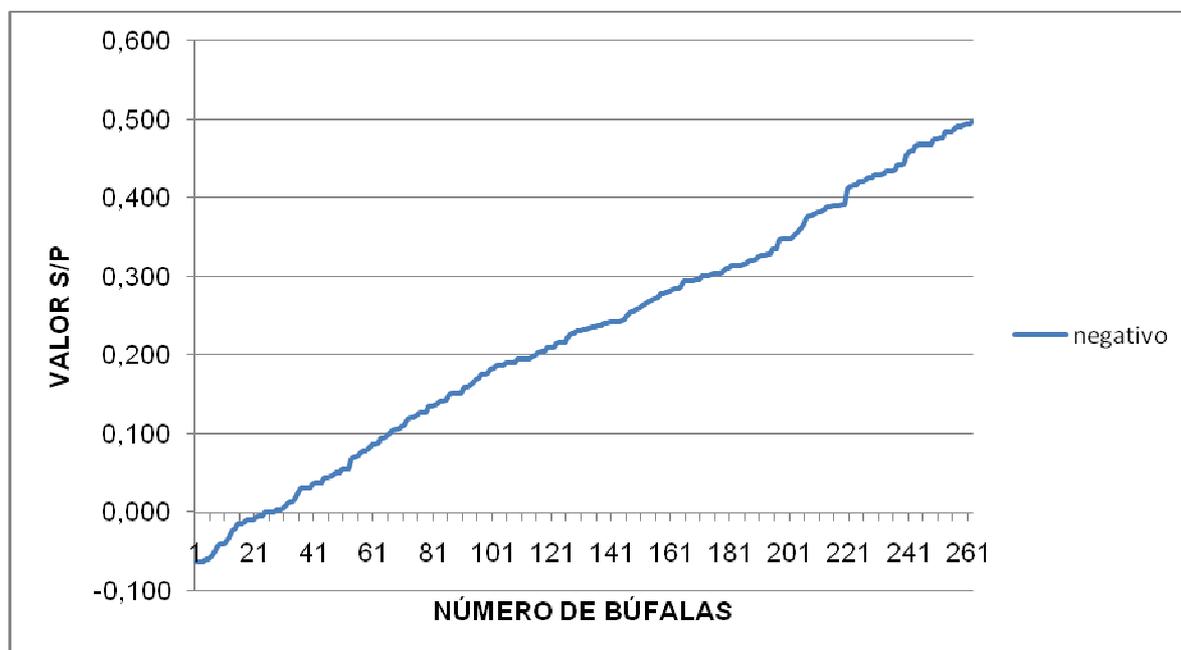


Gráfico 4 - Valores de S/P negativos no ELISA Indireto para anticorpos anti-*N. caninum*, em propriedades do estado do Pará, 2008.

Fonte: Resultados obtidos através de testes realizados pelo autor desta dissertação.

De acordo com os dados da Tabela 3 a porcentagem de concordância dos resultados positivos nas provas de RIFI e ELISA foi de 19,6% (a/a + b) enquanto que 85,1% (d/c + d) foram a porcentagem de concordância dos resultados negativos, totalizando uma porcentagem de concordância de 50,3% (a + d/a + b + c + d). Das amostras testadas, 30 (10,42%) foram positivas em ambos os testes e, 115 (39,94%) foram negativas na RIFI e ELISA.

Tabela 3 - Distribuição dos soros de búfalas de acordo com os resultados das provas de RIFI e ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum*.

		ELISA		TOTAL
		POSITIVO	NEGATIVO	
RIFI	POSITIVO	30 (a)	123 (b)	153 (a + b)
	NEGATIVO	20 (c)	115 (d)	135 (c + d)
TOTAL		50 (a + c)	238 (b + d)	288 (a + b + c + d)

Fonte: Resultados obtidos através de testes realizados pelo autor desta dissertação.

Dentre as 14 propriedades analisadas na RIFI e no ELISA indireto, nove obtiveram pelo menos uma búfala positiva nos dois testes (Tabela 4).

Quando comparado os resultados das búfalas positivas no ELISA com aquelas fêmeas que apresentaram títulos positivos da RIFI (título  $\geq 200$ ), observou-se um declínio no número de animais reagentes à medida que aumentava a titulação na RIFI (Tabela 4).

Tabela 4 - Número de búfalas reagentes na RIFI e no ELISA indireto, para anticorpos anti-*N. caninum*, em propriedades do estado do Pará, 2008.

FAZENDAS	N ° REAGENTES NO ELISA	N° REAGENTES NA RIFI POR TITULO				
		200	400	800	1600	3200
1	8	3	3	1	1	0
3	2	2	0	0	0	0
4	3	1	1	0	1	0
5	4	1	2	0	1	0
6	3	2	0	1	0	0
11	2	2	0	0	0	0
12	3	1	1	0	0	1
13	2	2	0	0	0	0
15	3	2	0	1	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>30</b>	<b>16</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>1</b>

Fonte: Resultados obtidos através de testes realizados pelo autor desta dissertação.

Na Tabela 5 observa-se o número de amostras sororreagentes na RIFI e ELISA indireto; positivas na RIFI e negativas no ELISA; negativas na RIFI e positivas no ELISA e negativas em ambos os testes. As fazendas de número um, três, quatro, cinco, seis, onze, treze e quinze apresentaram valores divergentes nas duas provas sorológicas, no entanto, as fazendas de número dois, sete, oito, nove e dez, apresentaram concordância quando examinadas na RIFI e no ELISA tanto na positividade quanto nos valores negativos nas provas utilizadas na pesquisa.

Tabela 5 - Comparação de resultados obtidos na RIFI e no ELISA indireto para anticorpos anti-*N. caninum* por fazendas estado do Pará, 2008.

FAZENDA	Nº			Nº		Nº		Nº	
	AMOSTRAS	POSITIVAS NA RIFI E ELISA		POSITIVAS NA RIFI E NEGATIVAS NO ELISA		NEGATIVAS NA RIFI E POSITIVAS NO ELISA		NEGATIVAS NA RIFI E ELISA	
	Nº	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	35	8	22,86	11	31,43	4	11,43	12	34,29
2	15	0	0	10	66,67	0	0	5	33,33
3	19	2	10,53	12	63,16	0	0	5	26,32
4	13	3	23,08	8	61,54	0	0	2	15,38
5	30	4	13,33	20	66,67	2	6,67	4	13,33
6	7	3	42,86	0	0	1	14,29	3	42,86
7	17	0	0	11	64,71	0	0	6	35,29
8	21	0	0	11	52,38	1	4,76	9	42,86
9	12	0	0	3	25	1	8,33	8	66,67
10	19	0	0	10	52,63	0	0	9	47,37
11	33	2	6,06	11	33,33	5	15,15	15	45,45
12	21	3	14,29	6	28,57	4	19,05	8	38,1
13	19	2	10,53	0	0	1	5,26	16	84,21
15	27	3	11,11	10	37,04	1	3,7	13	48,15
<b>TOTAL</b>	<b>288</b>	<b>30</b>	<b>10,42</b>	<b>123</b>	<b>42,71</b>	<b>20</b>	<b>6,94</b>	<b>115</b>	<b>39,93</b>

Fonte: Resultados obtidos através de testes realizados pelo autor desta dissertação.

Com relação à detecção de animais reagentes a toxoplasmose, observou-se que do total de 401 amostras processadas apenas quatro búfalas (1%) foram positivas enquanto que 397 (99%) foram negativas.

As búfalas positivas, com título de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, variou de 64 a 128, não havendo animais reagentes nos títulos 256, 512 e 1024 (Tabela 6).

Dentre as 15 propriedades testadas, somente quatro fazendas tiveram pelo menos uma búfala positiva, representando 26,67%, enquanto que 11 fazendas não tiveram nenhum animal positivo (74,33%) (Tabela 6).

Tabela 6 - Número de búfalas reagentes para toxoplasmose na RIFI de acordo com a fazenda e a titulação (64 a 1024), estado do Pará, 2008.

FAZENDA	Nº REAGENTE NA RIFI POR TITULO				
	64	128	256	512	1024
2	1	0	0	0	0
10	0	1	0	0	0
12	1	0	0	0	0
15	1	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Fonte: Resultados obtidos através de testes realizados pelo autor desta dissertação.

No teste Exato de Fischer ( $\chi^2$ ), quando confrontadas, todas as propriedades obtiveram valor de  $p > 0,05$ , não apresentando assim diferença significativa entre os resultados observados nestas propriedades, para anticorpos anti-*T. gondii* através da RIFI.

Apenas uma (0,27%) búfala apresentou anticorpos IgG anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* na RIFI, com títulos 200 e 64, respectivamente.

## 5. DISCUSSÃO

Existem poucos trabalhos demonstrando a freqüência de anticorpos para *N. caninum* e *T. gondii*, em búfalos no mundo e no Brasil, motivo pelo qual o presente trabalho vem contribuir para identificar búfalas sororreagentes para neosporose e toxoplasmose.

As freqüências de anticorpos IgG anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii*, observadas neste trabalho, utilizando a RIFI em soro de fêmeas bubalinas foram de 40,91% e 1% respectivamente.

No que se refere a anticorpos anti-*N. caninum*, resultados menores foram descritos por Guarino et al. (2000) na Itália, com 34,6% dos búfalos positivos através da RIFI com ponto de corte 200. Enquanto que valores maiores foram descritos por Dubey et al. (1998b) no Egito, com uma soroprevalência de 68%, no entanto o mesmo utilizou um teste de aglutinação direta; e na Argentina, por Campero et al. (2007), no qual os pesquisadores encontraram uma freqüência de 64% dos búfalos positivos, porém foi usado o ponto de corte 100 na RIFI.

No Brasil, valores menores foram demonstrados por Gondim et al. (1999b) na Bahia, que evidenciaram 36,5% de búfalos positivos, e quase uma década depois Gondim et al. (2007) descreveram uma freqüência 35,9% também em búfalos na Bahia, onde ambos utilizaram ponto de corte 200.

Valores maiores foram observados em São Paulo por Souza et al. (2001) que verificaram 56,0% de positividade com ponto de corte 200; e Fujii et al. (2001) que encontraram uma soroprevalência de 64% com ponto de corte 25 na RIFI, sendo que o autor relata que se tivesse utilizado o ponto de corte 200, o mesmo utilizado nesta dissertação, sua soroprevalência seria menor (7,27%).

Valores maiores também foram observados em São Paulo por Rodrigues et al. (2005) com 79% de búfalos reagentes para neosporose, e no Estado do Pará por Gennari et al. (2005), que encontraram uma ocorrência de 139 búfalos (70,9%) reagentes para neosporose, ambos utilizaram ponto de corte 25 na RIFI, porém se os autores tivessem iniciado com ponto de corte 200, suas ocorrências seriam menores.

Quando comparado os resultados da toxoplasmose ao presente trabalho, observou-se semelhança a Huong et al. (1998) no Vietnã, onde a prevalência foi de 3%. Resultados superiores foram apresentados por Navidpour; Hoghooghi-rad (1998), no Irã com 8,8% de búfalos reagentes. Entretanto, no Egito e na República da China, não foram observados búfalos com anticorpos anti-*T. gondii* (DUBEY et al., 1998b; YU et al., 2007).

No Brasil valores semelhantes foram observados em búfalos por Gondim et al. (1999a) na Bahia, encontrando uma frequência de 3,85%, e por Fujii et al. (2001) na região do Vale do Ribeira-SP, com 3,2% de animais positivos para toxoplasmose. Enquanto que valores maiores foram encontrados em bubalinos por Barros et al. (1999) no Pará, onde 12,2% (15/123) e 22,8% (28/123) de búfalos foram sorologicamente positivos, utilizando o ELISA e o LAT, respectivamente, e Souza et al. (2001) em São Paulo, com 49,9% de positividade para toxoplasmose.

Dentre as 374 búfalas testadas na RIFI para anticorpos IgG anti-*N. caninum* e *T. gondii*, apenas uma búfala foi positiva em ambas as provas (0,27%), valor este menor quando comparado com Souza et al. (2001), que encontrou reagentes aos dois protozoários 33,9% dos búfalos.

A RIFI é um teste bastante utilizado para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* e foi o primeiro desenvolvido para *N. caninum*, sendo até hoje considerado padrão ouro para estes agentes por apresentar uma boa sensibilidade e especificidade (TREES et al., 1993). Porém, o microscópio utilizado, os reagentes e suas diluições, assim como o conjugado, são fatores que podem afetar o resultado. Além disso, a leitura das lâminas depende da interpretação individual de cada pesquisador, fato que acrescenta certa subjetividade ao teste (ROMAND; THULLIEZ; DUBEY, 1998; BJORKMAN; UGGLA, 1999).

O ponto de corte utilizado na RIFI para o soro de bovinos adultos varia entre os autores, sendo que título de 200 é indicativo de infecção por *N. caninum* (DUBEY et al., 1997), enquanto que em soros fetais, a titulação de 25 é considerada específica no diagnóstico de neosporose (WOUDA; DUBEY; JENKINS, 1997).

Observou-se uma associação ( $p < 0,05$ ) entre as propriedades rurais testadas para neosporose através da RIFI, esta mesma diferença foi descrita por Gennari et al. (2005). De acordo com Faria et al. (2007), isso ocorrer devido a fatores relacionados com temperatura e umidade, que podem contribuir para a manutenção do parasito no ambiente.

O diagnóstico da neosporose, em cães e em bovinos, pode ser realizado pela técnica de ELISA, que possui uma maior especificidade e sensibilidade no diagnóstico sorológico de vacas infectadas com o *N. caninum*, quando comparado com a RIFI (BJORKMAN et al., 1997). Entretanto, não existem testes de ELISA padronizados para bubalinos, sendo nestes casos, utilizados “kits” contendo conjugado de bovino.

No presente trabalho, 53 búfalas (16,82%) reagiram positivamente no ELISA, resultado este maior ao descrito por Huong et al. (1998) no Vietnã, em que ficou demonstrado pelos autores três búfalas (1,5%) reagentes através do ELISA, que posteriormente também foram reagentes na RIFI.

Em outra observação, 30 búfalas (10,42%) foram positivas paralelamente tanto na RIFI quanto no ELISA, sendo este valor menor que o evidenciado no trabalho realizado por Venturini et al. (1999), no qual descreveram 44,2% de bovinos reagente nas duas provas, sendo que Locatelli-Dittrich et al. (2001), utilizando o mesmo ELISA comercial, usado na presente pesquisa, encontraram 60 bovinos positivos no ELISA e na RIFI, porém utilizando uma diluição inicial mais baixa (1:25) e os autores observaram também que a correlação da positividade diminuía na diluição de 200, apresentando assim 42 animais positivos em ambas as provas.

No presente trabalho, foram encontradas 123 búfalas (42,71%) positivas na RIFI e negativas no ELISA, valores este maiores que os observados por Venturini et al. (1999), em que os autores verificaram 1,6%, de bovinos reagentes na RIFI, porém negativos no ELISA.

Dentre as búfalas testadas na RIFI e no ELISA, 20 (6,94%) foram negativas na RIFI, porém positivas no ELISA, resultado menor ao observado por Venturini et al. (1999), com 34,3% de bovinos apresentando a mesma relação.

Foram demonstradas 115 búfalas (39,93%) negativas na RIFI e no ELISA, valor este maior comparado ao trabalho realizado por Venturini et al. (1999), observando 19,7% de bovinos não reagentes nas duas provas.

A discordância de resultados obtidos na RIFI e no ELISA pode ter ocorrido devido à diferença no tipo de anticorpos (policlonais ou monoclonais) mensurada nestes testes (VENTURINI et al., 1999).

Em ambas as provas, RIFI e ELISA, houve uma concordância com 30 búfalas reagentes e 115 búfalas não reagentes demonstrando a capacidade dos testes em detectar animais realmente positivos e animais realmente negativos. No entanto,

esta concordância seria mais bem avaliada caso fosse possível identificar sinais clínicos da enfermidade nos animais examinados por ocasião da coleta das amostras.

Por outro lado, 123 búfalas foram positivas na RIFI e negativas no ELISA. Isso pode ser justificado levando em consideração a maior especificidade do ELISA comparado a RIFI e pelo fato do ELISA trabalhar com partículas fracionadas dos taquizoítos de *N. caninum* (epítomos ou determinantes antigênicos), diferente da RIFI que utiliza taquizoítos íntegros (BJORKMAN et al., 1997; SCHARES et al., 2000).

Em outra observação, 20 búfalas foram negativas na RIFI, porém positivas no ELISA, isso pode ter ocorrido devido à capacidade do ELISA em detectar quantidades menores de imunoglobulinas.

A variação de valores da razão S/P variou de 0,50 à 4,821, sendo semelhante a Locatelli-Dittrich et al. (2001), em que encontraram intervalo de 0.545-4.921, em bovinos, através do kit IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, USA.

## 6. CONCLUSÕES

- A alta ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* demonstra que o parasito esta circulando entre búfalas criadas no estado do Pará, sendo uma possível fonte de contaminação para outros animais e até mesmo como um causador de enfermidades nesta espécie;
- Os resultados encontrados no presente trabalho nos levam a concluir que, apesar do baixo número de amostras positivas, anticorpos foram encontrados demonstrando assim que o *T. gondii* esta presente nas propriedades criadoras de bubalinos no estado do Pará, podendo representar um risco para a saúde pública e uma fonte de infecção para outros animais e um possível causador de enfermidades reprodutivas nesta espécie;

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. A. O. Epidemiologia de *Neospora caninum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 13, p. 37-39, 2004.

ANDREOTTI, R. Neosporose: um possível problema reprodutivo para o rebanho bovino, Embrapa Gado de Corte, p. 1-9, [2001]. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicações/doc.html>>. Acesso em: 17 out. 2007.

ANDRIANARIVO, A. G. et al. Immune responses during pregnancy in heifers naturally infected with *Neospora caninum* with and without immunization. **Parasitology Research**. v. 96, p. 24-31, 2005.

ARAÚJO, W. N.; SILVA, A. V.; LANGONI, H. Toxoplasmose: uma zoonose - realidade e riscos. **Revista Cães e Gatos**, n.79, 1998.

AYRES, M. et al. BioEstat 5.0-Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: sociedade civil mamirauá; Brasília CNPq, 290p, 2007.

BARBOSA, N. G. S. Bubalinocultura no Estado do Pará. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 29, n.1, p. 34-38, 2005.

BARLING, K. S. et al. Association of serologic status for *Neospora caninum* and postweaning feed efficiency in beef steers. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 219, n. 9, p. 1259-1262, 2001.

BARR, B. C. et al. *Neospora*-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 3, p. 39-46, 1991.

BARROS, A. A. M; MOLNÁR, E.; CARVALHO, M. ELISA e latex-aglutinação utilizados para detectar anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em diferentes animais domésticos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20, Salvador, 1999. Anais... Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, p.143, 1999.

BASSO, W. et al. Confirmed clinical *Neospora caninum* infection in a boxer puppy from Argentina. **Veterinary Parasitology**. v. 131, p. 299-303, 2005.

BESNÉ-MÉRIDA, A. et al. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Mexico City. **Veterinary Parasitology**. v. 157, p. 310-313, 2008.

BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Z. Parasitenkd.** v. 70, p. 271-274, 1984.

BJORKMAN, 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.

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

BRAGA, C.; MAIMONI, P.; MACHADO, M. I. Aspectos clínicos e epidemiológicos da toxoplasmose congênita no hospital de clínicas (HCUFU) e unidades de atendimento integrado (UAI), Uberlândia-MG. **Interseção**. v. 1, n. 1, p. 67-80, 2007.

BRESCIANI, K. D. S. et al. Antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Brazil. **Parasitology Research**. v. 100, p. 281-285, 2007.

BRINDLEY, P. J. et al. Differentiation of *Toxoplasma gondii* from closely related coccidia by riboprint analysis and a surface antigen gene polymerase chain reaction. **The American Journal Tropical Medicine and Hygiene**. v. 48, n. 3, p. 447-456, 1993.

BUXTON, D. et al. *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: New aspects of an old story. **Veterinary Parasitology**. v. 149, p. 25-28, 2007.

CAMARGO, M. E. Alguns aspectos atuais do diagnóstico de laboratório da toxoplasmose. **Anais da Academia Nacional de Medicina**. v. 155, n. 4, p. 236-239, 1995.

CAMARGO, M. E. Introdução as técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**. v. 10, n. 30, p. 87-107, 1974.

CAMPEIRO, C. M. et al. Aetiology of Bovine Abortion in Argentina. **Veterinary Research Communications**. v. 27, p. 359-369, 2003.

CAMPERO, C. M. et al. Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) on four ranches in Corrientes province, Argentina. **Veterinary Parasitology**. v. 150, p. 155-158, 2007.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E. et al. Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine fetuses. **Theriogenology**. v. 65, p. 629-641, 2006.

CORBELLINI, L. G. et al. Aborto bovino por *Neospora caninum* no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**. v. 30, n. 5, p.863-868, 2000.

CRAEYE, S. et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in Belgian house cats. **Veterinary Parasitology**. v. 157, p. 128-132, 2008.

DANGOLLA, A. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in captive elephants (*Elephas maximus maximus*) in Sri Lanka. **Veterinary Parasitology**. v. 137, p. 172-174, 2006.

DAVISON, H. C. et al. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. **Veterinary Science**. v. 70, p. 163-168, 2001.

DUBEY, J. P. A review of *Neospora caninum* and *Neospora*-like infections in animals. **Journal Protozool Research**. v. 2, p. 40-52, 1992.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**. v. 17, p. 1019-1024, 1998.

DUBEY, J. P. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. **Veterinary Parasitology**. v. 140, P. 69-75, 2006.

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

DUBEY, J. P. Neosporosis in cattle. **Journal of Parasitology**. v. 89, p. 42-56, 2003a.

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

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 205, n. 11, p. 1593-1598, 1994.

DUBEY, J. P. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidian. **International Journal for Parasitology**. v. 32, p. 929-946, 2002.

DUBEY, J. P. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 192, p. 1269-1285, 1988a.

DUBEY, J. P. et al. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. **International Journal for Parasitology**. v. 28, p. 1293-1304, 1998a.

DUBEY, J. P.; FENNER, W. R. Clinical segmental myelitis associated with an unidentified *Toxoplasma*-like parasite in a cat. **Journal Veterinary Diagnostic and Investigation**. v. 5, p. 472-480, 1993.

DUBEY, J. P. et al. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 193, n. 10, p. 1259-1263, 1988b.

DUBEY, J. P. et al. High prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **International Journal for Parasitology**. v. 29, p. 1709-1711, 1999a.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.

DUBEY, J. P. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*) and mule deer (*Odocoileus hemionus hemionus*). **Veterinary Parasitology**. v.156, p. 310-313, 2008a.

DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 132, p. 636-662, 1970.

DUBEY, J. P. et al. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Egypt. **International Journal for Parasitology**. v. 28, p. 527-529, 1998b.

DUBEY, J. P. et al. Biologic, morphologic, and molecular characterization of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. **International Journal for Parasitology**. v. 34, 1157-1167, 2004.

DUBEY, J. P. et al. Transplacental toxoplasmosis in naturally-infected white-tailed deer: Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from fetuses of different gestational ages. **International Journal for Parasitology**. v. 38, p. 1057-1063, 2008b.

DUBEY, J. P. et al. Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses from Argentina. **Veterinary Parasitology**. v. 86, p. 59-62, 1999b.

DUBEY, J. P. et al. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. **Veterinary Parasitology**. v. 116, p. 275-296, 2003.

DUBEY, J. P. et al. Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and different enzyme-linked immunosorbent assays. **Journal of Parasitology**. v. 83, n.6, p.1063-1069, 1997.

ELENI, C. et al. Detection of *Neospora caninum* in an aborted goat fetus. **Veterinary Parasitology**. v. 123, p. 271-274, 2004.

ELLIS, J. et al. The phylogeny of *Neospora caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 64, n. 2, p. 303-311, 1994.

FARIA, E. B. et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goats slaughtered in the public slaughterhouse of Patos city, Paraíba State, Northeast region of Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 149, p. 126-129, 2007.

FIALHO, C. G.; ARAUJO, F. A. P. Detecção de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soro de suínos criados e abatidos em frigoríficos da região da grande Porto Alegre-Rs, Brasil. **Ciência Rural**. v. 33, n. 5, 2003.

FIGUEREDO, L. A. et al. Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs from Pernambuco, Northeast Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 157, p. 9-13, 2008.

FIORETTI, D. P. et al. *Neospora caninum* infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. **Journal of Veterinary Medical**. v. 50, p. 399-404, 2003.

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

FRENCH, N. P. et al. Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle, transmission and options of control. **International Journal for Parasitology**. v. 41, p. 464-467, 1999.

FUJII, T. U. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* in female water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the southeastern region of Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 99, 331-334, 2001.

GAFFURI, A. et al. Serosurvey of roe deer, chamois and domestic sheep in the central Italian alps. **Journal of Wildlife Diseases**. v. 42, n. 3, p. 685-690, 2006.

GENNARI, S. M. et al. Occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the Northern region of Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 134, p. 169-171, 2005.

GIRALDI, J. H.; BRACARENSE, A. P. E. R. L.; VIDOTTO, O. Neosporose canina - revisão. **Clínica Veterinária**. v. 6, n. 34, p. 50-54, 2001.

GONDIM, L. F. P. et al. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia State, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 82, p. 273-276, 1999a.

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.; PINHEIRO, A. M.; ALMEIDA, M. A. O. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em búfalos (*Bubalus bubalis*) criados no estado da Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v. 8, n. 2, p. 92-96, 2007.

GONDIM, L. F. P. et al. Freqüência de anticorpos contra *Neospora caninum* em búfalos criados no estado da Bahia. In: Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Salvador, Brasil. vol. 11, p. 227, 1999b.

GUARINO, A. et al. Neosporosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. **Veterinary Parasitology**. v. 91, p. 15-21, 2000.

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.

HELMICK, B. et al. Serological investigation of aborted sheep and pigs for infection by *Neospora caninum*. **Research in Veterinary Science**. v. 73, p. 187-189, 2002.

HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal Health Research Reviews**. v. 6, p. 41-61, 2005.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v.8, p. 634-640, 2002.

HOANE, J. S. et al. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora* spp em eqüinos de diferentes Estados brasileiros. I Fórum Brasileiro de Estudos sobre *Neospora caninum* - ANAIS. 2005.

IBGE, **Resultados do Censo Agropecuário 1995-1996 e primeiros resultados do Censo Agropecuário 2006, segundo variáveis pesquisadas - Pará**, 1 p, [2006]. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/tabela2\\_3\\_5.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/tabela2_3_5.pdf)>. Acesso em: 07 out. 2007.

HUONG, L. T. T. et al. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and buffaloes in southern Vietnam. **Veterinary Parasitology**. v. 75, p. 53-57, 1998.

HURKOVÁ, L.; MODRÝ, D. PCR detection of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in brains of wild carnivores. **Veterinary Parasitology**. v. 137, p. 150-154, 2006.

JEWELL, M. L. et al. Development of *Toxoplasma* Oocysts in Neotropical Felidae. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 21, n. 5, p. 512-517, 1972.

KIJLSTRA, A; JONGERT, E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. **International Journal for Parasitology**. v. 38, p. 1359-1370, 2008.

KLEVAR, S. Tissue cyst forming coccidia; *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* as a cause of disease in farm animals. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v. 49, p. 1-2, 2007.

KOIWAI, M. et al. Proportion of abortions due to neosporosis among dairy cattle in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**. v. 67, p. 1173-1175, 2005.

LIDDELL, S.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. A competitive PCR assay for quantitative detection of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**. v. 29, p. 1583-1587, 1999.

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.

LOBATO, J. et al. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients infected by HIV or with neurological disorders. **I Fórum Brasileiro de Estudos sobre Neospora caninum - ANAIS**. 2005.

LOCATELLI-DITTRICH, R. et al. Serological Diagnosis of Neosporosis in a Herd of Dairy Cattle in Southern Brazil. **The Journal of Parasitology**. v. 87, n. 6, 2001.

LOPES, C. W. G. Neosporose - uma doença responsável por abortos em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 23, n. 4, p. 479-566, 1999.

LÓPEZ-GATIUS, F. et al. *Neospora*-associated abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in north-east Spain. **Journal of Veterinary Medical**. v. 51, p. 348-352, 2004.

MAANEN, C. et al. An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. **Veterinary Parasitology**. v. 126, p. 351-364, 2004.

MAREZ, T. et al. 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.

MCALLISTER, M. M. A decade of discoveries in veterinary protozoology changes our concept of “subclinical” toxoplasmosis. **Veterinary Parasitology**. v. 132, n. 3-4, p. 241-247, 2005.

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

MINEO, T. W. P. et al. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* serological status of different canine populations from Uberlândia, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 56, n. 3, p. 414-417, 2004.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, p.1965-1976, 2004.

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

MORÉ, G. et al. Diagnosis of *Sarcocystis cruzi*, *Neospora caninum*, and *Toxoplasma gondii* infections in cattle. **Parasitology Research**. v. 102, p. 671-675, 2008.

MOSKWA, B.; CABAJ, W. The role of the colostrum and milk in *Neospora caninum* transmission. **Helminthologia**. v. 44, p. 126-129, 2007.

MOSKWA, B. et al. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. **Parasitology Research**, v. 100, p. 633-636, 2007.

NAVIDPOUR, S.; HOGHOOGHI-RAD, N. Seroprevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in buffaloes in Khoozestan province, Iran. **Veterinary Parasitology**. v. 77, p. 191-194, 1998.

OGAWA, L. et al. Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 57, n. 3, p. 312-316, 2005.

OKUDA, L. H. et al. Isolamento de *Neospora caninum* em amostras de fetos bovinos abortados no Brasil. **I Fórum Brasileiro de Estudos sobre *Neospora caninum* - ANAIS**. 2005.

OMATA, Y. et al. Investigation for presence of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Brucella*-species infection in killer whales (*Orcinus orca*) mass-stranded on the coast of Shiretoko, Hokkaido, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**. v. 68, n. 5, p. 523-526, 2006.

PETERSEN, E. et al. Diagnosis of pulmonary infection with *Toxoplasma gondii* in immunocompromised HIV-positive patients by real-time PCR. **European Journal of Clinical Microbiology and Infection Disease**. v. 25, p. 401-404, 2006.

RAGOZO, A. M. A. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis estados brasileiros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 12, n. 1, p. 33-37, 2003.

RAMADAN, M. Y.; ABDEL-MAGEED, A. D.; KHATER, H. F. Seroprevalence and preliminary treatment of toxoplasmosis of pregnant goats in Kalubya Governorate, Egypt. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 35, n. 3, p. 295-301, 2007.

RAZMI, G. R. et al. First report of *Neospora caninum*-associated bovine abortion in Mashhad area, Iran. **Parasitology Research**. v. 100, p. 755-757, 2007.

RICHARDS, F. O.; KOVACS, J. A.; LUFT, B. J. Preventing toxoplasmic encephalitis in persons infected with human immunodeficiency virus. **Clinical Infectious Diseases**. v. 21, p. 49-56, 1995.

RODRIGUES, A. A. R. et al. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 124, p. 139-150, 2004.

RODRIGUES, A. A. R. et al. Serological responses to *Neospora caninum* in experimentally and naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Veterinary Parasitology**. v. 129, p. 21-24, 2005.

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

ROMERO, J. J.; FRANKENA, K. Bovine neosporosis: a review. **Journal of Animal and Veterinary Advances**. v. 3, p. 901-913, 2004.

RUIZ, A.; FRENKEL, J. K. *Toxoplasma Gondii* in Costa Rican Cats. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 29, n.6, p. 1150-1160, 1980.

SADREBAZZAZ, A.; HADDADZADEH, H.; SHAYAN, P. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in camels (*Camelus dromedarius*) in Mashhad, Iran. **Parasitology Research**. v. 98, p. 600-601, 2006.

SAGER, H. et al. Incidence of *Neospora caninum* and other intestinal protozoan parasites in populations of swiss dogs. **Veterinary Parasitology**. v. 139, p. 84-92, 2006.

SANTOS, A. P. M. E. et al. Dairy cow abortion associated with *Neospora caninum* and other infectious agents. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 57, n. 4, p. 545-547, 2005.

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

SCHARES, G. et al. Use of purified tachyzoite surface antigen p38 in an ELISA to diagnose bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**. v. 30, p. 1123-1130, 2000.

SEDLÁK, K.; BÁRTOVÁ, E. Seroprevalences of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in zoo animals. **Veterinary Parasitology**. v. 136, p. 223-231, 2006.

SLOTVED, H. C.; JENSEN, L.; LIND, P. Comparison of the IFAT and Iscom-ELISA response in bovine foetuses with *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**. v. 29, p. 1165-1174, 1999.

SOUZA, L. M. et al. Detecção de anticorpos contra *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em soros de bubalinos (*Bubalus bubalis*) no Estado de São Paulo, Brasil. **Seminário: Ciências Agrárias**. v. 22, n.1, p. 39-48, jan/jun, 2001.

SPEER, C. A.; DUBEY, J. P. Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. **International Journal for Parasitology**. v. 35, p. 193-206, 2005.

SPEER, C. A. et al. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**. v. 29, p. 1509-1519, 1999.

TAYLOR, M. A.; WEBSTER, K. A. Recent advances in the diagnosis in livestock of *Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, *Giardia* and other protozoa of veterinary importance. **Research in Veterinary Science**. v. 65, p. 183-193, 1998.

TEIXEIRA, W. C. et al. Frequência de cães reagentes para *Neospora caninum* em São Luís, Maranhão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 58, n. 4, p. 685-687, 2006.

THILSTED, J. P.; DUBEY, J. P. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. **Journal Veterinary Diagnostic and Investigation**. v. 1, p. 205-209, 1989.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia Veterinária**. 2º edição, Roca: São Paulo. 556 p. 2004.

TREES, A. J. et al. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in a population of urban dogs in England. **The Veterinary Record**. v. 132, p. 125-126, 1993.

UENO, T. E. H. Prevalência das Infecções por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em matrizes e reprodutores ovinos de rebanhos comerciais do Distrito Federal, Brasil. **Dissertação de Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Universidade de São Paulo**, 2005.

VENTURINI, M. C. et al. Soroprevalence of *Toxoplasma gondii* in sows from slaughterhouses and in pigs from an indoor and an outdoor farm in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.124, p.161-165, 2004.

VENTURINI, M. C. et al. *Neospora caninum* infections in bovine foetuses and dairy cows with abortions in Argentina. **International Journal for Parasitology**. v. 29, p. 1705-1708, 1999.

WAAP, H. et al. Epidemiological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in urban pigeons from the area of Lisbon (Portugal). **Veterinary Parasitology**. v. 157, p. 306-309, 2008.

WIKIPEDIA. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Par%C3%A1>>. Acesso em: 17 out. 2008.

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

WOUDA, W. et al. 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.

YU, J. et al. Seroepidemiology of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the People's Republic of China. **Veterinary Parasitology**. v. 143, p. 79-85, 2007.

ZIA-ALI, N. et al. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* strains from different hosts in Iran. **Parasitology Research**. v. 101, p. 111-115, 2007.

## **ANEXOS**

**ANEXO 1 - Controle Sorológico de Búfalas para *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii***

	Município	Nº Lab.	<i>N. caninum</i>		<i>T. gondii</i>
			ELISA (valores de S/P)	RIFI (título)	RIFI (título)
Fazenda 01	Xinguara	001	não reagente (0,233)	reagente (800)	não reagente
	Xinguara	002	reagente (0,568)	reagente (400)	não reagente
	Xinguara	003	não reagente (0,378)	reagente (200)	não reagente
	Xinguara	004	não reagente (0,381)	não reagente	não reagente
	Xinguara	005	não testado	não reagente	não reagente
	Xinguara	006	reagente (0,519)	reagente (200)	não reagente
	Xinguara	007	não reagente (0,280)	reagente (200)	não reagente
	Xinguara	008	não testado	não reagente	não reagente
	Xinguara	009	não testado	não reagente	não reagente
	Xinguara	010	não testado	não reagente	não reagente
	Xinguara	011	não reagente (-0,014)	reagente (800)	não reagente
	Xinguara	012	não reagente (-0,040)	não reagente	não reagente
	Xinguara	013	reagente (0,539)	reagente (800)	não reagente
	Xinguara	014	não reagente (0,476)	reagente (800)	não reagente
	Xinguara	015	reagente (0,683)	não reagente	não reagente
	Xinguara	016	reagente (0,754)	não reagente	não reagente
	Xinguara	017	não testado	não reagente	não reagente
	Xinguara	018	reagente (0,579)	não reagente	não reagente
	Xinguara	019	não reagente (0,349)	reagente (3200)	não reagente
	Xinguara	020	não reagente (0,444)	reagente (800)	não reagente
	Xinguara	021	não reagente (-0,063)	não reagente	não reagente
	Xinguara	022	não reagente (0,159)	não reagente	não reagente
	Xinguara	023	não testado	não reagente	não reagente
	Xinguara	024	não reagente (-0,032)	não reagente	não reagente
	Xinguara	025	não testado	não reagente	não reagente
	Xinguara	026	reagente (0,913)	não reagente	não reagente
	Xinguara	027	não testado	não reagente	não reagente
	Xinguara	028	não testado	não reagente	não reagente
	Xinguara	029	não reagente (0,183)	não reagente	não reagente
	Xinguara	030	não testado	não reagente	não reagente
	Xinguara	373	não testado	não reagente	não reagente
	Xinguara	374	não testado	não reagente	não reagente
	Xinguara	375	não reagente (0,178)	não reagente	não reagente
	Xinguara	376	não testado	não reagente	não reagente
	Xinguara	377	não reagente (0,224)	não reagente	não reagente
	Xinguara	378	não reagente (0,283)	não reagente	não reagente
	Xinguara	379	reagente (0,698)	reagente (400)	não reagente
	Xinguara	380	reagente (0,881)	reagente (200)	não reagente
	Xinguara	381	não testado	não reagente	não reagente
Xinguara	382	não reagente (0,301)	não reagente	não reagente	
Xinguara	383	não testado	não reagente	não reagente	
Xinguara	384	reagente (0,587)	reagente (200)	não reagente	
Xinguara	385	não reagente (0,492)	reagente (800)	não reagente	
Xinguara	386	não reagente (0,460)	reagente (800)	não reagente	
Xinguara	387	não reagente (0,196)	não reagente	não reagente	
Xinguara	388	não reagente (0,311)	não reagente	não reagente	
Xinguara	389	não reagente (0,294)	reagente (800)	não reagente	
Xinguara	390	reagente (0,532)	reagente (400)	não reagente	
Xinguara	391	não reagente (0,246)	reagente (200)	não reagente	
Xinguara	392	reagente (0,659)	reagente (1600)	não reagente	
Total			12 reagentes 23 não reagentes 35	19 reagentes 31 não reagentes 50	0 reagente 50 não reagentes 50

	Município	Nº Lab.	<i>N. caninum</i>		<i>T. gondii</i>
			ELISA (valores de S/P)	RIFI (título)	RIFI (título)
Fazenda 02	Altamira	031	não reagente (0,294)	reagente (200)	não reagente
	Altamira	032	não reagente (0,216)	reagente (3200)	não reagente
	Altamira	033	não reagente (0,314)	reagente (800)	não reagente
	Altamira	034	não reagente (0,037)	reagente (1600)	não reagente
	Altamira	035	não reagente (0,228)	reagente (800)	não reagente
	Altamira	036	não reagente (0,329)	reagente (200)	não reagente
	Altamira	037	não reagente (0,242)	reagente (200)	reagente (64)
	Altamira	038	não reagente (0,110)	reagente (200)	não reagente
	Altamira	039	não reagente (-0,043)	reagente (400)	não reagente
	Altamira	040	não testado	não reagente	não reagente
	Altamira	041	não reagente (0,349)	não reagente	não reagente
	Altamira	042	não testado	não reagente	não reagente
	Altamira	043	não reagente (0,198)	não reagente	não reagente
	Altamira	044	não testado	não reagente	não reagente
	Altamira	045	não testado	não reagente	não reagente
	Altamira	046	não reagente (0,056)	não reagente	não reagente
	Altamira	047	não testado	não reagente	não reagente
	Altamira	048	não reagente (0,278)	não reagente	não reagente
	Altamira	049	não reagente (0,326)	reagente (200)	não reagente
	Altamira	050	não reagente (-0,063)	não reagente	não reagente
Total			0 reagente	10 reagentes	01 reagente
			15 não reagentes	10 não reagentes	19 não reagentes
			15	20	20

	Município	Nº Lab.	<i>N. caninum</i>		<i>T. gondii</i> RIFI (título)
			ELISA (valores de S/P)	RIFI (título)	
Fazenda 03	Salvaterra	051	não reagente (0,389)	reagente (200)	não reagente
	Salvaterra	052	não reagente (0,305)	reagente (200)	não reagente
	Salvaterra	053	não reagente (0,389)	reagente (200)	não reagente
	Salvaterra	054	não reagente (0,190)	não reagente	não reagente
	Salvaterra	055	não reagente (0,187)	reagente (200)	não reagente
	Salvaterra	056	não reagente (0,079)	não reagente	não reagente
	Salvaterra	057	não reagente (0,151)	não reagente	não reagente
	Salvaterra	058	não reagente (0,349)	não reagente	não reagente
	Salvaterra	059	não reagente (0,176)	reagente (200)	não reagente
	Salvaterra	060	não reagente (0,176)	reagente (800)	não reagente
	Salvaterra	061	não reagente (0,124)	reagente (800)	não reagente
	Salvaterra	062	não reagente (0,294)	não reagente	não reagente
	Salvaterra	063	reagente (0,784)	reagente (200)	não reagente
	Salvaterra	064	reagente (0,501)	reagente (200)	não reagente
	Salvaterra	065	não reagente (0,187)	reagente (200)	não reagente
	Salvaterra	339	não testado	não reagente	não reagente
	Salvaterra	340	não reagente (0,272)	reagente (400)	não reagente
	Salvaterra	341	não reagente (0,119)	reagente (400)	não reagente
	Salvaterra	342	não reagente (0,217)	reagente (400)	não reagente
	Salvaterra	343	não testado	não reagente	não reagente
	Salvaterra	344	não reagente (0,315)	reagente (200)	não reagente
	Salvaterra	345	não testado	não reagente	não reagente
	Salvaterra	346	não testado	não reagente	não reagente
Salvaterra	347	não testado	não reagente	não reagente	
Salvaterra	348	não testado	não reagente	não reagente	
Salvaterra	349	não testado	não reagente	não reagente	
Salvaterra	350	não testado	não reagente	não reagente	
Salvaterra	351	não testado	não reagente	não reagente	
Salvaterra	352	não testado	não reagente	não reagente	
Total			02 reagentes 17 não reagentes 19	14 reagentes 15 não reagentes 29	0 reagente 29 não reagentes 29

	Município	Nº Lab.	<i>N. caninum</i>		<i>T. gondii</i> RIFI (título)
			ELISA (valores de S/P)	RIFI (título)	
Fazenda 04	Santa Izabel do Pará	066	não reagente (0,288)	reagente (200)	não reagente
	Santa Izabel do Pará	067	não reagente (0,392)	reagente (200)	não reagente
	Santa Izabel do Pará	068	reagente (0,660)	reagente (1600)	não reagente
	Santa Izabel do Pará	069	reagente (0,573)	reagente (400)	não reagente
	Santa Izabel do Pará	070	não reagente (0,476)	não reagente	não reagente
	Santa Izabel do Pará	071	reagente (0,507)	reagente (200)	não reagente
	Santa Izabel do Pará	072	não reagente (0,429)	não reagente	não reagente
	Santa Izabel do Pará	073	não reagente (0,297)	reagente (200)	não reagente
	Santa Izabel do Pará	074	não reagente (0,150)	reagente (400)	não reagente
	Santa Izabel do Pará	075	não reagente (0,210)	reagente (400)	não reagente
	Santa Izabel do Pará	076	não reagente (0,360)	reagente (200)	não reagente
	Santa Izabel do Pará	077	não reagente (0,121)	reagente (200)	não reagente
	Santa Izabel do Pará	078	não reagente (0,216)	reagente (3200)	não reagente
Total			03 reagentes 10 não reagentes 13	11 reagentes 02 não reagentes 13	0 reagente 13 não reagentes 13

	Município	Nº Lab.	<i>N. caninum</i>		<i>T. gondii</i> RIFI (título)
			ELISA (valores de S/P)	RIFI (título)	
Fazenda 05	Oriximiná	079	reagente (0,619)	não reagente	não reagente
	Oriximiná	080	não reagente (0,437)	não reagente	não reagente
	Oriximiná	081	não reagente (0,144)	reagente (400)	não reagente
	Oriximiná	082	não reagente (0,231)	reagente (3200)	não reagente
	Oriximiná	083	não reagente (0,236)	reagente (400)	não reagente
	Oriximiná	084	não reagente (0,467)	reagente (800)	não reagente
	Oriximiná	085	reagente (0,983)	reagente (1600)	não reagente
	Oriximiná	086	não reagente (0,245)	reagente (200)	não reagente
	Oriximiná	087	não reagente (0,242)	reagente (400)	não reagente
	Oriximiná	088	não reagente (0,303)	reagente (800)	não reagente
	Oriximiná	089	não reagente (0,305)	reagente (800)	não reagente
	Oriximiná	090	não reagente (0,346)	reagente (200)	não reagente
	Oriximiná	091	reagente (0,666)	reagente (200)	não reagente
	Oriximiná	092	não reagente (0,242)	reagente (400)	não reagente
	Oriximiná	093	não reagente (0,014)	reagente (400)	não reagente
	Oriximiná	094	não reagente (0,233)	reagente (200)	não reagente
	Oriximiná	095	não reagente (0,320)	reagente (1600)	não reagente
	Oriximiná	096	não reagente (0,378)	reagente (400)	não reagente
	Oriximiná	097	não reagente (0,492)	não reagente	não reagente
	Oriximiná	098	não reagente (0,231)	reagente (800)	não reagente
Oriximiná	099	reagente (1,236)	reagente (400)	não reagente	
Oriximiná	100	não reagente (0,493)	reagente (200)	não reagente	
Oriximiná	101	reagente (0,640)	reagente (400)	não reagente	
Oriximiná	102	não reagente (0,270)	não reagente	não reagente	
Oriximiná	103	reagente (0,651)	não reagente	não reagente	
Oriximiná	104	não reagente (0,424)	reagente (200)	não reagente	
Oriximiná	105	não reagente (0,305)	reagente (400)	não reagente	
Oriximiná	106	não reagente (0,415)	reagente (200)	não reagente	
Oriximiná	107	não reagente (0,429)	reagente (800)	não reagente	
Oriximiná	108	não reagente (0,190)	não reagente	não reagente	
Total			06 reagentes 24 não reagentes 30	24 reagentes 06 não reagentes 30	0 reagente 30 não reagentes 30

	Município	Nº Lab.	<i>N. caninum</i>		<i>T. gondii</i> RIFI (título)
			ELISA (valores de S/P)	RIFI (título)	
Fazenda 06	São Caetano de Odivelas	109	reagente (0,536)	reagente (200)	não reagente
	São Caetano de Odivelas	110	reagente (0,712)	reagente (800)	não reagente
	São Caetano de Odivelas	111	não reagente (0,392)	não reagente	não reagente
	São Caetano de Odivelas	112	reagente (0,696)	não reagente	não reagente
	São Caetano de Odivelas	113	não reagente (0,032)	não reagente	não reagente
	São Caetano de Odivelas	114	não reagente (0,038)	não reagente	não reagente
	São Caetano de Odivelas	115	reagente (0,939)	reagente (200)	não reagente
Total			04 reagentes 03 não reagentes 07	03 reagentes 04 não reagentes 07	0 reagente 07 não reagentes 07

	Município	Nº Lab.	<i>N. caninum</i>		<i>T. gondii</i>
			ELISA (valores de S/P)	RIFI (título)	RIFI (título)
Fazenda 07	Moju	116	não reagente (0,412)	reagente (200)	não reagente
	Moju	117	não reagente (0,152)	não reagente	não reagente
	Moju	118	não reagente (0,386)	não reagente	não reagente
	Moju	119	não reagente (0,135)	reagente (800)	não reagente
	Moju	120	não reagente (0,259)	reagente (200)	não reagente
	Moju	121	não testado	não reagente	não reagente
	Moju	122	não reagente (0,161)	reagente (800)	não reagente
	Moju	123	não reagente (0,432)	reagente (200)	não reagente
	Moju	124	não reagente (0,241)	não reagente	não reagente
	Moju	125	não reagente (0,171)	não reagente	não reagente
	Moju	126	não reagente (-0,010)	reagente (200)	não reagente
	Moju	127	não testado	não reagente	não reagente
	Moju	128	não reagente (0,236)	reagente (200)	não reagente
	Moju	129	não reagente (0,297)	reagente (800)	não reagente
	Moju	130	não testado	não reagente	não reagente
	Moju	131	não reagente (-0,060)	reagente (800)	não reagente
	Moju	132	não testado	não reagente	não reagente
	Moju	133	não testado	não reagente	não reagente
Moju	134	não testado	não reagente	não reagente	
Moju	135	não reagente (0,190)	não reagente	não reagente	
Moju	136	não reagente (0,196)	reagente (3200)	não reagente	
Moju	137	não reagente (0,285)	reagente (800)	não reagente	
Moju	138	não reagente (0,266)	não reagente	não reagente	
Total			0 reagente 17 não reagentes	11 reagentes 12 não reagentes	0 reagente 23 não reagentes
			17	23	23

	Município	Nº Lab.	<i>N. caninum</i>		<i>T. gondii</i> RIFI (título)
			ELISA (valores de S/P)	RIFI (título)	
Fazenda 08	Soure	139	não reagente (0,069)	reagente (400)	não reagente
	Soure	140	não reagente (0,076)	não reagente	não reagente
	Soure	141	não reagente (0,086)	reagente (400)	não reagente
	Soure	142	não testado	não reagente	não reagente
	Soure	143	não testado	não reagente	não reagente
	Soure	144	não testado	não reagente	não reagente
	Soure	145	não reagente (0,294)	reagente (200)	não reagente
	Soure	146	não reagente (0,241)	não reagente	não reagente
	Soure	147	não reagente (0,159)	reagente (800)	não reagente
	Soure	148	não testado	não reagente	não reagente
	Soure	149	reagente (0,500)	não reagente	não reagente
	Soure	150	não reagente (0,196)	não reagente	não reagente
	Soure	151	não reagente (0,205)	reagente (1600)	não reagente
	Soure	152	não testado	não reagente	não reagente
	Soure	153	não testado	não reagente	não reagente
	Soure	154	não testado	não reagente	não reagente
	Soure	155	não reagente (0,348)	não reagente	não reagente
	Soure	156	não reagente (0,120)	não reagente	não reagente
	Soure	157	não testado	não reagente	não reagente
	Soure	158	não testado	não reagente	não reagente
	Soure	159	não testado	não reagente	não reagente
Soure	160	não testado	não reagente	não reagente	
Soure	161	não reagente (0,127)	não reagente	não reagente	
Soure	393	não reagente (0,278)	reagente (1600)	não reagente	
Soure	394	não reagente (0,087)	reagente (200)	não reagente	
Soure	395	não reagente (0,302)	reagente (400)	não reagente	
Soure	396	não reagente (-0,063)	reagente (200)	não reagente	
Soure	397	não reagente (0,274)	não reagente	não reagente	
Soure	398	não reagente (0,079)	reagente (200)	não reagente	
Soure	399	não reagente (0,127)	reagente (200)	não reagente	
Soure	400	não reagente (-0,005)	não reagente	não reagente	
Soure	401	não reagente (0,032)	não reagente	não reagente	
Total			01 reagente 20 não reagentes 21	11 reagentes 21 não reagentes 32	0 reagente 32 não reagentes 32

	Município	Nº Lab.	<i>N. caninum</i>		<i>T. gondii</i> RIFI (título)
			ELISA (valores de S/P)	RIFI (título)	
Fazenda 09	Cachoeira do Arari	162	não reagente (0,000)	não reagente	não reagente
	Cachoeira do Arari	163	reagente (0,513)	não reagente	não reagente
	Cachoeira do Arari	164	não reagente (0,139)	não reagente	não reagente
	Cachoeira do Arari	165	não reagente (0,468)	não reagente	não reagente
	Cachoeira do Arari	166	não reagente (0,127)	não reagente	não reagente
	Cachoeira do Arari	167	não reagente (0,268)	reagente (800)	não reagente
	Cachoeira do Arari	168	não reagente (-0,006)	não reagente	não reagente
	Cachoeira do Arari	169	não reagente (0,072)	reagente (400)	não reagente
	Cachoeira do Arari	170	não reagente (0,228)	não reagente	não reagente
	Cachoeira do Arari	171	não reagente (0,190)	não reagente	não reagente
	Cachoeira do Arari	172	não reagente (0,044)	não reagente	não reagente
	Cachoeira do Arari	173	não reagente (0,081)	reagente (400)	não reagente
Total			01 reagente 11 não reagentes 12	03 reagentes 09 não reagentes 12	0 reagente 12 não reagentes 12

	Município	Nº Lab.	<i>N. caninum</i>		<i>T. gondii</i>
			ELISA (valores de S/P)	RIFI (título)	RIFI (título)
Fazenda 10	Ponta de Pedras	174	não reagente (0,468)	não reagente	não reagente
	Ponta de Pedras	175	não reagente (-0,050)	reagente (800)	não reagente
	Ponta de Pedras	176	não reagente (-0,013)	não reagente	não reagente
	Ponta de Pedras	177	não reagente (0,044)	não reagente	não reagente
	Ponta de Pedras	178	não reagente (0,329)	reagente (1600)	não reagente
	Ponta de Pedras	179	não reagente (0,046)	reagente (400)	não reagente
	Ponta de Pedras	180	não reagente (0,485)	reagente (200)	não reagente
	Ponta de Pedras	181	não reagente (0,184)	não reagente	não reagente
	Ponta de Pedras	182	não reagente (0,051)	não reagente	não reagente
	Ponta de Pedras	183	não reagente (0,264)	reagente (1600)	não reagente
	Ponta de Pedras	184	não reagente (0,000)	não reagente	não reagente
	Ponta de Pedras	185	não reagente (0,196)	reagente (1200)	não reagente
	Ponta de Pedras	186	não reagente (0,417)	reagente (1200)	não reagente
	Ponta de Pedras	187	não reagente (0,098)	reagente (1200)	não reagente
	Ponta de Pedras	188	não reagente (0,095)	não reagente	não reagente
	Ponta de Pedras	189	não reagente (0,316)	não reagente	não reagente
	Ponta de Pedras	190	não reagente (0,434)	reagente (400)	não reagente
	Ponta de Pedras	191	não reagente (0,285)	não reagente	reagente (128)
	Ponta de Pedras	192	não reagente (0,106)	reagente (800)	não reagente
Total			0 reagente 19 não reagentes	10 reagentes 09 não reagentes	01 reagente 18 não reagentes
			19	19	19

	Município	Nº Lab.	<i>N. caninum</i>		<i>T. gondii</i>
			ELISA (valores de S/P)	RIFI (título)	RIFI (título)
Fazenda 11	Peixe-Boi	193	não reagente (0,456)	não reagente	não reagente
	Peixe-Boi	194	reagente (0,506)	não reagente	não reagente
	Peixe-Boi	195	não reagente (0,070)	não reagente	não reagente
	Peixe-Boi	196	não reagente (0,336)	reagente (1600)	não reagente
	Peixe-Boi	197	não reagente (0,383)	reagente (200)	não reagente
	Peixe-Boi	198	reagente (0,544)	não reagente	não reagente
	Peixe-Boi	199	não reagente (0,323)	não reagente	não reagente
	Peixe-Boi	200	não reagente (0,391)	reagente (1600)	não reagente
	Peixe-Boi	201	não reagente (0,106)	reagente (800)	não reagente
	Peixe-Boi	202	não reagente (0,038)	reagente (1600)	não reagente
	Peixe-Boi	203	não testado	não reagente	não reagente
	Peixe-Boi	204	não reagente (0,426)	não reagente	não reagente
	Peixe-Boi	205	reagente (0,545)	não reagente	não reagente
	Peixe-Boi	206	não testado	não reagente	não reagente
	Peixe-Boi	207	não reagente (0,485)	não reagente	não reagente
	Peixe-Boi	208	não reagente (0,357)	reagente (800)	não reagente
	Peixe-Boi	209	não testado	não reagente	não reagente
	Peixe-Boi	210	não reagente (0,051)	não reagente	não reagente
	Peixe-Boi	211	não reagente (0,032)	não reagente	não reagente
	Peixe-Boi	212	não reagente (0,335)	não reagente	não reagente
	Peixe-Boi	213	não reagente (0,013)	não reagente	não reagente
	Peixe-Boi	214	não reagente (0,038)	reagente (3200)	não reagente
	Peixe-Boi	215	reagente (0,596)	não reagente	não reagente
	Peixe-Boi	216	não reagente (0,055)	não reagente	não reagente
	Peixe-Boi	353	não testado	não reagente	não reagente
	Peixe-Boi	354	não reagente (0,489)	não reagente	não reagente
	Peixe-Boi	355	reagente (0,621)	não reagente	não reagente
	Peixe-Boi	356	não reagente (0,374)	reagente (1600)	não reagente
	Peixe-Boi	357	não testado	não reagente	não reagente
	Peixe-Boi	358	não testado	não reagente	não reagente
	Peixe-Boi	359	não testado	não reagente	não reagente
	Peixe-Boi	360	não reagente (0,315)	não reagente	não reagente
	Peixe-Boi	361	não testado	não reagente	não reagente
Peixe-Boi	362	não reagente (0,142)	não reagente	não reagente	
Peixe-Boi	363	não reagente (0,200)	reagente (400)	não reagente	
Peixe-Boi	364	não reagente (-0,005)	não reagente	não reagente	
Peixe-Boi	365	reagente (0,643)	reagente (200)	não reagente	
Peixe-Boi	366	não testado	não reagente	não reagente	
Peixe-Boi	367	não reagente (0,105)	não reagente	não reagente	
Peixe-Boi	368	não testado	não reagente	não reagente	
Peixe-Boi	369	não testado	não reagente	não reagente	
Peixe-Boi	370	reagente (0,952)	reagente (200)	não reagente	
Peixe-Boi	371	não reagente (0,317)	reagente (200)	não reagente	
Peixe-Boi	372	não reagente (0,206)	reagente (200)	não reagente	
Total		07 reagentes 26 não reagentes		13 reagentes 31 não reagentes	0 reagente 44 não reagentes
		33		44	44

	Município	Nº Lab.	<i>N. caninum</i>		<i>T. gondii</i>
			ELISA (valores de S/P)	RIFI (título)	RIFI (título)
Fazenda 12	Ipixuna do Pará	217	reagente (0,523)	não reagente	não reagente
	Ipixuna do Pará	218	reagente (0,706)	reagente (3200)	não reagente
	Ipixuna do Pará	219	reagente (0,770)	reagente (400)	não reagente
	Ipixuna do Pará	220	não reagente (0,238)	reagente (800)	não reagente
	Ipixuna do Pará	221	reagente (4,821)	não reagente	não reagente
	Ipixuna do Pará	222	não testado	não reagente	reagente (64)
	Ipixuna do Pará	223	não reagente (0,468)	não reagente	não reagente
	Ipixuna do Pará	224	não reagente (0,477)	não reagente	não reagente
	Ipixuna do Pará	225	não reagente (0,460)	não reagente	não reagente
	Ipixuna do Pará	226	não reagente (0,421)	não reagente	não reagente
	Ipixuna do Pará	227	não reagente (0,498)	não reagente	não reagente
	Ipixuna do Pará	228	não testado	não reagente	não reagente
	Ipixuna do Pará	229	reagente (0,532)	não reagente	não reagente
	Ipixuna do Pará	230	não reagente (0,494)	não reagente	não reagente
	Ipixuna do Pará	231	não testado	não reagente	não reagente
	Ipixuna do Pará	232	não reagente (0,251)	reagente (200)	não reagente
	Ipixuna do Pará	233	não testado	não reagente	não reagente
	Ipixuna do Pará	234	não reagente (0,302)	reagente (200)	não reagente
	Ipixuna do Pará	235	não reagente (0,391)	não reagente	não reagente
	Ipixuna do Pará	236	não testado	não reagente	não reagente
	Ipixuna do Pará	237	não testado	não reagente	não reagente
	Ipixuna do Pará	238	não reagente (0,434)	reagente (400)	não reagente
	Ipixuna do Pará	239	não reagente (0,421)	reagente (200)	não reagente
	Ipixuna do Pará	240	não reagente (0,017)	reagente (400)	não reagente
Ipixuna do Pará	241	não reagente (0,468)	não reagente	não reagente	
Ipixuna do Pará	242	reagente (0,804)	reagente (200)	não reagente	
Ipixuna do Pará	243	reagente (0,528)	não reagente	não reagente	
Ipixuna do Pará	244	não testado	não reagente	não reagente	
Total			07 reagentes 14 não reagentes	09 reagentes 19 não reagentes	01 reagente 27 não reagentes
			21	28	28

	Município	Nº Lab.	<i>N. caninum</i>		<i>T. gondii</i>
			ELISA (valores de S/P)	RIFI (título)	RIFI (título)
Fazenda 13	Salvaterra	245	não testado	não reagente	não reagente
	Salvaterra	246	não testado	não reagente	não reagente
	Salvaterra	247	não testado	não reagente	não reagente
	Salvaterra	248	não testado	não reagente	não reagente
	Salvaterra	249	não testado	não reagente	não reagente
	Salvaterra	250	não testado	não reagente	não reagente
	Salvaterra	251	não reagente (0,281)	não reagente	não reagente
	Salvaterra	252	não reagente (0,311)	não reagente	não reagente
	Salvaterra	253	não reagente (0,485)	não reagente	não reagente
	Salvaterra	254	não reagente (0,204)	não reagente	não reagente
	Salvaterra	255	não reagente (0,353)	não reagente	não reagente
	Salvaterra	256	não reagente (0,255)	não reagente	não reagente
	Salvaterra	257	não reagente (0,430)	não reagente	não reagente
	Salvaterra	258	não reagente (0,468)	não reagente	não reagente
	Salvaterra	259	não reagente (0,443)	não reagente	não reagente
	Salvaterra	260	não reagente (-0,021)	não reagente	não reagente
	Salvaterra	261	não reagente (0,366)	não reagente	não reagente
	Salvaterra	262	não reagente (0,328)	não reagente	não reagente
	Salvaterra	263	não reagente (0,391)	não reagente	não reagente
	Salvaterra	264	não reagente (0,443)	não reagente	não reagente
Salvaterra	265	não reagente (0,383)	não reagente	não reagente	
Salvaterra	266	não reagente (0,004)	não reagente	não reagente	
Salvaterra	267	reagente (0,562)	não reagente	não reagente	
Salvaterra	268	reagente (0,626)	reagente (200)	não reagente	
Salvaterra	269	reagente (0,872)	reagente (200)	não reagente	
Total			03 reagentes 16 não reagentes	02 reagentes 23 não reagentes	0 reagente 25 não reagentes
			19	25	25

	Município	Nº Lab.	<i>N. caninum</i>		<i>T. gondii</i>
			ELISA (valores de S/P)	RIFI (título)	RIFI (título)
Fazenda 14	Belém	270	reagente (0,570)	não testado	não reagente
	Belém	271	não reagente (0,187)	não testado	não reagente
	Belém	272	não reagente (0,166)	não testado	não reagente
	Belém	273	não reagente (0,055)	não testado	não reagente
	Belém	274	não reagente (0,111)	não testado	não reagente
	Belém	275	não reagente (0,328)	não testado	não reagente
	Belém	276	não reagente (0,009)	não testado	não reagente
	Belém	277	não reagente (0,094)	não testado	não reagente
	Belém	278	não reagente (0,136)	não testado	não reagente
	Belém	279	não reagente (0,170)	não testado	não reagente
	Belém	280	não reagente (0,102)	não testado	não reagente
	Belém	281	reagente (0,767)	não testado	não reagente
	Belém	282	não reagente (-0,009)	não testado	não reagente
	Belém	283	não reagente (-0,059)	não testado	não reagente
	Belém	284	não reagente (0,215)	não testado	não reagente
	Belém	285	não reagente (0,023)	não testado	não reagente
	Belém	286	não reagente (0,306)	não testado	não reagente
	Belém	287	não reagente (0,151)	não testado	não reagente
	Belém	288	reagente (0,658)	não testado	não reagente
	Belém	289	não reagente (0,032)	não testado	não reagente
	Belém	290	não reagente (0,000)	não testado	não reagente
	Belém	291	não reagente (0,416)	não testado	não reagente
	Belém	292	não reagente (0,137)	não testado	não reagente
	Belém	293	não reagente (0,210)	não testado	não reagente
	Belém	294	não reagente (-0,009)	não testado	não reagente
	Belém	295	não reagente (0,005)	não testado	não reagente
	Belém	296	não reagente (0,142)	não testado	não reagente
Total			03 reagentes	-	0 reagente
			24 não reagentes	-	27 não reagentes
			27	-	27

	Município	Nº Lab.	<i>N. caninum</i>		<i>T. gondii</i>
			ELISA (valores de S/P)	RIFI (título)	RIFI (título)
Fazenda 15	Nova Timboteua	297	não reagente (0,196)	não reagente	não reagente
	Nova Timboteua	298	não reagente (0,315)	não reagente	não reagente
	Nova Timboteua	299	reagente (0,515)	reagente (800)	não reagente
	Nova Timboteua	300	não reagente (0,089)	reagente (400)	não reagente
	Nova Timboteua	301	não reagente (0,426)	reagente (400)	não reagente
	Nova Timboteua	302	não reagente (0,260)	não reagente	não reagente
	Nova Timboteua	303	não reagente (0,004)	reagente (400)	não reagente
	Nova Timboteua	304	não reagente (0,320)	não reagente	reagente (64)
	Nova Timboteua	305	não reagente (-0,055)	não reagente	não reagente
	Nova Timboteua	306	não reagente (-0,041)	não reagente	não reagente
	Nova Timboteua	307	não reagente (0,047)	reagente (400)	não reagente
	Nova Timboteua	308	não reagente (0,000)	reagente (200)	não reagente
	Nova Timboteua	309	não testado	não reagente	não reagente
	Nova Timboteua	310	não reagente (0,494)	reagente (400)	não reagente
	Nova Timboteua	311	não reagente (0,256)	não reagente	não reagente
	Nova Timboteua	312	reagente (0,589)	não reagente	não reagente
	Nova Timboteua	313	não reagente (0,210)	não reagente	não reagente
	Nova Timboteua	314	reagente (0,587)	reagente (200)	não reagente
	Nova Timboteua	315	não reagente (-0,037)	não reagente	não reagente
	Nova Timboteua	316	não reagente (0,234)	reagente (200)	não reagente
	Nova Timboteua	317	não testado	não reagente	não reagente
	Nova Timboteua	318	não testado	não reagente	não reagente
	Nova Timboteua	319	não testado	não reagente	não reagente
	Nova Timboteua	320	reagente (0,698)	reagente (200)	não reagente
	Nova Timboteua	321	não reagente (0,242)	não reagente	não reagente
	Nova Timboteua	322	não reagente (-0,014)	não reagente	não reagente
	Nova Timboteua	323	não reagente (0,151)	não reagente	não reagente
	Nova Timboteua	324	não testado	não reagente	não reagente
	Nova Timboteua	325	não testado	não reagente	não reagente
	Nova Timboteua	326	não reagente (-0,023)	não reagente	não reagente
	Nova Timboteua	327	não testado	não reagente	não reagente
	Nova Timboteua	328	não testado	não reagente	não reagente
	Nova Timboteua	329	não testado	não reagente	não reagente
	Nova Timboteua	330	não testado	não reagente	não reagente
	Nova Timboteua	331	não testado	não reagente	não reagente
	Nova Timboteua	332	não reagente (0,477)	reagente (200)	não reagente
	Nova Timboteua	333	não reagente (0,434)	reagente (800)	não reagente
	Nova Timboteua	334	não testado	não reagente	não reagente
Nova Timboteua	335	não testado	não reagente	não reagente	
Nova Timboteua	336	não reagente (0,238)	reagente (1600)	não reagente	
Nova Timboteua	337	não testado	não reagente	não reagente	
Nova Timboteua	338	não testado	não reagente	não reagente	
Total			04 reagentes 23 não reagentes	13 reagentes 29 não reagentes	01 reagente 41 não reagentes
			27	42	42

**ANEXO 2 - Resultado do qui-quadrado após correção de Yates entre fazendas  
no teste de RIFI para *Neospora caninum*  $\chi^2$  (0,05; gl = 1) = 3,841**

Fazenda	<i>p</i>	Interpretação
1 vs 2	0,241	ns
1 vs 3	0,3178	ns
1 vs 4	<0,0001	as
1 vs 5	0,0002	as
1 vs 6	>0,05	ns
1 vs 7	>0,05	ns
1 vs 8	>0,05	ns
1 vs 9	>0,05	ns
1 vs 10	0,1522	ns
1 vs 11	>0,05	ns
1 vs 12	>0,05	ns
1 vs 13	<0,0001	as
1 vs 15	>0,05	ns
2 vs 3	0,9378	ns
2 vs 4	0,0038	as
2 vs 5	0,011	sg
2 vs 6	>0,05	ns
2 vs 7	>0,05	ns
2 vs 8	0,0292	sg
2 vs 9	0,0056	as
2 vs 10	>0,05	ns
2 vs 11	>0,05	ns
2 vs 12	>0,05	ns
2 vs 13	<0,0001	as
2 vs 15	0,0433	sg
3 vs 4	0,0022	as
3 vs 5	0,0067	as
3 vs 6	0,6356	ns
3 vs 7	>0,05	ns
3 vs 8	0,1559	ns
3 vs 9	0,0092	as
3 vs 10	>0,05	ns
3 vs 11	0,0445	sg
3 vs 12	>0,05	ns
3 vs 13	<0,0001	as
3 vs 15	0,0666	ns
4 vs 5	0,7778	ns
4 vs 6	0,0003	as
4 vs 7	0,0019	as
4 vs 8	<0,0001	as

Fazenda	<i>p</i>	Interpretação
4 vs 9	<0,0001	as
4 vs 10	0,0082	as
4 vs 11	<0,0001	as
4 vs 12	<0,0001	as
4 vs 13	<0,0001	as
4 vs 15	<0,0001	as
5 vs 6	0,0011	as
5 vs 7	0,0058	as
5 vs 8	<0,0001	as
5 vs 9	<0,0001	as
5 vs 10	0,022	sg
5 vs 11	<0,0001	as
5 vs 12	<0,0001	as
5 vs 13	<0,0001	as
5 vs 15	<0,0001	as
6 vs 7	>0,05	ns
6 vs 8	>0,05	ns
6 vs 9	0,0407	sg
6 vs 10	>0,05	ns
6 vs 11	>0,05	ns
6 vs 12	>0,05	ns
6 vs 13	<0,0001	as
6 vs 15	>0,05	ns
7 vs 8	>0,05	ns
7 vs 9	0,0105	sg
7 vs 10	>0,05	ns
7 vs 11	0,0495	sg
7 vs 12	>0,05	ns
7 vs 13	<0,0001	as
7 vs 15	>0,05	ns
8 vs 9	>0,05	ns
8 vs 10	>0,05	ns
8 vs 11	>0,05	ns
8 vs 12	>0,05	ns
8 vs 13	<0,0001	as
8 vs 15	>0,05	ns
9 vs 10	0,0025	as
9 vs 11	>0,05	ns
9 vs 12	>0,05	ns
9 vs 13	0,0053	as

Fazenda	<i>p</i>	Interpretação
9 vs 15	>0,05	ns
10 vs 11	0,0149	sg
10 vs 12	0,0343	sg
10 vs 13	<0,0001	as
10 vs 15	0,0237	sg
11 vs 12	>0,05	ns
11 vs 13	0,0008	as
11 vs 15	>0,05	ns
12 vs 13	0,0003	as
12 vs 15	>0,05	ns
13 vs 15	0,0004	as

(sg) resultado significativo; (as) resultado altamente significativo; (ns) resultado não significativo

**ANEXO 3 - Resultado qui-quadrado após correção de Yates entre fazendas no teste de ELISA para *Neospora caninum*  $\chi^2$ t (0,05; gl = 1) = 3,841**

Fazenda	<i>p</i>	Interpretação
1 vs 2	<0,0001	as
1 vs 3	0,0006	as
1 vs 4	>0,05	ns
1 vs 5	>0,05	ns
1 vs 6	0,0223	sg
1 vs 7	<0,0001	as
1 vs 8	<0,0001	as
1 vs 9	0,0001	as
1 vs 10	<0,0001	as
1 vs 11	>0,05	ns
1 vs 12	>0,05	ns
1 vs 13	0,0134	sg
1 vs 14	0,001	as
1 vs 15	0,0084	as
2 vs 3	0,0033	as
2 vs 4	<0,0001	as
2 vs 5	<0,0001	as
2 vs 6	<0,0001	as
2 vs 7	>0,05	ns
2 vs 8	>0,05	ns
2 vs 9	>0,05	ns
2 vs 10	>0,05	ns
2 vs 11	<0,0001	as
2 vs 12	<0,0001	as
2 vs 13	0,0002	as
2 vs 14	0,0024	as
2 vs 15	0,0003	as
3 vs 4	0,0463	sg
3 vs 5	>0,05	ns
3 vs 6	<0,0001	as
3 vs 7	0,0033	as
3 vs 8	>0,05	ns
3 vs 9	>0,05	ns
3 vs 10	0,0033	as
3 vs 11	>0,05	ns
3 vs 12	0,001	as
3 vs 13	>0,05	ns
3 vs 14	>0,05	ns
3 vs 15	>0,05	ns
4 vs 5	>0,05	ns

Fazenda	<i>p</i>	Interpretação
4 vs 6	0,0002	as
4 vs 7	<0,0001	as
4 vs 8	0,001	as
4 vs 9	0,0142	sg
4 vs 10	<0,0001	as
4 vs 11	>0,05	ns
4 vs 12	>0,05	ns
4 vs 13	>0,05	ns
4 vs 14	>0,05	ns
4 vs 15	>0,05	ns
5 vs 6	<0,0001	as
5 vs 7	<0,0001	as
5 vs 8	0,0042	as
5 vs 9	0,045	sg
5 vs 10	<0,0001	as
5 vs 11	>0,05	ns
5 vs 12	>0,05	ns
5 vs 13	>0,05	ns
5 vs 14	>0,05	ns
5 vs 15	>0,05	ns
6 vs 7	<0,0001	as
6 vs 8	<0,0001	as
6 vs 9	<0,0001	as
6 vs 10	<0,0001	as
6 vs 11	<0,0001	as
6 vs 12	0,0165	sg
6 vs 13	<0,0001	as
6 vs 14	<0,0001	as
6 vs 15	<0,0001	as
7 vs 8	>0,05	ns
7 vs 9	>0,05	ns
7 vs 10	>0,05	ns
7 vs 11	<0,0001	as
7 vs 12	<0,0001	as
7 vs 13	0,0002	as
7 vs 14	0,0024	as
7 vs 15	0,0003	as
8 vs 9	>0,05	ns
8 vs 10	>0,05	ns
8 vs 11	0,0024	as

Fazenda	<i>p</i>	Interpretação
8 vs 12	<0,0001	as
8 vs 13	0,0269	sg
8 vs 14	>0,05	as
8 vs 15	0,0408	sg
9 vs 10	>0,05	ns
9 vs 11	0,0288	sg
9 vs 12	0,0002	as
9 vs 13	>0,05	ns
9 vs 14	>0,05	ns
9 vs 15	>0,05	ns
10 vs 11	<0,0001	as
10 vs 12	<0,0001	as
10 vs 13	0,0002	as
10 vs 14	0,0024	as
10 vs 15	0,0003	as
11 vs 12	>0,05	ns
11 vs 13	>0,05	ns
11 vs 14	>0,05	ns
11 vs 15	>0,05	ns
12 vs 13	0,0183	sg
12 vs 14	0,0015	as
12 vs 15	0,0116	sg
13 vs 14	>0,05	ns
13 vs 15	>0,05	ns
14 vs 15	>0,05	ns

(sg) resultado significativo; (as) resultado altamente significativo; (ns) resultado não significativo