



**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

CLOVIS LAURINDO DA SILVA

**“INQUÉRITO SOROLÓGICO DE *Neospora caninum* EM
REBANHOS BOVINOS LEITEIROS NO MUNICÍPIO DE
PARAUPEBAS, MESORREGIÃO SUDESTE DO ESTADO DO
PARÁ”.**

Belém
2010

CLOVIS LAURINDO DA SILVA

“INQUÉRITO SOROLÓGICO DE *Neospora caninum* EM REBANHOS BOVINOS LEITEIROS NO MUNICÍPIO DE PARAUAPEBAS, MESORREGIÃO SUDESTE DO ESTADO DO PARÁ”.

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: Sanidade Animal.
Orientador: Professor Doutor José de Arimatéa Freitas.

Belém
2010

CLOVIS LAURINDO DA SILVA

“INQUÉRITO SOROLÓGICO DE *Neospora caninum* EM REBANHOS BOVINOS LEITEIROS NO MUNICÍPIO DE PARAUPEBAS, MESORREGIÃO SUDESTE DO ESTADO DO PARÁ”.

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: Sanidade Animal.

Data: 29/06/2009

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José de Arimatéa Freitas - UFRA
(Presidente)

Prof. Dr^a. Hilma Lúcia Tavares Dias - UFPA
(Titular)

Prof. Dr. Washington Luis Assunção Pereira - UFRA
(Titular)

À Deus, a minha esposa, Tatiana,
e aos meus filhos, Glauco e
Flávio.

AGRADECIMENTOS

Às instituições envolvidas no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará-UFPa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA – Amazônia Oriental e Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA, por dar prioridades para pesquisas na região Amazônica.

À Universidade Estadual de Londrina-UEL que apoiou em seu laboratório de Zoonose e Saúde Pública para análises das amostras de soro.

À prefeitura municipal de Parauapebas, pelo apoio logístico.

Ao Laboratório Aliança de Parauapebas pela cessão do espaço e equipamentos para a centrifugação do material.

Ao meu orientador, professor Dr. José de Arimatéa Freitas, pela competência, amizade e esforço despendido para que esta pesquisa, pioneira na Mesorregião sudeste do estado do Pará, se concretizasse.

Ao Professor Dr. João Luis Garcia, pela sua competência, dedicação e por ter viabilizado o estágio no laboratório de Zoonose e Saúde Pública da Universidade Estadual de Londrina-UEL.

À banca examinadora de qualificação compostas pelos professores Dr. Cláudio Araújo, Dr^a. Hilma Lúcia Tavares Dias e Dra. Nazaré Fonseca de Souza.

Aos meus pais, irmãos e irmão por terem viabilizado o curso de graduação em medicina veterinária, sem o qual não seria possível dar mais um passo que foi essa pós-graduação que além de pioneira na região Sudeste do estado do Pará, é de grande importância para minha vida pessoal e profissional.

Aos estagiários, residentes, mestrandos e doutorandos do laboratório de Zoonose e Saúde Pública da UEL pelo auxílio nas análises laboratoriais.

Ao senhor Milton Zimmer Schineider e José Alves Lima que não pouparam esforços para que eu pudesse me deslocar para Belém no estado do Pará e Londrina no estado do Paraná para que eu pudesse fazer os créditos e análises laboratoriais, respectivamente, para a realização do mestrado.

RESUMO

Neospora caninum é um protozoário coccídeo que tem ampla difusão e provoca consideráveis prejuízos aos criatórios dos animais. Para levantar a freqüência de ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos leiteiros do município de Parauapebas, Mesorregião Sudeste do Estado do Pará, 465 amostras de soros de bovinos leiteiros de 45 propriedades rurais foram submetidos à reação de imunofluorescência indireta (RIFI), adotando-se como ponto de corte a diluição 1:100; 62 (13,33 %) amostras de soros demonstraram a presença de anticorpos anti-*N. caninum*, distribuídos pelos seguintes percentuais e títulos 27(43,55 %) na titulação 1:100; 14 (22,58 %) na 1:200; 16 (25,80) na 1:400 e 5 (8,07 %) com título de 1:800. Nenhum animal apresentou título superior a 1:800; não foi observada diferença significativa entre os sexos dos animais, mas, animais com idade igual ou superior a cinco anos apresentaram percentagem maior de soros positivos, proporcionalmente à quantidade coletada em relação aos animais mais jovens. Os resultados demonstram que os bovinos leiteiros no município de Parauapebas tinham com uma considerável freqüência anticorpos anti-*N. caninum*. Medidas e ações de vigilância sanitária são recomendadas para prevenir a entrada de novas fontes de *N. caninum* nos rebanhos e controlar a difusão desse agente no criatório regional.

Palavras-chave: Neosporose. Bovinos Leiteiros. *Neospora caninum*. Sorologia. Imunoinfluorescência. Pará.

ABSTRACT

Serologic survey of anti-*Neospora caninum* antibodies in milkmen of Parauapebas county, Southeast Mesoregion of Pará State. *Neospora caninum* is a world-wide coccidian protozoa which causes considerable damages at animals breeding. To survey the frequency of anti-*N. caninum* antibodies in bovine milkmen in Parauapebas county, Southeast Mesoregion of Pará State, Northern Brazil, 465 serum samples coming from 45 farmers were submitted to indirect immunofluorescence reaction (cutting point 1:100); 62 (13,33%) samples have demonstrated the presence of anti-*N. caninum* antibodies, with the following distribution: 27 (43,55%) in 1:100 dilution; 14 (22,58%) in 1:200 dilution; 16 (25,80%) in 1:400; and 5 (8,07%) in 1:800 dilution. None serum had tittle in over 1:800 dilution. In a high percentage there was only an animal with anti-*N. caninum* antibodies; the major frequency was observed between females, but was'nt observed significative difference between animal sexes; animals with equal or over five years old presented major percentage of positive serum proporcionaly to number of positives serum of younger animals. The results have demonstrated that bovine milkmen of Parauapebas county had a considerable frequency of anti-*N. caninum* antibodies. Sanitary surveillance measures are necessary to prevent the entrance of *N. caninum* and to control the difusion of this protozoa at the regional bovine milkmen.

Key words: Neosporosis. Bovine milkmen. Serology. Indirect immunofluoresce reaction. Risk factors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Taquizoítos de <i>N. caninum</i>	14
FIGURA 2	Cisto contendo Bradizoítos de <i>N. caninum</i>	14
FIGURA 3	Oocisto de <i>N. caninum</i>	14
FIGURA 4	Ciclo biológico do protozoário <i>Neospora caninum</i>	15
FIGURA 5	Mapas do Brasil, Pará e Parauapebas	27
FIGURA 6	Animais contidos, no tronco, para coleta de sangue	30
FIGURA 7	Venupunção coccígea mediana	30
FIGURA 8	Campo de microscópio demonstrando taquizóitos de <i>N. caninum</i>	35

LISTA DE TABELAS

		p.
TABELA 1	Ocorrência de <i>Neospora caninum</i> em algumas espécies segundo alguns autores com respectivo ano e local	19
TABELA 2	Soroprevalência de <i>N. caninum</i> em bovinos leiteiros segundo os resultados da RIFI	36
TABELA 3	Número de animais positivos para <i>N. caninum</i> segundo os resultados da RIFI e sexo dos animais	36
TABELA 4	Quantidade de animais positivos por titulação	37
TABELA 5	Quantidade de animais positivos por propriedade	38
TABELA 6	Quantidade de animais positivos por localidade	39
TABELA 7	Quantidade de animais positivos que pertenciam às propriedades onde ocorreram animais natimortos	39
TABELA 8	Quantidade de animais soropositivos em relação às propriedades que ocorreram abortamentos	40
TABELA 9	Quantidade de animais soropositivos e soronegativos em relação à repetição de cio	40
TABELA 10	Quantidade de animais soropositivos pertencentes a propriedades com histórico de infertilidade	40
TABELA 11	Quantidade de animais soropositivos pertencentes a propriedades com histórico de animal doente	41
TABELA 12	Quantidade de animais soropositivos em relação à presença de cães nas propriedades	41
TABELA 13	Tipo de alimento consumido pelos cães em relação à soropositividade dos animais	41
TABELA 14	Maneira que os cães são criados em relação ao número de bovinos positivos	42
TABELA 15	Destino dos dejetos nas propriedades estudadas	42
TABELA 16	Destino das Carcaças dos animais que morrem nas propriedades	42
TABELA 17	Forma em que se destinam os produtos de abortamentos nas propriedades estudadas	43
TABELA 18	Tipos de cuidados dispensados aos recém-nascidos nas propriedades	43
TABELA 19	Porcentagem de animais positivos proporcionalmente a cada faixa etária	44
TABELA 20	Número de partições das fêmeas estudadas	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	12
2.2	HISTÓRICO	12
2.3	ETIOLOGIA E CICLO BIOLÓGICO	13
2.4	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	15
2.5	EPIDEMIOLOGIA	16
2.5.1	Ocorrência	18
2.6	PATOGENIA E RESPOSTA IMUNE	20
2.7	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E LESÕES	21
2.7.1	Bovinos e Bubalinos	21
2.7.2	Outros Ruminantes	22
2.8	DIAGNÓSTICO	23
2.9	TRATAMENTO	24
2.10	PREVENÇÃO E CONTROLE	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	MATERIAL	26
3.1.1	Amostras de Estudo	26
3.1.2	Local de Estudo	26
3.1.3	Rebanhos e Animais	28
3.2	MÉTODOS	29
3.2.1	Estudo Estatístico	29
3.2.2	Levantamento de Fatores de Risco	29
3.2.3	Coleta de Sangue	30
3.2.4	Diagnóstico Sorológico	31
3.2.4.1	Confecção da Lâmina para RIFI	31
3.2.4.2	Prova da RIFI	32
3.2.4.2.1	Preparo do antígeno	32
4	RESULTADOS	36
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva do leite é uma das mais importantes do complexo agroindustrial brasileiro. O leite e seus derivados desempenham um papel relevante no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda. Movimenta anualmente cerca de U\$\$ 10 bilhões, emprega três milhões de pessoas, das quais mais de um milhão são produtores rurais que produzem aproximadamente 25 bilhões de litros de leite por ano, produto que supera outros tradicionais como o café e o arroz (FERNANDES et al., 2005).

Entre 1990 e 2000, a produção nacional de leite cresceu 37%, e o setor demonstrou capacidade de gerar novos postos de trabalho em todo o País. A cada aumento de R\$ 5.080,78 na demanda final por leite e derivados um emprego permanente é gerado na economia Nacional (CARVALHO et al., 2002; NOGUEIRA NETO ; GOMES, 2007).

No período de 1990 a 2001 a região Norte do Brasil foi a que apresentou o maior índice de crescimento, com um aumento de 122,7% na produção de leite. Este incremento ocorreu como consequência da expansão horizontal da produção no campo. O rebanho dessa região apresenta características de criação extensiva com grande restrição à produção racional, já que existem limitações quanto ao padrão genético, manejo nutricional e sanitário dos animais. Na região Norte os estados maiores produtores de leite são o Estado do Pará (41%), Rondônia (38%) e Tocantins (13%) (CARVALHO et al., 2002; BRESSAN; VILELA, 2003; HOMMA et al., 2005; FERREIRA et al., 2006; IBGE, 2007).

O Município de Parauapebas possui 984 estabelecimentos agropecuários e um rebanho de 129.500 cabeças de bovinos, dessas 401 propriedades rurais criam bovinos leiteiros e ordenham 15.500 vacas diariamente e produzem 6.975.000 litros de leite anualmente (IBGE, 2007).

O rebanho leiteiro de Parauapebas é caracterizado pelo cruzamento não controlado de várias raças como: Tabapuã, Pardo Suíço, Nelore e mestiço com vacas de grau de mestiçagem variado (ADEPARÁ, 2007).

A saúde, perfeitamente integrada à alimentação e a genética, forma a base sobre a qual se sustenta qualquer tipo de atividade pecuária, inclusive a leiteira. Animais saudáveis garantem a produção de leite compatível com as suas performances, não levam a gastos adicionais com medicamentos e serviços médicos veterinários, além de não representarem riscos para a saúde pública e para os animais. Os problemas sanitários dos rebanhos leiteiros e

o controle efetivo das enfermidades devem ser levados em consideração quando se pretende aumentar a rentabilidade do sistema produtivo. À medida que a competitividade aumenta na cadeia produtiva do leite é preciso avaliar o efeito que as perdas sanitárias representam na rentabilidade da produção de leite. Deve-se ter a preocupação de verificar se doenças infecciosas de elevada importância sanitária e econômica está contribuindo para estes prejuízos (HOMMA et al., 2005).

Nesse contexto, a neosporose, doença infecciosa parasitária produzida pelo protozoário coccídeo, *Neospora caninum*, possui grande importância econômica, devido, principalmente às perdas reprodutivas que incluem retornos ao cio a intervalos irregulares, abortamentos, nascimento de bezerros fracos e inviáveis, sinais e sintomas neurológicos e persistência da infecção nos rebanhos (VOGEL et al., 2006).

Portanto, a situação atual da pecuária leiteira na Mesorregião Sudeste Paraense indicou a necessidade da realização deste estudo, considerando o panorama da produção de leite e os obstáculos representados pela sanidade animal.

No Estado do Pará a literatura científica disponível registra ocorrência de *N. caninum* em búfalos na região metropolitana de Belém (GENNARI et al., 2005) e em gado de corte e de leite em Santarém (MINERVINO et al., 2008), porém não registra pesquisa sobre a soroprevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos leiteiros na Mesorregião Sudeste do Estado do Pará e como é hábito dos produtores abaterem as matrizes que abortam por considerarem que abortamentos são conseqüências de infecção por *Brucella abortus*, sem realizar nenhum exame laboratorial. Assim, o presente trabalho tem como objetivo diagnosticar a soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros criados em propriedades rurais localizadas no Município de Parauapebas, Mesorregião Sudeste do Estado do Pará.

Como objetivos específicos pretendem-se associar a ocorrência de *N. caninum* com fatores de riscos nas unidades produtoras entre elas o histórico de abortamento nos criatórios.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

N. caninum é um parasita intracelular obrigatório causador de uma doença de importância econômica e de expressão mundial, que tem o cão (*Canis familiares*) e o coiote (*Canis latrans*) como hospedeiros definitivos e os bovinos, entre outras espécies, como hospedeiros intermediários (McALLISTER et al., 1998; COSTA et al., 2001; GONDIM, et al., 2004; SPURI, 2006; VOGEL et al., 2006).

O *N. caninum* tem sido implicado como uma das principais causas de abortamento e infecção neonatal em bovinos, ovinos, eqüinos, bubalinos e caprinos, entre outras espécies, em várias partes do mundo (FERNANDES, 2003; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006; SPURI, 2006; VOGEL et al., 2006; FARIAS, 2008).

2.2 HISTÓRICO

Na Noruega, Bjerkas et al. (1984), observaram um protozoário semelhante ao *Toxoplasma gondii* em tecidos de cães com meningoencefalite, miosite, encefalomielite, quadro de paralisia com a presença de cistos no cérebro e tecido muscular. Foi verificado que este agente causava uma forma clínica mais severa que *T. gondii*, sem a presença de anticorpos contra este agente. Nos anos seguintes foi identificado o agente em placenta de bovinos, em bezerros com paralisia neonatal, e em natimortos e em fetos bovinos.

Dubey et al. (1988), observando um quadro similar ao descritos pelos pesquisadores noruegueses, sugeriram um novo gênero e espécie e classificaram o protozoário *N. caninum* no filo Apicomplexa, família Sarcocystidae.

Em 1988 foi verificado que esse agente causava uma forma clínica mais severa do que a doença causada por *T. gondii*, constatadas as diferenças estruturais e histopatológicas entre

ambos. Em 1989, Thilsted e Dubey descobriram que *N. caninum* era responsável por abortamentos em bovinos. Exames de amostras tissulares revelaram que este parasita acometia cães com sinais neurológicos desde os anos de 1950.

Posteriormente McAllister et al. (1998) descobriram que os cães são os seus hospedeiros definitivos. Pronost et al. (1999), descreveram na França casos de abortamentos em bovinos causados por *N. caninum*. Pitel et al. (2003) estabeleceram o seu DNA através da extração do parasita em cérebro e coração de feto e em placenta de égua. Gondim et al. (2004), descobriram que os coiotes, assim como os cães domésticos, também são hospedeiros definitivos deste protozoário.

2.3 ETIOLOGIA E CICLO BIOLÓGICO

N. caninum pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, sub-classe Coccidiasina, ordem Eucoccidiorida, família Sarcocystidae, sub-família Toxoplasmatinae, gênero *Neospora* e espécie *Neospora caninum* (DUBEY, et al., 1988, MUGRIDGE et al., 1999; COSTA et al., 2001; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006; SPURI, 2006).

N. caninum apresenta um ciclo de vida semelhante ao do *T. gondii*, com uma fase sexuada nos hospedeiros definitivos (HD) cães e coiotes e assexuada nos hospedeiros intermediários (HI), bovinos e outros ruminantes, gatos, equinos, aves entre outras espécies (COSTA et al., 2001; COSTA et al., 2008).

O ciclo de *N. caninum* entre animais domésticos e silvestres foi demonstrado através da transmissão do parasito entre cervídeos e cães, assim como entre coiotes e bezerros. A participação da fauna silvestre no ciclo de transmissão deste parasito dificulta o seu controle (GONDIM, et al., 2004; YAI et al., 2005; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006).

Os taquizoítos (fig. 1) e os bradizoítos que estão dentro do cisto (fig. 2) são as formas do parasito encontradas intracelularmente no hospedeiro intermediário. Os taquizoítos possuem forma de lua e medem em torno de 6 X 2 mm de comprimento, e podem ser encontrados em diferentes células do corpo. Os cistos são de forma oval, podem medir até 107 mm de diâmetro e são encontrados nas células do sistema nervoso. Os bradizoítos medem em torno de 7 x 1,5 mm de comprimento. Os oocistos (fig. 3) são eliminados nas fezes do

hospedeiro definitivo e permanecem viáveis por longo período e são ingeridos pelos hospedeiros intermediários com alimentos contaminados (VOGEL et al., 2006).

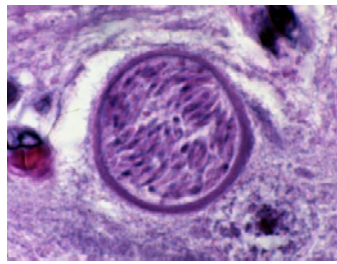
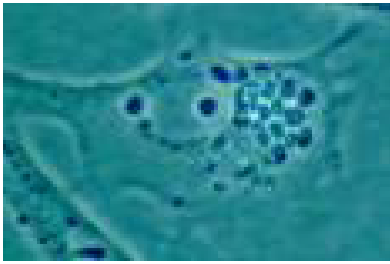


Figura 1: Taquizoítos

Figura 2: Cisto contendo Bradizoítos

Figura. 3 : Oocisto

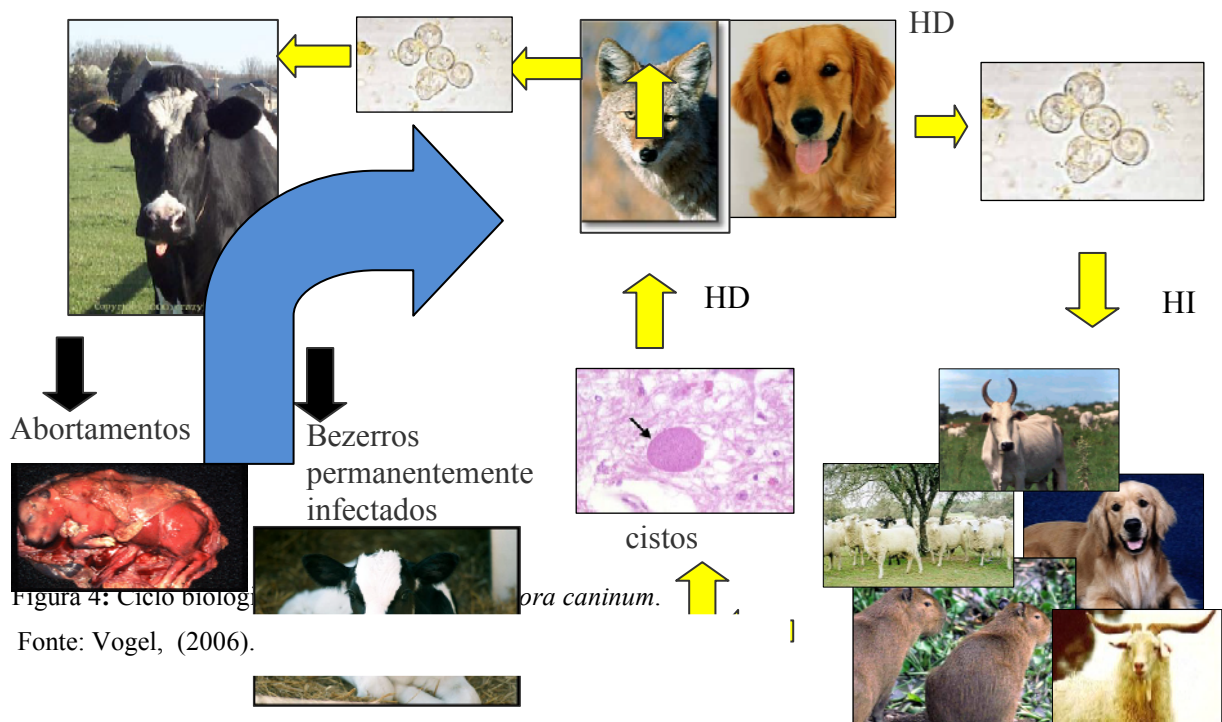
Fonte: <http://images.google.com.br/images?hl=pt-BR&um=1&sa=1&q=neospora+caninum&aq=0&oq=neospora>.

Os hospedeiros definitivos são infectados ao consumirem tecidos contendo o parasito na forma cística, oriundo de hospedeiros intermediários. Em seguida ocorre a fase sexuada no HD, com a multiplicação no intestino e liberação dos oocistos nas fezes. O HI se infecta ingerindo alimentos contaminados com fezes contendo oocistos esporulados. No estômago do HI, os oocistos rompem-se pela ação mecânica liberando os esporozoítos, que invadem os tecidos e sofrem multiplicação assexuada originando taquizoítos móveis, que são encontrados em desenvolvimento dentro de vacúolos parasitóforos de várias células (neurônios, macrófagos, fibroblastos, miócitos, etc.). Os cistos que tem bradizoítos são encontrados no tecido nervoso central e periférico e podem ficar em latência por vários meses ou anos, restabelecendo o ciclo quando consumido por um HD (SPURI, 2006).

Os bradizoítos ficam dentro dos cistos teciduais, como forma de proteção contra reações imunológicas e fisiológicas do hospedeiro. Os cistos têm forma arredondada e parede lisa apresentando ramificações e espessura que depende do tempo de infecção (VOGEL et al., 2006).

Os taquizoítos são ovóides, possuem três organelas secretoras diferentes que participam da invasão, formação e manutenção do vacúolo parasitóforo¹, o que permite a proliferação do parasito (HEMPHILL et al., 2000).

¹ vacúolo parasitóforo (VP) é quando o parasito é encontrado no interior de um vacúolo citoplasmático revestido por membrana. Neste local é aonde irá se multiplicar. A membrana do VP incorpora componentes da célula hospedeira e do parasito, estabelecendo assim uma "membrana híbrida", impedindo a fusão com lisossomas, o que irá contribuir para a sobrevivência do parasito.



2.4 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A importância econômica da neosporose tem sido descrita principalmente nos bovinos, pois em outros animais ainda não existem relatos dos prejuízos e vem se destacando como importante doença reprodutiva na pecuária leiteira e de corte, acarretando perdas econômicas significativas. Esta enfermidade provoca diminuição de 3 a 4 % na produção de leite, descarte prematuro de animais e abortamento entre o terceiro e o nono mês de gestação (ANDREOTTI, 2001; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006).

Um estudo realizado no Canadá estimou um custo aproximado de US\$ 2.304 por ano por animal. Nos Estados Unidos a neosporose é considerada a mais importante causa de abortamentos em rebanho leiteiro e a segunda em gado de corte. Na Califórnia, o prejuízo causado pelo *N. caninum* na indústria leiteira foi estimado em 35 milhões de dólares por ano. Ainda na Califórnia foi verificado que vacas soropositivas produzem 1 litro/dia a menos em relação às soronegativas; já no Texas (EUA), após a introdução da neosporose, as perdas estimadas na indústria de carne aumentaram de 15 para 24 milhões de dólares em rebanhos infectados (ANDREOTTI, 2001; COSTA et al., 2001; HERNANDEZ et al., 2001; SPURI, 2006; VOGEL et al., 2006).

Estudos recentes demonstraram que novilhas e bezerros soropositivos para *N. caninum* apresentaram menor ganho de peso quando comparados aos soronegativos, cerca de 0,05 kg/dia. Animais soropositivos precisaram consumir 2,2 kg a mais de matéria seca para o ganho de cada 1,0 kg de peso vivo quando comparados a animais soronegativos, o que demonstra haver uma diminuição na eficiência da conversão alimentar determinada pela doença (CARVALHO NETA; TORRES JÚNIOR, 2006).

A soroprevalência em vacas com histórico de abortamentos foi 3,4 vezes superior, quando comparada com as vacas sem abortamentos. Em vacas sororreagentes ao *N. caninum* têm duas a três vezes mais chances de ocorrer o abortamento do que com sorologia negativa, sendo o risco de ter um bezerro natimorto 28 vezes maior (VOGEL et al., 2006).

2.5 EPIDEMIOLOGIA

Todos os protozoários da família Sarcocystidae têm os carnívoros como hospedeiros definitivos e uma ou mais espécies de suas possíveis presas como hospedeiros intermediários (SPURI, 2006). Suspeita-se que outros canídeos silvestres possam também servir como hospedeiros definitivos e eliminar oocistos nas fezes (MCALLISTER et al., 1998, GONDIM, et al., 2004; FARIAS, 2008).

Os bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos búfalos e outros animais como cervos, ratos silvestres, raposas e mesmo cães, coiotes e felinos, entre outros são os hospedeiros intermediários (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006).

O cão e o coiote também atuam como hospedeiros intermediários formando cistos em seus tecidos, à semelhança dos outros hospedeiros intermediários. Não há relatos no mundo de casos da doença em humanos, embora já tenham sido detectados anticorpos anti-*N. caninum* no homem (FARIAS, 2008).

Este parasito não apresenta predileção por sexo ou idade dos animais. No entanto, pesquisas indicam maiores prevalências de soropositivos para *N. caninum* entre bovinos de leite do que no gado de corte (GUIMARÃES JÚNIOR; ROMANELLI, 2006; MARGARIDO et al., 2008).

Bovinos sorologicamente positivos têm maiores riscos de abortamentos e vacas soropositivas que abortaram têm 5,7 vezes mais risco de ter novamente abortamento na próxima prenhes (THURMOND; HIETALA, 1997; DAVIDSON et al., 1999).

Em vários estudos realizados na Escócia, Irlanda do Norte, Inglaterra e Argentina foi constada maior soroprevalência em rebanhos com histórico de abortamento (VENTURINI, et al., 1999).

Ao contrário do *T. gondii* o *N. caninum* pode ser transmitido verticalmente por gestações consecutivas. Embora estudos soropidemiológicos demonstrem que oocistos constituem-se um dos fatores para a manutenção do parasito nos rebanhos, a transmissão vertical é o modo mais freqüente da infecção por *N. caninum* em bovinos (BJÖRKMAN, 1999; VOGEL et al., 2006).

Na transmissão horizontal, os oocistos eliminados nas fezes dos cães esporulam no meio-ambiente e podem infectar outros animais que venham a ingeri-los através da água e dos alimentos e pela ingestão de cistos teciduais por carnívoros (FERNANDES et al., 2003; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006).

A infecção vertical ocorre através da transmissão transplacentária da mãe para o feto (FERNANDES et al., 2003).

A principal fonte de infecção para os bovinos é a transplacentária, pouco freqüente em cães, mas também relatada em eqüinos, ovinos caprinos, suínos, gatos, camundongos e macacos (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006).

Os cães se infectam após a ingestão de tecidos dos hospedeiros intermediários contendo bradizoítos encistados. Em população canina, a soroprevalência varia de região para região, sendo maior entre os cães rurais quando comparados aos urbanos (SAWADA et al., 1998).

Souza et al. (2001), pesquisando a soroprevalência entre cães de propriedades leiteiras do norte do Paraná verificaram que é maior naqueles com mais de um ano de idade do que naqueles com idade inferior, indicando a importância de exposição pós-natal.

Yai et al. (2005), verificaram a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em gambás, capivaras e outros animais silvestres oriundos de estados brasileiros das regiões Sul, Sudeste, Norte e Nordeste. Portanto nesses estados pode ter alguma espécie silvestre que possa ser hospedeiro definitivo do agente, aumentando, deste modo, a dificuldade de controle deste parasito.

2.5.1 Ocorrência

O *N. caninum* ocorre em várias partes do mundo como: Noruega, Dinamarca, Irlanda, Suécia, Holanda, Reino Unido, Hungria, Espanha, Suíça, México, Estados Unidos da América, Canadá e Nova Zelândia, Vietnam, Japão, Argentina, Chile entre outros (BJERKAS et al., 1988; ABBIT et al., 1993; AGERHOLM; BARR, 1994; McALLISTER et al., 1996; McNAMEE; JEFFREY, 1994; HOLMDAHL; BJÖRKMAN, 1999; UGGLA, 1995 OTTER et al., 1995; CAMPERO et al., 1998; FONDEVILA et al., 1998; HORNOK et al., 1998; HUONG et al., 1998, PARÉ et al., 1998; GONZALES et al., 1999; GOTTSTEIN et al., 1999; MELENDEZ, 1999; OMATA et al., 2006) Apud Guimarães Junior e Romanelli, (2006).

No Brasil, foram detectados anticorpos anti-*N. caninum* em soros de bovinos leiteiros e de corte, em rebanhos nos Estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul Rio Grande do Sul, Pará, Rondônia, entre outros, em búfalos no Pará, São Paulo, Rio Grande do Sul, Bahia, entre outros estados. Em ovinos no Estado de Rondônia, Rio Grande do Sul, Bahia, Maranhão, Pernambuco, Paraná, e São Paulo; em cães no Estado de Rondônia e Maranhão entre outros (COBERLLINI et al., 2000; AGUIAR et al., 2005; CORBELLINI, 2005; GENNARI, et al., 2005; RODRIGUES et al., 2005; TEXEIRA, et al., 2006; VOGEL et al., 2006; ALMEIDA et al., 2007; GONDIM, 2007,).

No Estado do Pará foram realizadas duas pesquisas até o momento, sendo uma em búfalos, onde Gennari et al. (2005), realizaram exames de 196 búfalos de três fazendas usando o mesmo método de diagnóstico utilizado neste trabalho e, encontraram, 139 animais com reação $\geq 25 < 200$ e 40 animais ≥ 200 . Minervino et al. (2008), pesquisando a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em 40 vacas pertencentes a quatro fazendas e 120 vacas de corte pertencentes a 12 fazendas localizadas em Santarém Estado do Pará, utilizando a RIFI, com ponto de corte 1:100, verificaram uma prevalência de 19,2 % e 17,5 % para bovinos de corte e de leite, respectivamente.

A TABELA 1 resume a ocorrência com respectiva frequência de anticorpos anti-*N. caninum* em diferentes espécies no Brasil.

Tabela 1: Ocorrência de *Neospora caninum* em algumas espécies segundo alguns autores com respectivo ano e local.

Espécie (%)	Autor/ano	Local
Búfalos (70,9)	GENNARI et al., 2005	Pará
Búfalos 14,6)	VOGEL, et al., 2006	Rio Grande do Sul
Búfalos (35,9)	GONDIM et al., 2007.	Bahia
Bovinos de leite (14,9)	GONDIM et al., 1999.	Bahia
Bovinos de leite (15,9)	SARTOR et al., 2003	São Paulo
Bovinos de leite (11,2)	AGUIAR et al., 2005	Rondônia
Bovinos de leite (17,8)	CORBELLINI et al., 2005.	Rio Grande do Sul
Bovinos de leite (35,54)	SARTOR et al., 2005	São Paulo
Bovinos de leite (19%)	MINERVINO et al., 2008	Pará
Bovinos (28,2), (29), (22,2) e (14,7)	RAGOZO et al., 2003.	Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná e Rio de Janeiro.
Bovinos de corte (9,5)	AGUIAR et al., 2005	Rondônia
Bovinos de corte (20)	SARTOR et al., 2005	São Paulo
Bovinos (11,4)	VOGEL, et al., 2006	Rio Grande do Sul
Bovinos de corte (19%)	MINERVINO et al., 2008	Pará
Ovinos (3,2)	VOGEL, et al., 2006	Rio Grande do Sul
Ovinos (11,4)	VOGEL, et al., 2006	Rio Grande do Sul
Cães (58,97)	HASEGAWA et al., 2004.	São Paulo
Cães domiciliados (13,3)	JESUS et al., 2006	Bahia
Cães errantes (11,2)	JESUS et al., 2006	Bahia
Cães rurais (14,1)	CUNHA FILHO, 2007.	Rio Grande do Sul
Cães urbanos (5,5)	CUNHA FILHO, 2007.	Rio Grande do Sul

Fonte: adaptados de vários autores.

2.6 PATOGENIA E RESPOSTA IMUNE

O *N. caninum* é um parasita que causa a morte da célula devido à multiplicação dos taquizoítos. Os protozoários atingem as células alvos pelas vias sanguínea e linfática. O parasito precisa reconhecer a célula hospedeira para estabelecer a infecção. Proteínas são usadas como receptores do parasito, que invade a célula hospedeira por meio de fechamento das membranas até ser englobado pela membrana do vacúolo parasitóforo. O parasito provoca mudanças metabólicas no hospedeiro que favorecem a invasão. Depois da penetração, o vacúolo se desloca para o interior da célula hospedeira. No fim do desenvolvimento intracelular, o vacúolo parasitóforo se desintegra antes de ocorrer lise celular e os taquizoítos vão infectar células adjacentes, transformando-se em bradizoítos que são capazes de formar cistos teciduais e persistir por vários anos sem provocar sinais clínicos (SPURI, 2006).

O abortamento por *N. caninum* é causado por taquizoítos que se originam da reativação de bradizoítos, e ou cistos teciduais ou oocistos que foram ingeridos durante a gestação. Os taquizoítos multiplicam-se rapidamente, atravessam a placenta e infectam o feto e, dependendo da idade gestacional, pode ocorrer o abortamento. Os fatores que influenciam na patogênese do abortamento são: fase da gestação em que ocorre a parasitemia; a quantidade e duração da parasitemia; a eficiência da resposta imune materna e a capacidade da resposta imune do feto (HEMPHILL et al., 2000).

Devido à imaturidade imunológica do feto bovino, a infecção no início da gestação normalmente é fatal. Um feto imunocompetente é capaz de resistir à infecção, porém, provavelmente, nascerá infectado (ANDERSON et al., 2000; INNES et al., 2002).

Nos bovinos, a infecção no feto é sistêmica, com áreas de inflamação na maioria dos órgãos. A morte resulta de uma insuficiência cardíaca associada à miocardite e necrose do miocárdio e de uma placentite com necrose do epitélio coriônico. As lesões no cérebro são importantes, porém não são consideradas as principais causas da morte fetal (ANDERSON et al., 2000).

A resposta imune à infecção por *N. caninum* nas diferentes espécies é pouco estudada, porém, a relação hospedeiro-parasito depende da resposta imune do hospedeiro. Este processo determina o resultado da infecção, contribuindo na eliminação ou sobrevivência do parasito (HEMPHILL et al., 2000).

A imunidade mediada por célula é a principal resposta efetiva do organismo. A infecção experimental por *N. caninum* induz a uma resposta celular típica por linfócito T “helper” tipo 1 (Th1), caracterizada por altos níveis de interferon gama (IFN-g) e uma resposta humoral por IgG². Esta resposta Th1 controla a multiplicação dos taquizoítos. O tratamento de células de cultivo celular com IFN-g inibiu significativamente a multiplicação intracelular de *N. caninum*. Estudos *in vivo* têm mostrado que camundongos depletados de interleucina 12 (IL-12) ou INF-g são incapazes de sobreviver à infecção por *N. caninum* (BAZLER et al., 1999; INNES et al., 2002; LOCATELLI-DITTRICH, 2006).

Na ausência de uma resposta imune, os taquizoítos continuam sua multiplicação, causando destruição celular até a morte do hospedeiro. A resposta imune e a presença de outros fatores fisiológicos induzem a diferenciação dos taquizoítos em bradizoítos, estabelecendo-se uma infecção cística tecidual (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006).

2.7 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E LESÕES

2.7.1 Bovinos e Bubalinos

A infecção por *N. caninum* pode resultar em abortamento, natimortos, mumificações, nascimento de animais fracos que morrem em duas a três semanas ou podem apresentar sinais clínicos de paralisia, baixo crescimento e ganho de peso retardado. As vacas infectadas são geralmente portadoras assintomáticas; os abortamentos se concentram no segundo terço da gestação, com média em torno de cinco meses e meio (FERNANDES, 2003; SPURI, 2006).

A variação das manifestações clínicas depende da idade do feto, do estágio de desenvolvimento do sistema imune, tempo de exposição ao parasito e distribuição das lesões no Sistema Nervoso Central (SNC). Os sintomas nervosos são devido à destruição de grande número de células dos nervos craniais e espinhais que afetam a condutividade nervosa. Miosites e deformidades dos membros são devido à degeneração muscular (SPURI, 2006).

A descamação do endotélio vascular associado à trombose das carúnculas maternas pode causar o abortamento. Necrose difusa e inflamação são os achados característicos no

coração do feto e na placenta. A morte do feto, provavelmente ocorre devido à miocardite (SPURI, 2006).

A lesão mais característica é encontrada no cérebro e consiste de encefalite focal caracterizada por necrose e inflamação não-supurativa. As outras lesões são: miocardite, miosite focal e hepatite portal não supurativa (BARR et al., 1991; ANDERSON et al., 2000).

Segundo Fernandes (2003), ocorrem múltiplas áreas de necrose na substância cinzenta e branca, com ou sem hemorragias, rodeadas por infiltrado de células mononucleares. As áreas adjacentes apresentam-se vacuolizadas, com presença de esferóides eosinofílicos e gliose difusa. Ocorre hipertrofia do endotélio vascular, presença de manguitos perivasculares de células mononucleares e pequenas áreas de mineralização.

Na placenta observam-se múltiplas áreas de separação entre as vilosidades do epitélio coriônico e as criptas das carúnculas. Os músculos esqueléticos apresentam degeneração e necrose dos miócitos acompanhada de infiltrado de células mononucleares. Cistos e taquizoítos podem estar presentes ao redor das áreas necróticas observadas no SNC, tanto fora como no interior das células da glia e neurônios, dentro dos miócitos ou livres dentro do perimísio (FERNANDES, 2003, VOGEL et al., 2006).

2.7.2 Outros Ruminantes

Em fetos e natimortos caprinos foram encontradas lesões severas no SNC e coração, abortamento e sinais neurológicos. Nos ovinos os cordeiros nascem fracos e com ataxia, na necropsia podem ser encontrados cistos degenerados e intactos na medula espinhal, lesões multifocais não supurativas necrozantes e inflamação do músculo esquelético (FARIAS, 2008).

2.8 DIAGNÓSTICO

Os sinais inespecíficos da neosporose dificultam o diagnóstico clínico da doença, conseqüentemente, o diagnóstico laboratorial deve ser realizado para confirmar a infecção por *Neospora* sp. (PACKMAN et al., 2002).

Métodos diretos e indiretos são utilizados para o diagnóstico desta enfermidade. Os métodos diretos têm como base a histopatologia e a imunohistoquímica inclui-se ainda a reação em cadeia de polimerase (PCR) e o isolamento de *N. caninum* em cultura de células de camundongo de tecidos do coração, fígado e cérebro do feto e da placenta (ANDREOTTI, 2001; FERNANDES, 2003; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006; SPURI, 2006; VOGEL et al., 2006;).

Os métodos indiretos ou sorológicos são os mais usados em fêmeas que abortaram, para detectarem anticorpos anti-*N. caninum*, são eles reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), soroaglutinação direta e *western blot* (CONRAD et al., 1993; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006; SPURI, 2006; VOGEL et al., 2006).

O primeiro teste sorológico, a RIFI foi desenvolvido por Conrad e colaboradores, em 1993. O ponto discriminativo indicativo de infecção em bovinos ainda não foi totalmente padronizado, porém revisão sobre o assunto tem considerado como específico o ponto de corte 1:100 (PACKMAN et al., 2002).

A RIFI deve ser realizada dentro de um mês após o abortamento, porque os títulos de anticorpos declinam rapidamente. Neste caso, o exame deve ser repetido três semanas após. Já a sorologia fetal tem valor limitado, porque os anticorpos podem não serem detectados, uma vez que os fetos se apresentam mumificados, autolisados, imunologicamente imaturos ou não tiveram tempo entre a infecção e o abortamento para produzir os anticorpos, podendo ocorrer falsos negativos. O método de cultura de células é caro, demorado não efetivo e não é realizado como método de rotina (SPURI, 2006).

Na maioria dos casos, os parasitos estão em número muito pequeno no cérebro e, raramente, são observados nos cortes histológicos. Na prática o resultado deve ser associado aos dados epidemiológico, e ao diagnóstico diferencial para outras doenças que causam abortamentos (SPURI, 2006; FARIAS, 2008).

A presença de anticorpos séricos para *Neospora* sp. pode indicar a exposição ao parasita ou um parasitismo estritamente relacionado e passível de reação cruzada, não indicando necessariamente a existência de uma infecção ativa (VARDELEON et al., 2001).

A associação das técnicas de diagnóstico é indicada para aumentar as chances de detecção dos protozoários nos fetos, entretanto, a confirmação da infecção deve ser realizada por método imunohistoquímico ou por PCR, porque outros protozoários podem causar lesões similares (JENKINS et al., 2002; PEREIRA-BUENO et al., 2003).

O diagnóstico clínico no cão também é difícil, pois a sintomatologia nervosa pode confundir com traumatismos, patologias do disco intervertebral, cinomose, raiva, entre outros. Exames hematológicos e bioquímica clínica podem auxiliar (elevação dos níveis de creatinina, enzimas hepáticas, proteínas totais do líquido). Podem ser detectados bradizoítos no líquido. Nas fezes, podem ser encontrados oocistos que precisam ser diferenciados de outros gêneros após sua esporulação, principalmente de *Hammondia* sp. cujo oocisto também é dispórico e tetrazóico (2 esporocistos, com 4 esporozoítos cada), além de ter tamanho similar. Para isso é feita inoculação experimental em animais de laboratório (preferencialmente gerbis). As provas sorológicas mais utilizadas são RIFI e ELISA. A imunofluorescência com título maior ou igual a 1:50 indica exposição do cão ao agente. Um título maior ou igual a 1:800, em cão com sinais clínicos é forte indício de neosporose. Para o diagnóstico pós-morte é necessário o uso de imunohistoquímica para detectar taquizoítos e cistos nos tecidos fixados (FARIAS, 2008).

2.9 TRATAMENTO

Não há tratamento para animais de produção que os torne livres da infecção por *N. caninum* (FARIAS, 2008).

2.10 PREVENÇÃO E CONTROLE

Segundo McALLISTER et al. (1998), não existem medidas isoladas para eliminar abortamentos causados por *N. caninum* nos bovinos ou para prevenir a eliminação de oocistos pelos cães.

Como profilaxias já são disponíveis vacinas comerciais em muitos países inclusive no Brasil que garantem conferir proteção contra abortos causados por *N. caninum*. Estas vacinas embora tragam discussões sobre sua eficácia e custo-benefício devem ser mencionadas como estratégia de controle (CARVALHO NETA; TORRES JÚNIOR, 2006).

Barajas-Rojas et al. (2007), estudando a eficácia de uma vacina contra *N. caninum* em bovinos leiteiros em condições de campo no México verificaram que houve uma resposta imunológica mensurável aos 30 e 60 dias além de reduzir em 41% a ocorrência de abortamento entre os animais vacinados.

Para realizar o controle desta enfermidade deve buscar o bloqueio da transmissão entre cães e bovinos. Para isso, deve-se evitar o acesso de cães aos alimentos e fontes de água dos bovinos, manter silos e depósitos de ração fechados e manter os cães presos. Além disso, é importante também a remoção de restos de placentas, fetos abortados e terneiros mortos para evitar a ingestão dos mesmos pelos cães e outros carnívoros. Os bovinos mortos, de qualquer idade, devem ser removidos ou queimados antes que os carnívoros tenham acesso às carcaças. Os cães devem ser alimentados com rações ou, quando ingerirem carne ou vísceras, estas sempre devem ser cozidas. Outra medida que surte efeito é o controle da população de cães errantes (ANDREOTTI, 2001; SPURI, 2006).

Uma vez prevenida a transmissão pelos cães, a incidência do abortamento endêmico deve decrescer lentamente ao longo dos anos. Para o controle da transmissão vertical, as vacas infectadas devem ser identificadas através de provas sorológicas e gradativamente eliminadas do rebanho, uma vez que têm grande probabilidade de transmitirem a infecção à sua progênie além de maior chance de abortamento e/ou repeti-lo. No caso de animais de alto valor zootécnico, a vaca positiva pode vir a ser utilizada como doadora na transferência de embriões para receptoras negativas, como alternativa de evitar a transmissão vertical. Deve-se também realizar testes sorológicos nos animais antes de introduzi-los no rebanho a fim de evitar a entrada de animais infectados na propriedade (BJÖRKMAN & UGGLA, 1999).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Amostras de Estudo.

Quatrocentos e sessenta e cinco amostras de soros de bovinos leiteiros foram empregadas no levantamento da ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em 45 rebanhos no Município de Parauapebas estado do Pará.

3.1.2. Local de Estudo

A pesquisa foi realizada no Município de Parauapebas localizada na Mesorregião Sudeste do estado do Pará. A sede municipal apresenta as seguintes coordenadas geográficas: 06o 03'30" S e 49o 55'15" W. Gr. (PARAUAPEBAS, 2007).

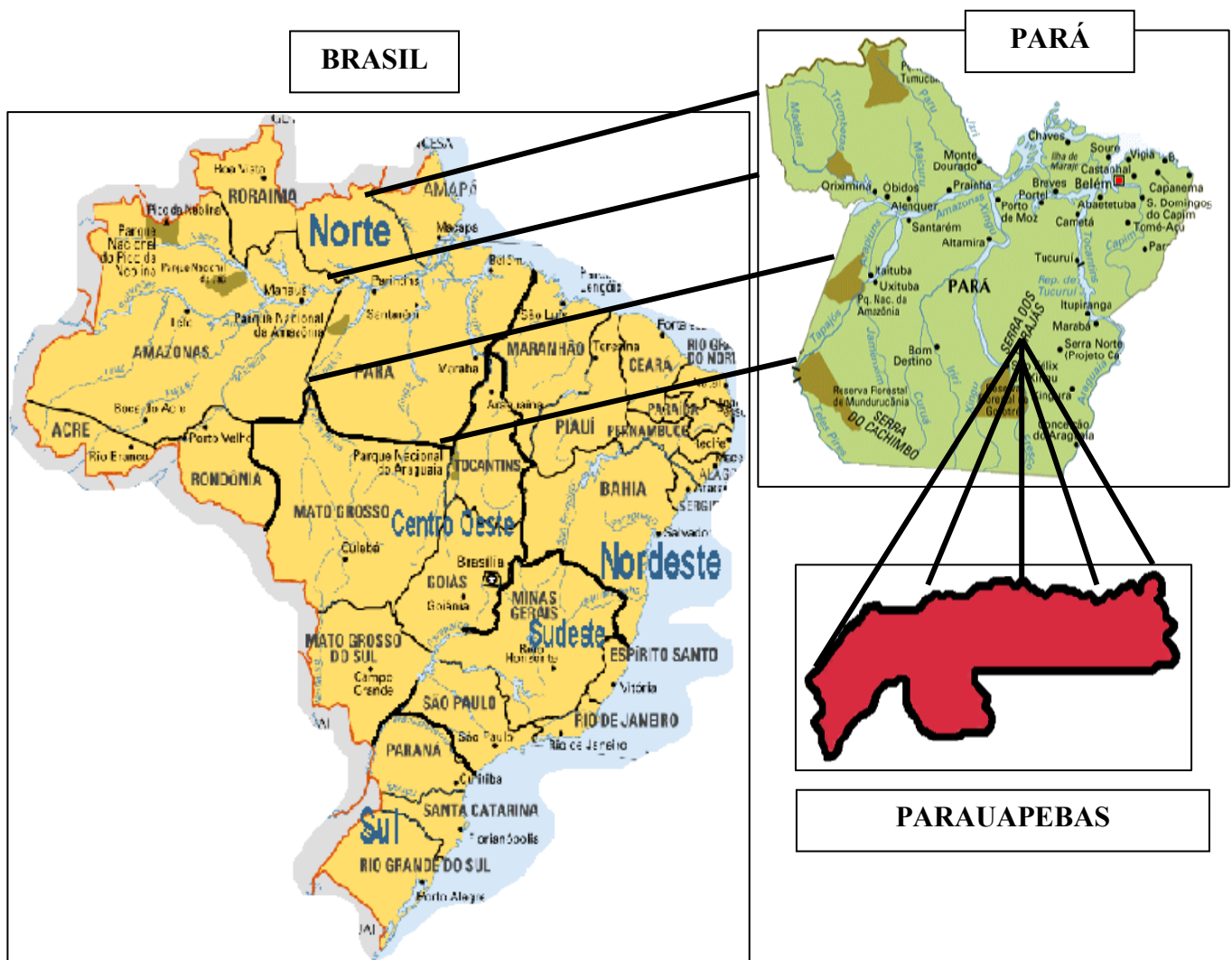


Figura 5: Mapas do Brasil, Pará e Parauapebas.
 Fonte: Elaborado por: Hugo Jacinto Rosa Alves, eng. Agrônomo, 2007.

O clima de Parauapebas insere-se na categoria de equatorial superúmido, tipo Am, na classificação de Köppen, no limite de transição para o Aw. Possui temperatura média anual de 26,35 °C (média máxima em torno de 32,01 °C e mínima de 22,71 °C). A umidade relativa é elevada, apresentando oscilações entre a estação mais chuvosa e a mais seca, que vai de 100 a 52 %, sendo a média real de 78 %. O período chuvoso ocorre, notadamente, de novembro a maio, e o seco de junho a outubro, estando o índice pluviométrico anual em torno de 2.000 mm (PARAUPEBAS, 2007).

3.1.3. Rebanhos e Animais

Para obtenção de dados referente aos rebanhos com os respectivos animais foram utilizados dados da ADEPARÁ- Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará – Unidade Local de Parauapebas (2007) e do IBGE (2007).

Os critérios adotados para a seleção dos proprietários que cederam os seus rebanhos foram os seguintes: aceitar os objetivos da pesquisa, possuir gado leiteiro próprio, fácil acesso à propriedade, dispor de estrutura física e instalação na propriedade para facilitar a coleta de sangue.

Foram feitos contatos com 122 produtores rurais, das quais 79 aceitaram participar da pesquisa e, então, foram sorteados 45 rebanhos de 12 localidades diferentes.

Os rebanhos eram mestiços com cruzamento, não direcionados, entre diversas raças e mestiçagens, criados extensivamente, variando de 10 a 250 cabeças por rebanho; de 5 a 50 vacas são ordenhadas diariamente produzindo de 30 a 250 litros de leite por propriedade por dia e de 3 a 18 litros por animal por dia. Todas as propriedades de estudos têm currais com tronco onde foi realizada a coleta e onde fazem a ordenha e outras atividades nos rebanhos. Nenhuma das propriedades tinha instalação de água no curral. A ordenha é do tipo manual com exceção de uma que é mecânica com balde ao pé, e os bezerros são soltos para realizar a descida do leite e posteriormente são amarrados ao membro anterior direito da mãe. Não são realizados pós *dipping* e suplementação alimentar. Os bezerros são separados da mãe à tarde e ficam presos no curral até a hora da ordenha. Poucas propriedades fornecem sal mineral para o rebanho. Todas vacinam contra febre aftosa e algumas contra clostridioses, raiva e fazem vermifugação.

A pastagem predominante é braquiarião (*Braquiaria brizanta*) em estado de conservação de regular a ruim conservação, onde os animais permanecem pastejando. Na maioria das propriedades há muita vegetação secundária.

Quando ocorre abortamento, os tecidos ficam expostos ao ambiente e a fêmea é vendida para o abate suspeitando que o abortamento seja consequência de brucelose. O esterco, às vezes, é retirado do curral e distribuído nos piquetes. Os animais mortos ficam expostos ao ambiente.

Todas as propriedades recebem assistência Médico Veterinário e de outros técnicos da Prefeitura Municipal de Parauapebas, quando são solicitados.

A maioria das propriedades possui cães ou cães de outras propriedades circulam livremente pela propriedade e consomem carcaças de animais mortos expostas ao ambiente.

Os animais sorteados eram mestiços com grau de sangue variado e não possuíam registros genealógicos. Algumas fêmeas estavam em lactação e produziam de três a 15 litros de leite por dia.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Estudo Estatístico

O programa estatístico Epi-Info 6.04 foi utilizado para levantar dados em relação à quantidade de animais que deveriam ser coletados por propriedade e por faixa etária.

Para o cálculo do tamanho da amostra considerou-se uma soroprevalência para *N. caninum* de 50%, precisão de 3% e intervalo de confiança de 95%, acrescidos de 10% para eventuais perdas.

Pela natureza categórica das variáveis respostas estudadas, foram aplicados testes não paramétricos de qui-quadrado de contingência e de aderência para verificar possíveis associações entre classes amostrais. Foi adotado o nível de 0,05 para a significância dos testes.

3.2.2 Levantamento de Fatores de Risco

Dados relativos à idade do animal, número de crias, ocorrência de abortos, presença de cães nos criatórios, fornecimento de carne crua para os caninos, presença de animais silvestres, assistência técnica e sanitária, realização de exames diagnósticos, destinos

de carcaças e produtos de abortamento raça ou mestiçagem, idade das fêmeas, número de reprodutores, ocorrência de doenças, profilaxia de doenças foi pesquisada e avaliada para testar a associação com a ocorrência da infecção nos rebanhos.

3.2.3 Coleta de Sangue

Os animais selecionados (430 fêmeas e 35 machos) eram contidos no tronco (Fig. 6) e o sangue coletado por venopunção coccígea mediana (Fig. 7) ou jugular, acondicionado em tubos de ensaio, sem anticoagulante, com capacidade para 15 mL. Posteriormente os tubos foram acondicionados em caixa isotérmica, contendo gelo, e transportados até a sede do município. Os soros foram centrifugados a 5.000 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos, acondicionados em tubos tipo *Eppendorf*® com capacidade para 1,5 mL, e mantidos congelados a -20°C até a realização dos exames sorológicos.



Figura 6: Animais contidos, no tronco, para coleta de sangue.



Figura 7: Venupunção coccígea mediana.

3.2.4 Diagnóstico Sorológico

O diagnóstico sorológico foi realizado por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) no Laboratório de Zoonose e Saúde Pública do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina (UEL), conforme recomendações de Conrad et al. (1993).

Foram utilizadas no exame sorológico lâminas marcadas com antígenos de *N. caninum* (cepa JPA-1). A triagem foi realizada na diluição de 1:50 (5 µL de soro diluído em 245 µL de solução salina tamponada com fosfato (phosphate buffered saline) - PBS com Soro Albumina bovina (BSA) e 1:100 (50 µL de PBS com BSA e 50 µL da diluição 1:50). O conjugado anti-IgG bovino marcado com isotiocianato de fluoresceína, foi diluído a 1:900 e instilado 15 µL em todas as cavidades das lâminas. As lâminas, cobertas com glicerina e lamínula, foram envolvidas em papel alumínio e estocadas em temperatura de 4°C até a leitura. Todas as amostras positivas foram novamente examinadas seguindo o mesmo procedimento em diluições sequenciais na base dois, até não haver mais reação fluorescente. A leitura foi efetuada em microscópio epifluorescente com objetiva de 40 vezes. As reações com título igual ou maior que 100 foram consideradas positivas, evidenciando taquizoítos com fluorescência periférica total.

3.2.4.1 Confeção da Lâmina para RIFI

Para preparar a lâmina utilizou-se o método de serigrafia com a lâmina contendo 12 pocinhos, sendo 6 na parte superior e 6 na inferior da lâmina. Depois de confeccionada a lâmina ficava exposta à temperatura ambiente por 12 horas para secar.

3.2.4.2 Prova da RIFI

3.2.4.2.1 Preparo do antígeno

A) Inoculação de *N. caninum*

- Raspar o tapete de uma garrafa de cultivo celular previamente inoculada com *N. caninum*;
- Aspirar com seringa descartável de 10 mL e passar em agulha 27G todo o conteúdo da garrafa;
- Retirar 0,5 mL deste meio e passá-lo para uma nova garrafa contendo monocamada de células VERO ou Monócitos bovinos (MB) com 7,5 mL de meio de cultivo contendo 10% de soro fetal bovino;
- Quando a finalidade de repique é para produção de antígeno para os diferentes ensaios biológicos pode-se inocular 1 mL do material;

B) Repique celular

- Acrescentar 2 mL de tripsina (tripsina/versene) ao meio de cultivo em células Vero ou BM e aguardar 2 a 3 minutos mantendo o frasco a 35-37°C para melhor ação da tripsina. - Desprezar o sobrenadante e adicionar a mesma quantidade de tripsina e aguardar o tapete descolar agitando a garrafa;
- Adicionar 4 mL de meio de cultivo com BSA a 10% e homogeneizar bem;
- Transferir metade do conteúdo para uma nova garrafa e o restante para outra garrafa
- Adicionar 5 mL de meio de cultivo com BSA a 10% nas novas garrafas, de modo que o conteúdo total fique entre 7-8 mL, homogeneizando sempre;

- Verificar em microscopia invertida a monocamada celular da garrafa que será utilizada para a preparação das lâminas.
- Identificar as garrafas de cultivo com o tipo de célula cultivado, número de passagem e data.

C) Preparação de lâmina com antígeno de *N. caninum*

- Trocar o meio de cultivo de garrafa inoculada para um meio sem adição de soro 2 horas antes de iniciar o procedimento;
- Raspar o tapete de células contido na garrafa;
- Passar o material obtido do raspado por agulha 27G;
- Efetuar a contagem dos taquizoítos em câmara de *Newbauer* para obter uma concentração ideal de 10^7 taquizoítos por mL;
- Centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C;
- Desprezar o sobrenadante;
- Ressuspender os taquizoítas em solução salina (manter a diluição de 10^7 taquizoítas por mL);
- Preencher os poços da lâmina removendo o excesso;
- Deixar secar em temperatura ambiente por 1 hora;
- Acondicionar as lâminas em papel toalha e posteriormente em papel alumínio;
- Identificar a embalagem com data e tipo de antígeno;
- Manter as lâminas acondicionadas em *freezer* a -20°C até o uso.

D) Reação da RIFI

Preparação das lâminas

- 1 - Retirar a lâmina do congelador;
- 2 - Colocar as lâminas para secar na estufa a 37°C;
- 3 - Preparar uma câmara úmida e colocar na estufa para aquecer a 37°C;
- 4 - Retirar do congelador os soros teste positivo (TP) e teste negativo (TN);
- 5 - Retirar os soros a serem testados da geladeira;
- 6 - Retirar da geladeira a solução tampão com soro albumina bovino (BSA) (para diluição do soro (pH 7,2) e a solução para lavagem (pH 9,0));
- 7 - Preparar duas cubas para colocar as soluções que serão utilizadas;
- 8 - Providenciar o mapa de anotação;
- 9 - Providenciar microplaca de fundo reto para fazer a diluição dos soros;
- 10 - Providenciar as pipetas e ponteiras;
- 11 - Identificar os poços da microplaca com o número de cada amostra a ser testada;
- 12 - Identificar os pocinhos que receberão o soro controle negativo (TN) e o soro controle positivo (TP);
- 13 - Colocar 245µL de solução de diluição com soro albumina bovina (BSA) em cada pocinho da micoplaca;
- 14 - Homogeneizar o soro a ser testado e colocar, junto à solução acima, 5 µL em cada pocinho da micoplaca (diluição 1:50);
- 15 - Colocar paralelamente à primeira solução, 50 µL de solução com BSA (triagem);
- 16 - Colocar 50µl da diluição 1:50 para tornar a diluição 1:100;
- 17 - Diluir os soros controle positivo e negativo da mesma forma dos soros a serem testados;
- 18 - Retirar as lâminas da estufa e identificá-las na parte polida;
- 19 - Anotar as amostras que estão sendo testadas no mapa controle;
- 20 - Adicionar 20µL de cada soro em cada pocinho da lâmina;
- 21 - Colocar as lâminas em câmara úmida e levar à estufa a 37°C por 40 minutos;

- 22 - Retirar o conjugado anti-IgG ovino marcado com isotiocianato de fluoresceína (SIGMA) do congelador e deixar à temperatura ambiente;
- 23 - Homogeneizar o conjugado da mesma forma que o soro a ser testado;
- 24 - Diluir o conjugado 1:900 com solução de diluição com BSA;
- 25 - Retirar as lâminas da estufa;
- 26 - Fazer 3 lavagens das lâminas em cuba de vidros por 5 minutos cada, com solução tampão (pH 9,0);
- 27 - Secar as lâminas 37°C por 10 minutos;
- 28 - Adicionar 20µL do conjugado, previamente diluído, em cada pocinho contendo antígeno e soro;
- 29 - Colocar as lâminas em câmara úmida a 37°C por 40 minutos;
- 30 - Fazer 3 lavagens das lâminas em cuba de vidros por 5 minutos cada, com solução tampão (pH 9,0 uma concentração);
- 31 - Secar as lâminas à 37°C por 10 minutos;
- 32 - Adicionar glicerina tamponada (pH 8) e cobrir com lamínula;
- 33 - Envolver as lâminas preparadas em papel toalha;
- 34 - Manter as lâminas refrigeradas até a leitura;
- 35 - Ler em microscópio epifluorescente (OLYMPUS) em objetiva de 40 vezes;
- 36 - Somente serão consideradas positivas as reações em que os taquizóitos apresentarem fluorescência periférica total em no mínimo 50% (Fig. 8).
- 37 - São considerados positivos para *N.* os soros com títulos maior ou igual a 1:100.

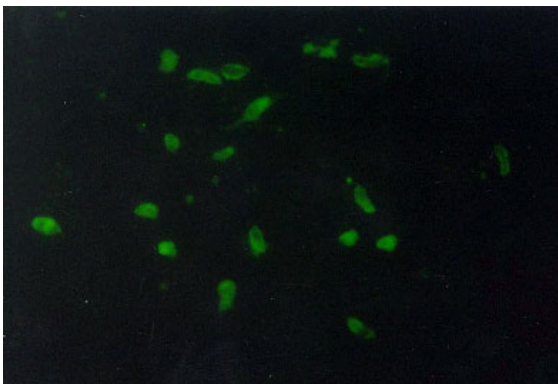


Figura 8: Campo de microscópio demonstrando taquizóitos de *N. caninum*.

4 RESULTADOS

Dos animais examinados 403 (86,67%) resultaram negativos e 62 (13,33%) resultaram soropositivos considerando-se como ponto de corte a diluição 1:100. Em termos de proporcionalidade, estatisticamente (Tabela 2), o número de animais negativos foi maior em relação ao número de positivo ($P < 0,01$)

Tabela 2: Soroprevalência de *N. caninum* em bovinos leiteiros segundo os resultados da RIFI.

Resultado	Frequência Relativa	Frequência Absoluta
Negativo	403	86,67
Positivo	62	13,33
Total	465	100

$\chi^2=250,1$

$P < 0,0001$

Dos 465 bovinos sorteados aleatoriamente 430 eram fêmeas e 35 machos sendo que 13,49% das fêmeas e 11,42% dos machos resultaram positivos conforme a Tabela 3. Pelo resultado do Teste Exato de Fisher, verifica-se que, mesmo havendo maior percentual de fêmeas na amostra, não houve associação significativa entre sexo e ocorrência de positivos na amostra.

Tabela 3: Número de animais positivos para *N. caninum* segundo os resultados da RIFI e sexo dos animais.

Sexo	Positivos	Percentagem	Negativos	Percentagem	Total	Percentagem
Fêmea	58	13,48	372	86,52	430	92,47
Macho	4	11,43	31	88,57	35	7,53
Total	62	13,33	403	86,67	465	100

Teste Exato de Fisher =0,59 ($P=0,99$)

Conforme os dados da Tabela 4, 62 animais demonstraram resultados positivos na prova da RIFI. Na amostra de animais positivos, verifica-se que, estatisticamente, houve maior incidência no título de 100 (43,55 %) e menor incidência no título de 800 (8,06 %) ($P < 0,01$).

Tabela 4: Quantidade de animais positivos por titulação.

Titulo	Frequência relativa	Frequência percentual
100	27	43,55
200	14	22,58
400	16	25,81
800	5	8,06
Total	62	100

$\chi^2=15,81$

$P < 0,001$

Das propriedades estudadas 30 apresentaram pelo menos um animal positivo conforme Tabela 5. As propriedades que não aparecem nesta Tabela não apresentam animais que reagiram até o ponto de corte. Na localidade 8, onde foram coletadas 12 amostras de sangue de uma propriedade, não foi encontrado animal positivo.

Tabela 5: Quantidade de animais positivos por propriedade.

N.º de ordem	Propriedade	Localidade	Positivos	Negativos	Total
1	1	1	2	11	13
2	2	2	1	12	13
3	3	2	1	13	14
4	4	3	4	7	11
5	5	4	5	7	12
6	6	3	2	8	10
7	7	3	2	8	10
8	8	5	1	10	11
9	9	3	5	11	16
10	10	3	2	17	19
11	11	3	1	10	11
12	13	6	1	10	11
13	14	6	2	10	12
14	15	7	4	7	11
15	16	9	3	8	11
16	18	4	2	11	13
17	19	2	2	12	14
18	20	4	4	19	23
19	21	9	2	6	8
20	22	9	1	7	8
21	23	9	1	6	7
22	24	9	3	8	11
23	25	9	1	5	6
24	27	10	1	7	8
25	30	11	2	7	9
26	31	3	1	6	7
27	34	2	1	4	5
28	38	1	1	6	7
29	42	12	1	9	10
30	45	3	3	11	14
-	Total	12 localidades	62	273	33

Analisando os dados da Tabela 6, verifica-se que entre as localidades onde estão situadas as propriedades nas quais foram coletados os soros, houve variação de 0 a 40% de animais positivos. Porém, se aumentasse o tamanho amostral das localidades que demonstrou maior e menor proporção de animais positivos, provavelmente a percentagem de animais reagentes reduziria e aumentaria respectivamente.

Tabela 6: Quantidade de animais positivos por localidade.

Localidade	Nº de propriedades	Nº de animais coletados	Negativos	Positivos	% de animais positivos em relação ao número de animais coletados
1	6	59	55	4	6,77
2	5	60	56	4	6,66
3	12	117	101	16	13,67
4	5	72	60	12	16,66
5	2	22	18	4	18,18
6	2	23	20	3	13,04
7	1	10	6	4	40,00
8	1	12	12	0	0,0
9	5	49	41	8	16,32
10	3	15	14	1	6,66
11	2	16	14	2	12,50
12	1	10	9	1	10,00
Total	45	465	403	62	13,33

No quesito “ocorrência de animais natimorto”, 32 amostras soropositivas (Tabela-7) pertenciam às propriedades nas quais ocorreu este problema. Nesse caso não houve associação estatística entre os animais soropositivos com a condição de natimorto. Assim, na amostra analisada, a presença de animais natimortos, parece não ser aspecto claro no diagnóstico da condição de soropositivo.

Tabela 7: Quantidade de animais positivos que pertenciam às propriedades onde ocorreram animais natimortos.

Natimorto	Positivos	% positivos	Negativos	% negativos
Sim	32	51,61	214	53,1
Não	30	48,34	189	46,9
Total	62	100	403	100

$X^2=0,01$

$P=0,93$

Conforme verifica-se na Tabela 8, cinquenta animais soropositivos pertenciam às propriedades onde ocorreram abortamentos, mas não necessariamente os animais positivos foram os que abortaram. Não houve associação estatística de soropositividade com o aspecto de abortamento.

Tabela 8: Quantidade de animais soropositivos em relação às propriedades que ocorreram abortamentos.

Abortamento	Positivos	% positivos	Negativos	% negativos
Sim	50	80,64	283	70,22
Não	12	19,36	119	29,78
Total	62	100	403	100

$$X^2=2,3$$

$$P= 0,13$$

Verificou-se que 37 animais soropositivos pertenciam a propriedades onde ocorreram repetições de cio, não apresentando relação significativa quanto a este fator. Não houve associação estatística de soropositividade com a condição de retorno ao cio (Tabela 9).

Tabela 9: Quantidade de animais soropositivos e soronegativos em relação à repetição de cio.

Repetição Cio	Positivos	% positivos	Negativos	% negativos
Sim	37	59,7	235	58,31
Não	25	40,3	168	41,69
Total	62	100	403	100

$$X^2=0,00$$

$$P=0,95$$

Na Tabela 10 comparou-se a “ocorrência de infertilidade” com a ocorrência de animais positivos nas propriedades, o resultado demonstrou que apenas oito animais resultaram positivos pertenciam às propriedades nas quais ocorre esta condição. Não houve associação entre os quesitos estudados.

Tabela 10: Quantidade de animais soropositivos pertencentes a propriedades com histórico de infertilidade

Infertilidade	Positivos	% positivos	Negativos	% negativos
Sim	8	12,9	39	9,7
Não	54	87,1	364	91,3
Total	62	100	403	100

Na Tabela 11 verificar-se a relação de animais soropositivos com a ocorrência de qualquer patologia em animais pertencentes à propriedade. Estatisticamente, não houve associação significativa entre a soropositividade e presença de patologias.

Tabela 11: Quantidade de animais soropositivos pertencentes a propriedades com histórico de animal doente.

Animal doente	Positivos	% positivo	Negativos	% negativos
Sim	42	67,64	299	74,2
Não	20	32,36	104	25,8
Total	62	100	403	100

$X^2=0,84$

$P=0,36$

Verificou-se que na maioria das propriedades havia um ou mais cães, ou os cães dos vizinhos vagavam livremente pela propriedade.

A presença de cães não apresentou associação significativa com soropositividade na amostra (Tabela 12).

Tabela 12: Quantidade de animais soropositivos em relação à presença de cães nas propriedades.

Presença de cães	Positivos	% positivos	Negativos	% negativos
Sim	56	90,32	391	7,7
Não	6	9,68	12	92,3
Total	62	100	403	100

$X^2=0,26$

$P=0,60$

A Tabela 13 traz alguma informação sobre a alimentação dos cães e verificou-se que neste estudo a adição de carne crua ou mal passada na alimentação dos cães não teve influência para aumentar o número de animais soropositivos. Já quando a alimentação era diferente de ração e não havia carne crua ou mal passada, houve diferença significativa em relação às outras duas.

Tabela 13: Tipos de alimentos consumidos pelos cães em relação à soropositividade dos animais.

Tipo de alimentos	Positivos	% positivos	Negativos	% negativos
Somente ração	12	19,35	38	9,43
Alimentos que não têm carne crua ou mal passada	10	16,12	15	3,72
Alimentação variada e fornecem carne crua para os cães	43	64,53	350	86,85
Total	62	100	403	100

$X^2= 8,08$

$P= 0,01$

Na Tabela 14 verifica-se que a forma de criação dos caninos não influenciou em relação à quantidade de bovinos positivos, talvez porque a principal forma de transmissão seja a vertical.

Tabela 14: Maneira que os cães são criados em relação ao número de bovinos positivos.

Forma que são criados	Positivos	% negativos	Negativos	% negativos
Criados presos	15	24,2	60	14,89
Criados soltos	47	75,8	343	85,11
Total	62	100	403	

$X^2=0,40$
 $P=0,52$

Não é hábito dos produtores fazer esterqueira, todos os dejetos ficam acumulados no curral ou na sua proximidade. Esta característica não apresentou relação significativa com os resultados das amostras examinadas conforme verifica-se na Tabela 15.

Tabela 15: Destino dos dejetos nas propriedades estudadas.

Destino	Positivos	% negativos	Negativos	% negativos
Acumulado no curral	59	95,16	394	97,77
Depósito em esterqueira	3	4,84	9	12,23
Total	62	100	403	

$X^2=0,60$
 $P=0,43$

Na maioria das propriedades as carcaças ficam expostas ao ambiente, onde os cães e outros animais têm acesso, servindo de meio de propagação de doenças. Nesse estudo não houve diferença significativa em relação o destino das carcaças e a soropositividades dos animais (Tabela 16).

Tabela 16: Destino das Carcaças dos animais que morrem nas propriedades.

Destino	Positivos	% negativos	Negativos	% negativos
Exposta ao ambiente	57	91,93	384	95,29
Enterrio	5	8,07	19	4,71
Total	62	100	403	100

$X^2=0,64$
 $P=0,42$

Neste verificou-se que 55 animais soropositivos pertenciam às propriedades em que o produto do abortamento ficava exposto ao ambiente. No entanto, não foi observada diferença significativa entre as duas variáveis estudadas (Tabela 17).

Tabela 17: Forma em que se destinam os produtos de abortamentos nas propriedades estudadas.

Destino	Positivos	% negativos	Negativos	% negativos
Exposto ao ambiente	55	88,71	372	93,05
Enterrio	7	11,29	31	6,95
Total	62	100	403	100

$X^2=0,61$

$P=0,43$

Todas as propriedades que tiveram seus animais examinados dispensavam algum tipo de cuidado com os animais. Na Tabela 18 verifica-se associação significativa entre manejo da cria com a soropositividade, animais que apresentaram somente ingestão de colostro, apresentaram menor soropositividade (0,06) em relação aqueles que apresentaram ingestão de colostro e vermifugação (0,28). Para o manejo que envolveu a cura do umbigo, os valores foram intermediários. Apesar da diferença estatística, esse resultado parecer estar mais relacionado com o tamanho da amostra em cada sub-estrato, que realmente com as diferenças entre frequência observadas e esperadas.

Tabela 18: Tipos de cuidados dispensados aos recém-nascidos nas propriedades.

Tipos de cuidados	Positivos	% negativos	Negativos	% negativos
Cura do umbigo, mama do colostro e aplicação de ivermectina.	46	74,2	216	53,6
Mama do colostro	3	4,83	24	5,6
Mama do colostro e cura do umbigo	9	14,52	149	36,97
Vermífugo e mama do colostro	4	6,45	14	3,83
Total	62	100	403	100

$X^2=13,10$

$P=0,01$

De acordo com a Tabela 19, a faixa etária que apresentou maior percentagens de animais soropositivos foi a de dois anos, sendo que o número amostral, desta, foi pequeno, quando comparada com a faixa etária acima de 5 anos. No entanto, não houve diferença significativa entre as faixas etárias, sugerindo que a principal fonte de contágio possa ser a transmissão vertical.

Tabela 19: Percentagem de animais positivos proporcionalmente a cada faixa etária.

Idade (ano)	Nº de amostras (A)	Positivos (B)	Negativos	% por faixa etária (B/A)
≤ 1	41	6	35	14,63
2	52	10	42	19,23
3	63	8	55	12,70
4	65	7	58	10,77
>5	244	31	213	12,70
Total	465	62	403	13,33

$X^2=2,1$
 $P=0,71$

No quesito “número de crias” (Tabela 20) dos animais as que, proporcionalmente, apresentou maior número de animais soropositivos foi acima de 5 crias, sugerindo que estes animais são mais velhos e que o tempo de exposição dos animais pode ser um fator determinante em rebanhos que tem o parasita circulando no ambiente. Porém, não houve associação estatística entre idade e soropositividade.

Tabela 20: Número de partições das fêmeas estudadas.

Nº de crias	Nº de amostras (A)	Positivos (B)	Negativos	Percentagem (B/A)
≤1	118	15	103	12,71
2	119	20	99	16,81
3	134	10	124	7,5
4	59	3	56	5,1
≥5	35	14	21	40
Total	465	52	403	13,33

$X^2=2,04$
 $P=0,73$

Os animais silvestres são importantes fatores de disseminação de várias doenças, entre elas a *N. caninum*. Tratando-se de região Amazônica em todas as propriedades estudadas havia animais silvestres livres, não foi possível associar a ocorrência de animais positivos com a presença destes animais. Há possibilidade de animais silvestres estarem sendo a fonte de contaminação para os bovinos, porém para diagnosticar este fato é necessário pesquisar a presença de anticorpos em amostras de soros desses animais.

Todos os animais de estudo eram mestiços, cujo cruzamento era desordenado entre diferentes graus de sangue. Por isso não foi possível a comparação entre animais positivos e as diferentes raças.

5 DISCUSSÃO

Utilizando a RIFI como método de diagnósticos e considerando o ponto de corte 1:100, encontrou 13,33% de animais positivos. Resultados semelhantes foram encontrados em Rondônia por Aguiar et al. (2005), em bovinos de leite 11,2% e de corte 9,5%, usando como ponto de corte a diluição 1:25. A semelhança, entre as duas pesquisas, pode estar relacionada com o tamanho das propriedades (25 a 50 há) e o tipo de exploração que os animais são submetidos (extensivamente).

Gondim et al. (1999) e Sartor et al. (2003), utilizando ponto de corte 1:200 e encontraram 14,9% e 15,9%, respectivamente, já Costa et al. (2001), Hasegawa et al. (2004) e Corbellini et al. (2005), também utilizando ponto de corte 1:100, diagnosticaram 16,83 %, 15,57% e 17,8%, respectivamente. Ainda, Coberllini et al. (2005), verificaram que os tamanhos das propriedades, a aptidão (leite ou corte) e o tipo de exploração (extensiva ou semi-intensiva), fornecimento de “pool” de colostro e quantidade de cães por propriedade influenciaram, diretamente, na quantidade de animais positivos. Eles suspeitaram que no sistema semi-intensivo, os cães têm maiores acesso a todas às dependências da propriedade, como: piquetes, instalações e os alimentos dos bovinos e, conseqüentemente, podem consumir restos de parto e carcaças além de eliminar oocistos no ambiente.

A alimentação dos bovinos estudados é exclusivamente a pasto o que pode ter contribuído para os resultados serem inferiores aos obtidos por estes autores. 90,3 % (Tabela 12), 75,8 % (Tabela 14) e 69,35 % (Tabela 13), dos animais positivos estavam em propriedades que possuíam cães, os cães eram criados soltos e os cães consumiam carne crua e carcaças, respectivamente, sugerindo que os cães podem estar infectados e ser o principal agente disseminador do protozoário nas propriedades, embora estatisticamente não houvesse diferença significativas entre estes fatores.

Davidson et al. (1999), encontraram 18% e 6% em bovino com e sem histórico de abortamentos, respectivamente. Vogel et al. (2006), também afirmam que animais soropositivos têm 3,4 vezes mais chance de abortar quando comparados aos soronegativos. Nesta forma, muitos casos de abortamentos nas propriedades estudadas podem ser devido à infecção por *N. caninum*, pois, 80,64 % dos animais positivos pertenciam às propriedades que ocorreram abortamento (Tabela 8) embora, analisando estatisticamente não houve diferenças significativas entre as variáveis. Duas amostras analisadas pertenciam a animais que abortaram, uma não reagiu na diluição de rastreamento (1:50) e a outra reagiu até a diluição 1:200. Isto não significa que o abortamento não foi conseqüência da infecção, pois Ragozo et

al. (2003), verificaram que logo após o abortamento o nível de anticorpos no soro regride rapidamente podendo não encontrá-los no exame, porém volta a aumentar entre o 4º e 5º mês da próxima gestação. Estes autores recomendam a realização de novo exame nos animais problemas, neste período. Já que Coberllini et al. (2000), pesquisando *N. caninum* em fetos abortados encontraram taquizoítos em cortes de cérebro e/ou coração em 10% das amostras, para confirmar se a neosporose está sendo responsável por abortamentos, devem ser coletados tecidos de fetos abortados e realizar exames laboratoriais.

No Pará Minervino et al. (2008), pesquisando anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos, encontraram 19,2 % e 17,5 de animais positivos para bovinos de corte e leite respectivamente. Não observaram diferenças significativas entre as aptidões. A proporção levemente superior em bovinos de corte está em desacordo com todos os trabalhos pesquisados, pois sempre a ocorrência na aptidão leite é maior que a de corte. Esta inversão pode ter ocorrido devido ao tamanho amostral de bovinos de leite ser inferior (40 animais) quando comparado com os de bovinos de corte (120) ou a similaridade do sistema em que são criados os animais. Resultados de animais positivos superior ao nosso pode ter sido influenciado pelo pequeno número e amostral (160).

Ragozo et al. (2003), pesquisando a presença de anticorpos deste protozoário em bovinos de leite e de corte de seis estados brasileiros encontraram 23,6 %, em média de animais positivos, observando maior ocorrência em bovinos de leite (26,2 %). Ainda em sua pesquisa verificaram maior ocorrência em animais acima de 24 meses e diferenças significativas entre os municípios estudados.

Observando a Tabela 19 verifica que a maior ocorrência em animais soropositivos foi na faixa etária de 2 anos (19,23%), seguida pela faixa etária composta por animais menor ou igual a 1 ano (14,63 %). Grande quantidade de animais positivos menores de um ano de idade pode ser consequência do tipo de manejo oferecido aos bezerros nas propriedades os quais são separados das mães à tarde e permanecem presos no curral até o dia seguinte, possibilitando, desta forma, o maior contato com os caninos da residência. Das 12 localidades pesquisadas (Tabela 6) a percentagem de animais soropositivos variou de 6,66 a 40% entre elas. Porém, a localidade que apresentou maior proporção de animais positivos, foram coletadas amostras de 10 animais. Se o número amostral aumentasse poderia reduzir a proporção de animais positivos.

Yai et al. (2005), pesquisando anticorpos anti-*N. caninum* em animais silvestres de vários estados brasileiros, inclusive de locais onde não há entrada de animais domésticos, encontraram animais positivos que variou de 8,7 % a 75 %. Em Parauapebas, por se tratar de

região Amazônica, 100% das propriedades há animais circulando livremente. Outro fator que pode estar contribuindo com a manutenção e a disseminação do parasito no rebanho e que alguns produtores têm o hábito de consumir caças e fornecer aos cães as vísceras cruas. Farias, (2008) sugerem que há possibilidade de outros carnívoros silvestres de serem hospedeiros definitivos do *N. caninum*.

Gondim et al. (2007), encontraram 35,9 % de búfalos positivos. Estes autores afirmam que os animais não tinham histórico de abortamento. Já Gennari et al. (2005), diagnosticaram 70,9 % de animais positivos ambos os trabalhos citam que não há estudo que determina a importância econômica do parasito nesta espécie. Não havia búfalos sendo criados com bovinos nas propriedades estudadas.

Bergeron et al. (2001), pesquisando *N. caninum*, em placentas de vacas soropositivas encontraram taquizoítos em 18,33 %. Já que em nossa pesquisa verificamos que 95,16 % (Tabela 15), 91,93 % (Tabela 16) e 88,71 (Tabela 17) % dos animais positivos pertenciam às propriedades, cujos proprietários, deixavam dejetos acumulados no curral, carcaças, aborto e resto placentário expostos ao ambiente, sugerindo que os cães podem estar consumindo produtos contaminados. Os proprietários não destinando adequadamente estes materiais estão contribuindo para a manutenção e propagação do protozoário nos rebanhos.

Sartor et al. (2005), utilizando o método do ELISA, encontraram 35,54 % e 20 % em gado de leite e gado de corte, respectivamente. Resultados superiores ao deste estudo devem-se, principalmente, ao tipo de criação que os animais são submetidos e ao método de exame utilizado, pois Sartor et al. (2003) comparando a RIFI e ELISA para as mesmas amostras comprovaram que a quantidade de amostra diagnosticada no ELISA foi 85 % maior que na RIFI. Ainda Sartor et al. (2005), justificam que usaram o ELISA por apresentar sensibilidade de até 98%, especificidade de 100%, menor tempo de execução, precisão e custos menores.

Por outro lado Vogel et al. (2006), pesquisando anticorpos anti-*N. caninum*, através do ELISA, em bovinos, ovinos e bubalinos diagnosticaram, 11,4 %; 14,6 % e 3,2 % respectivamente, demonstrando que a proporção de animais positivos são semelhantes ao encontrados nesta pesquisa utilizando a RIFI.

Não foram observadas diferenças significativas de animais positivos quando compara as propriedades com ou sem histórico de natimorto, ocorrência de animais doentes, tratamentos dos animais doentes. 58,31 % (Tabela 9) e 12,9 % (Tabela 10) dos animais positivos pertenciam a propriedades que havia histórico de repetição de cio e de infertilidade, respectivamente. Estando de acordo com Vogel et al. (2006), pois, afirmam que rebanhos

soropositivos apresentam perdas econômicas significativas devido ao retorno ao cio com intervalo regulares ou irregulares, nascimento de bezerros fracos e inviáveis.

Quanto aos cuidados com as crias 96,77 % (Tabela 18), dos animais positivos pertenciam à propriedades que os proprietários tinham alguns cuidados com o neonato. Sendo que do total de animais positivos 74,2 % pertenciam a propriedades que realizava a cura do umbigo, mama do colostro e aplicação de ivermectina, 4,83 % somente mama do colostro, 14,52 % mama do colostro e cura do umbigo e 6,45 % forneciam vermífugo e mama do colostro. O maior índice de animais positivos foi no primeiro tratamento sugere-se que pode ser em consequência do maior cuidado dos proprietários com os animais eles permanecerem mais tempo próximo a casa e aos cães.

Bovinos com mais de 5 crias (Tabela 20) apresentaram maior proporção de animais positivos (40 %) seguido dos animais com 2 crias (16,81%). Isto pode ser consequência de maior tempo de exposição dos animais ao parasito, conforme justificam Ragozo et al., (2003).

Verificamos que 66,66 % das propriedades estudadas apresentaram pelo menos um animal soropositivo (Tabela 5); Gondim et al. (1999), encontrou 92,85 %; Aguiar et al. (2005), 100 % e 75 % para bovinos de corte e leite, respectivamente; Coberllini et al. (2005), 93,3 %; Gennari et al. (2005), 100 % para bubalinos; Minervino et al. (2008), 83,3 % e 75 % para gado de corte e leite, respectivamente Estes resultados demonstram que o protozoário *N. caninum* está disseminado pelo mundo e por várias propriedades, inclusive do estado do Pará.

Guimarães Júnior & Romanelli (2006) e Margarido et al. (2008) afirmam que este protozoário não tem predileção por raça ou sexo. A raça não foi possível comparar neste trabalho, pois os animais eram todos mestiços. Já 11,43 % dos bovinos do sexo masculino coletados resultaram positivos (Tabela 3).

6 CONCLUSÃO

O inquérito sorológico realizado em rebanhos bovinos leiteiros no município de Parauapebas, Mesorregião Sudeste do Estado do Pará, demonstrou com uma considerável frequência anticorpos anti-*N. caninum* nos soros dos animais analisados.

A frequência de anticorpos anti-*N. caninum* foi levemente superior entre as fêmeas, mas não foi observada diferença significativa entre os sexos. Do mesmo modo, não foi observada diferença significativa entre as faixas etárias, mas o tempo de exposição, em termo de permanência dos animais no ambiente do criatório, pode ter sido um fator determinante, visto que o agente está circulando no ambiente do criatório.

Numa elevada proporção, as propriedades pesquisadas apresentaram pelo menos um animal soropositivo.

Houve diferença significativa entre animais positivos e negativos, tipo de alimentação dos cães e tipos de cuidados dispensados às crias.

Fatores como: sexo dos animais, faixa etária, condição de escore corporal, quantidade de leite produzido, cuidados dispensados aos animais, ocorrência de doenças, tratamento curativo, exposição de materiais de abortamento no ambiente do criatório, destino adequado dos animais mortos, manejo de dejetos, presença de felídeos, presença e maneira de criação de cães, ocorrência de doenças, infertilidade, repetição de cio, número de crias das fêmeas, abortamentos e natimortos não demonstraram, estatisticamente, associação positiva com os resultados do inquérito sorológico.

Não foi possível associar a presença de animais silvestres com a soropositividade dos animais, pois 100 % das propriedades estudadas têm animais silvestres circulando livremente, assim como analisar a diferença significativa entre as raças, pois todos os animais sorteados eram mestiços e sem registros genealógicos.

Medidas e ações de vigilância sanitária devem ser implementadas para prevenir a entrada de novas fontes de infecção por *N. caninum* nos rebanhos da região e controlar a difusão desse agente no criatório regional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEPARÁ – Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará, Unidade Local de Parauapebas – **TC2 da campanha de novembro de 2007.**

AGUIAR, Daniel M. et al. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e cães da Amazônia Ocidental Brasileira, Estado de Rondônia. In: I FÓRUM BRASILEIRO DE ESTUDOS SOBRE *Neospora caninum*, 2005, São Paulo – SP. **Anais...** São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP 2005, 33-35.

ALMEIDA, M.C.S. et al. Ocorrência de neosporose em ovinos (*Ovis Áries linnaeus*) no Brasil. **Instituto Biológico**, v.67, n.1, p.25-51, jan/jun. 2007.

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

ANDREOTI, R. **Neosporose: um possível problema reprodutivo para o rebanho bovino.** Campo Grande – MS, EMBRAPA, 2001, (EMBRAPA Gado de Corte Documento nº 104).

BARAJAS-ROJAS, J.A. et al. . **Eficácia de uma vacina contra *Neospora caninum* em condições de campo no México.** Cidade do México –México, Universidade Autónoma Nacional do México, 2007.

BARR, B.C.; CONRAD, P.A.; DUBEY, J.P. *Neospora*-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.3, p.39-46, 1991.

BAZLER, T.V. et al. Interferon g and interleukin 12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1635-1646, out 1999.

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

BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, v.29, n.10, p.1497-507, 1999.

BRESSAN, M.; VILELA, D. Indicadores gerais da evolução do segmento da produtividade na região Norte – 1990/2001. In: WORKSHOP SOBRE IDENTIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS RESTRIÇÕES AO DESENVOLVIMENTO DA CADEIA PRODUTIVA DO LEITE DA REGIÃO NORTE DO BRASIL, 2003, Juiz de Fora – MG. **Anais...** Juiz de Fora. EMBRAPA, 2003, p. 41-45,.

CARVALHO, L.A. et al. **Sistema de produção de leite (Cerrado)**. Juiz de Fora- MG, 2002, (EMBRAPA gado de leite, Sistema de produção, 2).

CARVALHO NETA, A.V.; TORRES JÚNIOR, J.R.S. **Neosporose: emergente causa de perdas reprodutivas em bovinos de corte**. USP, dez., 2006.

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

CORBELLINI, L.G. et al. Aborto bovino por *Neospora caninum* no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**. v. 30, p.863-8, set. 2000.

CORBELLINI, L.G. **Neosporose bovina: estudo de fatores de risco em 60 propriedades leiteiras no estado do Rio Grande do Sul e levantamento de causas de aborto bovino com ênfase em *Neospora caninum***. 2005, 103 f. Tese (doutorado em medicina veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

COSTA, G.N. et al. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em soros de bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e de Minas Gerais. **Semina: Londrina**. v. 22, n.1, p. 61-66, jan/jun. 2001.

COSTA, K.S. et al. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**. v. 38 p. 157–159, fev. 2008.

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

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

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

Epi Info 6.04. **Center for Disease Control and Prevention. 1994** . Disponível em: http://epi-info.tripod.com/Referencias/Epi-Info_6_04/epi-info_6_0_4.html. Acesso em: 28 mar. 2008.

FARIAS, N.A.R. **Neosporose – Uma enfermidade a ser estudada**. Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Laboratório de Parasitologia, 2008.

FERNANDES, C.G. Causas infecciosas de aborto – Neosporose. In RIET-CORREA, Franklin et al. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. São Paulo: Varela, 2 ed., v. 2, 2003, p. 354-356.

FERNANDES, C.J.; LOPES, I.D.; PRIEB, R.I.P. Uma análise da cadeia agroindustrial do leite brasileira frente à abertura comercial, formação do Mercosul e Plano Real, no período de 1994 à 2004. In: XLIII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 2005, Ribeirão Preto – SP. **Anais...** Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural, 2005, p. 1-11.

FERREIRA, R.N. et al. **Produção de leite na pecuária familiar em função do número de vacas ordenhadas, períodos do ano e contagem de células somáticas**. UFRA, Belém – PA, 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, Nov. 2005.

GONDIM, L.F. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 86, p. 71-75, set. 1999.

GONDIM, L.F.P.; McALLISTER, M.M.; ZEMLICKAc. Coyotes (*Canis latrans*) are definite hosts of *Neospora caninum*. **Internacional Journal for Parasitology**, v. 34, p.159-161, fev. 2004.

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

GOOGLE, Imagem, *Neospora caninum*. Disponível em: <http://images.google.com.br/images?hl=pt-BR&um=1&sa=1&q=neospora+caninum&aq=0&oq=neospora>. Acesso em: 20 de mai. 2009.

GUIMARÃES JÚNIOR, J.S, ROMANELLI. Neosporose em animais domésticos. **Semina**. Londrina. v. 27, n. 4, p. 665-678, out./dez., 2006.

HASEGAWA, M.Y. et al. **Ocorrência** de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos de corte e em cães rurais da região de Avaré, Estado de São Paulo, Brasil. **Semina**, Londrina. v. 25, nº 1, p. 45-50, jan./mar., 2004.

HEMPHILL, A. et al. An European perspective on *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.30, nº, 8, p. 877-924, jul., 2000.

HERNANDEZ, J.; RISCO, C.; DONOVAN, A. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 219, nº 5, p. 632–635, set., 2001.

HOMMA, A.Y. et al. **Criação de gado leiteiro na zona bragantina- importância potencial e limitações**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. EMBRAPA Amazônia Oriental, Sistema de Produção 2, dez., 2005.

IBGE **Censo Agropecuário 2007**. CIDADES@. Disponível em: <http://www.ibge.Gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. Acesso em: 14 dez. 2008.

INNES, E.A. et al. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology** v.18, n.11, p. 497-504, nov., 2002.

JENKINS, M. et al. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum* – associated bovine abortion. **International Journal for Parasitology**, v.32, nº 5, p.631-636, mai. 2002.

JESUS, E.B.V. et al Frequência de anticorpos anti- *Neospora caninum* em cães nos município de Salvador e Lauro Freitas, Estado da Bahia – Brasil, 2006. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 43, n. 1, p. 5-10, 2006.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; HOFFMANN, D.C.S.; DITTRICH, J.R.. Neosporose equina – revisão. **Archives of Veterinary Science**. v.11, n.3, p.1-10, 2006.

MARGARIDO, R.S. et al. Neosporose. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano VI, n. 11, jul., 2008.

McALLISTER, M.M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Internacional Journal for Parasitology**, v.28, n.9, p.1473-78, SET., 1998.

MINERVINO, A.H.H. et al. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle from Santarém, Pará, Brazil. **Research in Veterinary science**. v. 84, 2ª ed., p. 254-256, abr., 2008.

MUGRIDGE, N.B. et al. Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *N.caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v.29, n.10, p.1545-1556, out., 1999.

NOGUEIRA NETTO, V; GOMES, A.T. Importância econômica e social da atividade leiteira. **Agência de Informação EMBRAPA-agronegócio do leite**, 2005-2007.

PACKHAM, A.E. et al. Qualitative evaluation of selective tests for detection of *Neospora hughesi* antibodies in serum and cerebrospinal fluid of experimentally infected horses. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 6, p. 1239-1246, dez., 2002.

PARAUPEBAS. **Cidade, Geografia/Clima**. Disponível em: parauapebas.pa.gov.br/index.php?option=comcontent&view=category&id=5&Itemid=99. Acesso em: 20 mai. 2007.

PEREIRA-BUENO, J. et al. Evaluation by different Diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 111, nº 2-3, p. 143-152, fev., 2003.

PITEL, P.H. et al. Investigation of *Neospora* sp. Antibodies in aborted mares from Normandy, France. **Veterinary Parasitology**, v. 118, nº 1-2, p. 1-6, dez., 2003.

PRONOST. S. et al. *Neospora caninum*: first case in France in an aborted equine fetus. **Pratique Veterinaire Equine**, v.31, p.111-114, 1999.

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

RODRIGUES, A.A.R. et al. Neosporose em búfalos (*Bubalus bubalis*). In: I FÓRUM BRASILEIRO DE ESTUDOS SOBRE *Neospora caninum*, 2005, São Paulo – SP. **Anais...** São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP 2005, p.17-18.

SARTOR, I.F. et al. Ocorrência de anticorpos de *Neospora caninum* em vacas leiteiras avaliados pelos métodos ELISA e RIFI no município de Avaré, Sp, **Semina: Londrina**. v. 24, n.1, jan./jun., 2003.

SARTOR, I.F. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros e de corte da região de Presidente Prudente, SP. **Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 72, n.4, p.413-418, out./dez., 2005.

SAWADA, M. et al. Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.60, p.853-854, jul.,1998.

SOUZA, S.L.P. et al. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães de propriedades produtoras de leite B da região norte do estado do Paraná. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v.37, n.4, p.40, 2001.

SPURI, R. **Neosporose bovina**. Lavras: UFLA, 2006.

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

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

THURMOND, M.C.; HIETALA, S.K. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.58, nº 12, p.1381-1385, dez., 1997.

VARDELEON, D. et al. Prevalence of *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from various geographical locations. **Veterinary Parasitology**, v.95, p.273-282, fev., 2001.

VENTURINI, M.C. et al. *Neospora caninum* infections in bovine fetus and dairy cows with abortions in Argentina. **International Journal for Parasitology**, v.29, 10 ed., p.1705-1708, out., 1999.

VOGEL, F.S.F.; ARENHART, S.; BAUERMANN, F.V. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e bubalinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência. Rural**, Santa Maria, v. 36, n.6, p.1948-1951, nov./dez., 2006.

YAI, L.E.O. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em animais silvestres brasileiros. In: I FÓRUM BRASILEIRO DE ESTUDOS SOBRE *Neospora caninum*, 2005, São Paulo – SP. **Anais...** São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, 2005 p. 24-26.