

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

SOROEPIDEMIOLOGIA DE *Neospora caninum* EM CÃES NO MUNICÍPIO DE  
PORTO ALEGRE, RS.

**MARIANA CAETANO TEIXEIRA**

PORTO ALEGRE, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

SOROEPIDEMIOLOGIA DE *Neospora caninum* EM CÃES NO MUNICÍPIO DE  
PORTO ALEGRE, RS.

**MARIANA CAETANO TEIXEIRA**

Dissertação apresentada como um dos  
requisitos para obtenção do grau de  
Mestre em Ciências Veterinárias na  
área de Doenças Parasitárias

Orientador:

Prof. Flávio Antônio Pacheco de Araujo

PORTO ALEGRE  
2010

T266s Teixeira, Mariana Caetano  
Soroepidemiologia de Neospora caninum em cães no  
município de Porto Alegre,RS. / Mariana Caetano Teixeira -  
Porto Alegre: UFRGS, 2010.

60 f.; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto  
Alegre, BR-RS, 2010. Flávio Antônio Pacheco de Araujo, Orient.

1. Parasitologia veterinária: cães 2. Soroepidemiologia:  
Neospora Caninum 3. Fatores de risco I. Araújo, Flávio Antonio  
Pacheco de, Orient. II. Título.

Catálogo na fonte preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Veterinária da UFRGS



**UFRGS**

UNIVERSIDADE FEDERAL

**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

Aprovado por:

---

Profa. Dra. Cristina Germani Fialho (UNISEP)

Membro da Banca

---

Prof. Dr. Jerônimo Lopes Ruas (UFPEL)

Membro da Banca

---

Profa. Dra. Neusa Saltiel Stobbe (UFRGS)

Membro da Banca

---

Prof. Dr. Flávio Antônio Pacheco de Araujo (UFRGS)

Professor Orientador

## **AGRADECIMENTOS**

*Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, Ecil e Nádia. São eles os responsáveis pela pessoa que sou hoje. Muito Obrigada pelo amor, educação e confiança que sempre recebi de vocês. Espero poder ser sempre motivo de orgulho.*

*Às minhas irmãs, Marcela e Bruna, simplesmente por estarem sempre ao meu lado. Vocês foram fundamentais. Amo vocês. Ao meu irmão Frederico, tão recente o nosso convívio e tão enorme meu carinho.*

*À toda minha família, meu sincero agradecimento pela compreensão em todos os momentos difíceis e pelo incentivo que sempre recebi de vocês.*

*Ao meu orientador, Prof. Flávio Antônio Pacheco de Araujo, pela confiança em mim sempre depositada, pela orientação neste e em muitos trabalhos e pela amizade que criamos.*

*Aos colegas do Laboratório de Protozoologia da UFRGS, meu sincero agradecimento pela parceira de sempre, pelas orientações e pelo crescimento que batalhamos juntos. Obrigada às amigas que sempre torceram por mim, Ana Claudia Gurgel, Karla Escopelli, Luciane D. Pinto, Thanara Louzada e Janine C. Brinker. Em especial, à amiga Cristina Fialho, pelo carinho e amizade que aprendemos a construir nesse período de convivência. Que venham muitos congressos!*

*À minha querida amiga Tahisa Faria Velloso, que foi fundamental no início da minha caminhada na UFRGS e tornou-se indispensável na minha vida. Obrigada por todas as palavras de incentivo e amizade.*

*Às minhas amigas da vida toda, um agradecimento mais do que especial. Vocês transformaram esse período em um momento mais alegre e divertido. São elas: Alice, Carolina V., Fernanda, Francine, Latifa, Renata, Soraya, Vanessa e muitas outras. Ao meu querido amigo e colega Rodrigo A. dos Reis, foi especial poder conviver contigo durante esses dois anos.*

*Aos amigos que a UFRGS me presenteou. Levo vocês junto comigo para a vida toda. Obrigada pela amizade e pelo incentivo. À minha bolsista Rachel Galón da Silva, muito obrigada pela parceira. Obrigada também às amigas (alunas, colegas) Flávia Oliveira, Michele Schnell, Luciana Zang, Fernanda Siqueira e Juliana Herpich.*

*À professora Dra. Neusa Saltiel Stobbe, pela acolhida e pelo exemplo profissional. Sua ajuda foi fundamental para a realização deste trabalho. Muito obrigada.*

*Agradeço às Médicas Veterinárias Sonia M. M. Duro e Rosane A. L. Colares, pelo auxílio na coleta das amostras no Centro de Controle de Zoonoses de POA e no canil da PE e Polícia Federal. Obrigada.*

*Aos amigos e colegas da clínica veterinária A Terra dos Bichos. Obrigada por me ajudarem sempre no meu crescimento profissional.*

*Ao médico veterinário e amigo Jairo Ramos de Jesus. Sempre com a palavra certa na hora certa. Nossas conversas foram fundamentais para a conclusão desta etapa. Obrigada.*

*Agradeço os funcionários e professores da UFRGS e do PPGCV desta Faculdade.*

*Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo auxílio financeiro na execução deste trabalho.*

*“E mesmo a ameaça dos anos encontra,  
e há de encontrar-me, destemido  
Não importa quão estreito o portão  
Quão repleto de penas o veredito  
Eu sou o mestre do meu destino.  
Eu sou o capitão de minha alma.”*

*William Ernest Henley*

*Aos meus pais Ecil e Nádia,  
aos meus irmãos Marcela, Bruna  
e Frederico,  
aos meus queridos avós Felício e  
Lucy,  
Este trabalho é para vocês.*

## RESUMO

*Neospora caninum* é um protozoário do filo Apicomplexa que causa infecções associadas com aborto, mortalidade neonatal e alterações neurológicas em várias espécies animais. O cão desempenha papel fundamental na epidemiologia da neosporose por ser o hospedeiro definitivo deste protozoário. A prevalência de anticorpos para este protozoário em cães tem sido avaliada em vários países, inclusive no Brasil, com índices que variam de 4,8% a 45%. O presente trabalho objetivou verificar a prevalência de anticorpos classe IgG para *Neospora caninum* em cães e os fatores de risco na área urbana do município de Porto Alegre- RS, utilizando a Técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e aplicação de questionário epidemiológico com os responsáveis pelos animais. Os animais foram divididos em três grupos, animais domiciliados, errantes e de criatórios comerciais. A frequência de anticorpos foi de 13,84% (36/260) de amostras positivas nas 260 amostras analisadas. Os títulos sorológicos observados variaram de 50 (44%) a 3200 (3%). Os dados obtidos no questionário foram analisados pelo Teste Exato de Fisher, e observou-se associação entre a positividade e os fatores alimentação e acesso a rua, com maior positividade para os animais que tinham acesso a rua ( $p < 0.001$ ) e recebiam alimentados com comida caseira. Os fatores idade, sexo e contato direto com outros cães não apresentaram diferença significativa em relação à positividade dos animais. Este estudo demonstra que o *N. caninum* está presente em cães da área urbana de Porto Alegre, necessitando de mais estudos nessa população que esclareçam os fatores de risco ao protozoário.

Palavras - chave: fatores de risco, Imunofluorescência Indireta, alimentação, neosporose

## ABSTRACT

*Neospora caninum* is a protozoan of phylum Apicomplexa which causes infections associated with abortion, neonatal mortality and neurological changes in several animal species. Dogs play key role in the epidemiology of neosporosis for being the definitive host of this protozoan. The prevalence of antibodies to this protozoan in dogs has been assessed in several countries, including Brazil, with rates ranging from 4.8% to 45%. This work had as its main objective to verify the prevalence of IgG class antibodies to *Neospora caninum* in dogs and the risk factors in the urban area of the municipality of Porto Alegre-RS using the Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) and applying an epidemiological questionnaire with those responsible for the animals. Animals were divided into three groups, domestic (pets) and wandering animals and those from commercial breeders. The frequency of antibodies was 13.84% (36/260) of positive samples in 260 samples which were analyzed. The serological titles observed varied from 50 (44%) to 3200 (3%). The data obtained in the questionnaire were analyzed by Fisher Exact Test, and some association between the positivity of IFAT and factors such as food and access to the street were observed. There was greater positivity for animals which had access to street ( $p < 0,001$ ) and were fed with homemade food. Factors such as age, sex and direct contact with other animals have not showed any significant difference in relation to the positivity of the animals. This study demonstrates that *Neospora caninum* is present in dogs of the urban area of Porto Alegre which requires more studies in such population to clarify the risk factors to the protozoan.

Keywords: risk factors, Indirect Fluorescent Antibody Test, food, neosporosis

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Taquizoítos de <i>Neospora caninum</i> .	21
Figura 2 – Cisto de <i>Neospora caninum</i> .	22
Figura 3 – Oocisto de <i>N. caninum</i>	22
Figura 4 - Ciclo evolutivo do <i>N. caninum</i>	24
Figura 5 - Mapa delimitando a área de estudo no trabalho.	34
Figura 6 – Coleta sangue para obtenção de soro.	36
Figura 7 - Reação de Imunofluorescência Indireta com resultado positivo para anticorpos contra <i>Neospora caninum</i> em soro canino diluído a 1:50. Observar fluorescência periférica completa dos taquizoítos (seta). Aumento de 400x.	38
Figura 8 - Resultado da Imunofluorescência Indireta para <i>Neospora caninum</i> .	41
Figura 9 - Resultados da RIFI para <i>N. caninum</i> em relação aos grupos de origem dos animais.	42
Figura 10 - Frequência de Anticorpos para <i>Neospora caninum</i> obtidos no presente estudo	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Soroprevalências de anticorpos para <i>Neospora caninum</i> em cães, registradas em diversos inquéritos sorológicos no Brasil.	28
Tabela 2- Frequência de cães soropositivos e soronegativos pela técnica de RIFI quanto à variável alimentação, Porto Alegre, 2009.	43
Tabela 3- Frequência de cães soropositivos e soronegativos pela técnica de RIFI quanto a variável ambiente, Porto Alegre, 2009.	44
Tabela 4- Frequência de cães soropositivos e soronegativos pela técnica de RIFI quanto à variável idade dos animais, Porto Alegre, 2009.	44
Tabela 5- Frequência de cães soropositivos e soronegativos pela técnica de RIFI quanto à variável sexo dos animais, Porto Alegre, 2009.	45
Tabela 6 - Frequência de cães soropositivos e soronegativos pela técnica de RIFI quanto a variável contato com outros animais, Porto Alegre, 2009.	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Percentual
°C	Graus Celsius
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
BID	A cada 12 horas
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EUA	Estados Unidos da América
IgG	Imunoglobulina G
NAT	Neospora Agglutination Test
PBS	Solução Tampão de Fosfato
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potencial hidrogeniônico
PROTOLAB	Laboratório de Protozoologia
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RS	Rio Grande do Sul
SID	A cada 24 horas
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
TID	A cada 8 horas
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	14
<b>1.1</b>	<b>Problema de pesquisa</b>	16
<b>1.2</b>	<b>Hipóteses</b>	16
<b>1.3</b>	<b>Objetivos</b>	16
1.3.1	Objetivo geral	16
1.3.2	Objetivos específicos	17
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	18
<b>2.1</b>	<b>Histórico</b>	18
<b>2.2</b>	<b>Sistemática</b>	19
<b>2.3</b>	<b>Morfologia</b>	19
<b>2.4</b>	<b>Biologia do <i>Neospora caninum</i></b>	21
<b>2.5</b>	<b>Ocorrência nos hospedeiros intermediários</b>	23
<b>2.6</b>	<b>Neosporose em cães</b>	24
<b>2.7</b>	<b>Diagnóstico de <i>N. caninum</i> em cães</b>	28
2.7.1	Técnicas diretas	28
2.7.1.1	Isolamento <i>In Vitro</i>	28
2.7.1.2	Técnicas histológicas	29
2.7.1.3	Técnica de PCR	29
2.7.2	Técnicas Indiretas	30
2.7.2.1	Reação de Imunofluorescência Indireta	30
2.7.2.2	Ensaio Imunoenzimático	31
2.7.2.3	NAT	31

<b>2.8</b>	<b>Potencial zoonótico</b>	32
<b>2.9</b>	<b>Controle e profilaxia</b>	32
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	33
<b>3.1</b>	<b>Área de estudo</b>	33
<b>3.2</b>	<b>Amostras</b>	34
<b>3.3</b>	<b>Questionário epidemiológico</b>	35
<b>3.4</b>	<b>Análise Laboratorial</b>	36
3.4.1	Antígeno de <i>Neospora caninum</i>	36
3.4.2	Reação de Imunofluorescência Indireta	36
<b>3.5</b>	<b>Análise Estatística</b>	38
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	39
<b>4.1</b>	<b>Características da população estudada</b>	45
<b>4.2</b>	<b>Características dos grupos experimentais</b>	
<b>4.3</b>	<b>Dados epidemiológicos</b>	
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	46
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	50
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
	ANEXO I	60

## 1 INTRODUÇÃO

A neosporose está amplamente distribuída em vários estados brasileiros, sendo relatada a ocorrência do parasito ou de anticorpos séricos para *Neospora caninum* em diversas espécies de animais domésticos e silvestres como: bovinos, caprinos, ovinos, caninos e felinos (DUBEY *et al.*, 1990).

Nos últimos anos a neosporose tem sido reconhecida como uma doença importante economicamente e com considerável impacto sobre a pecuária de corte e leite (DUBEY *et al.*, 1996).

*Neospora caninum* é um parasito do filo Apicomplexa que causa infecções associadas com aborto e mortalidade neonatal em várias espécies animais (DUBEY & LINDSAY, 1996).

O cão desempenha papel fundamental na epidemiologia da neosporose por ser o hospedeiro definitivo deste protozoário. Este papel somente foi confirmado na década de 90 após a constatação da eliminação de oocistos por cães (McALLISTER *et al.*, 1998). Dessa forma os canídeos representam um fator de risco confirmado na transmissão da infecção para os rebanhos bovinos e de outros animais hospedeiros intermediários (BASSO *et al.*, 2001).

O Cão e o Coiote (GONDIM *et al.*, 2004), eliminam oocistos após a ingestão de tecidos ou órgãos dos hospedeiros intermediários.

O ciclo de vida do protozoário apresenta três estágios infecciosos: bradizoitos, taquizoítos e esporozoíto. Os bradizoitos representam o estágio de proliferação lenta, no qual os parasitas formam cistos teciduais, principalmente no sistema nervoso central. Os taquizoítos e bradizoitos são os estágios intracelulares encontrados nos hospedeiros intermediários (DUBEY, 2003).

A ingestão oral de cistos que contêm bradizoitos por hospedeiros carnívoros promove a diferenciação sexual do parasito nos tecidos intestinais, com formação de oocistos que são excretados nas fezes. No ambiente, se desenvolvem os esporozoitos, por um processo de esporulação. Pouco é conhecido sobre o desenvolvimento e sobrevivência dos oocistos no meio ambiente. Os oocistos de *N. caninum* são morfológicamente semelhantes ao de *Toxoplasma gondii* e *Hammondia hammondi*

encontrados nas fezes de gatos, e se assemelha ao oocisto de *H. heydorni* eliminados nas fezes de canídeos (DUBEY *et al.*, 2002).

A soroprevalência para este protozoário em cães tem sido avaliada em vários países, inclusive no Brasil, onde podemos observar índices variados de acordo com o habitat dos animais, convívio com bovinos e a técnica sorológica empregada (CAÑÓN-FRANCO *et al.*, 2003). Estas diferenças entre as ocorrências revelam a necessidade de novas pesquisas sobre a epidemiologia deste protozoário.

A ocorrência de anticorpos para *N. caninum* em cães de área rural já foi relatada em diversos países e mais recentemente tem-se estudado a ocorrência em cães de áreas urbanas.

A ocorrência de anticorpos para *N. caninum* em cães exclusivamente de áreas urbanas ainda são poucos. Em nosso estado ainda são raros os trabalhos científicos que exploram dados de prevalência de anticorpos em cães, animal de extrema importância para a manutenção da doença nos rebanhos bovinos (DUBEY *et al.*, 2007). No meio urbano o protozoário está relacionado com diversas alterações neuromusculares em cães, podendo em alguns casos levar o animal a óbito (DUBEY *et al.*, 1990).

O presente trabalho objetivou verificar a prevalência de anticorpos para *Neospora caninum* em cães da área urbana do município de Porto Alegre- RS, utilizando a técnica de Imunofluorescência Indireta. Foram avaliados também fatores de risco para a exposição ao agente.

## 1.1 PROBLEMA DE PESQUISA

- Existe ocorrência de anticorpos para *Neospora caninum* em cães no município de Porto Alegre?
- Como ocorre a contaminação dos cães em meio urbano?
- Existe associação positiva com as variáveis alimentação, gênero, idade, acesso à rua ou com e sem proprietários?

## 1.2 HIPÓTESES

1. Existe uma frequência de anticorpos para *Neospora caninum* em cães do município de Porto Alegre que possa ser mensurada.
2. A contaminação destes animais está relacionada principalmente com o tipo de alimentação e contato com outros cães.
3. Animais que se alimentam de carne crua, com idade superior a um ano e que tem acesso a rua liberado apresentam maiores índices de positividade.
4. Animais sem proprietários (errantes) apresentam maior risco de contaminação quando comparados aos animais domiciliados.

## 1.3 OBJETIVOS

### 1.3.1 Objetivo geral

1. Avaliar a epidemiologia do *Neospora caninum* em cães de área urbana do município de Porto Alegre, através de soroprevalência de anticorpos.

**1.3.2. Objetivos específicos:**

1. Verificar a frequência de anticorpos IgG em cães da área urbana de Porto Alegre-RS, através da técnica de Imunofluorescência Indireta.
2. Determinar as possíveis fontes de infecção destes animais.
3. Verificar a correlação entre a frequência de anticorpos com as variáveis: alimentação, gênero, idade, origem dos animais e acesso ou não à rua.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Histórico

O protozoário *Neospora caninum* (DUBEY *et al.*, 1988a) é um dos agentes mais importantes de aborto em bovinos. Este parasito em cães é descrito como responsável por graves alterações neurológicas (DUBEY, 1999b).

A primeira descrição do parasito foi feita por Bjerkas *et al.* (1984), que identificaram cistos semelhantes ao de *Toxoplasma gondii* em filhotes da raça Boxer. Estes animais apresentaram alterações neurológicas após o nascimento, sendo que as amostras testadas não reagiram às técnicas de diagnóstico para toxoplasmose. Dubey *et al.*, (1988a) realizaram o primeiro diagnóstico da doença, em cães que apresentavam sinais neurológicos, nomeando o agente como *Neospora caninum*.

Após este relato, este protozoário foi identificado em um grande número de espécies diferentes, tendo seu impacto mais importante em bovinos, sendo considerado atualmente um dos agentes de abortamento bovino de maior impacto na pecuária (ANDERSON *et al.*, 2000). Dubey *et al.*, (1999a) demonstraram que cães e bovinos se infectam com a mesma espécie de *Neospora*. Após o desenvolvimento de um teste imuno-histoquímico que permitiu analisar amostras armazenadas, foi possível realizar o diagnóstico da infecção em diversas espécies animais (LINDSAY & DUBEY, 1989).

Segundo Cañon-Franco *et al.*, (2003), a ocorrência de neosporose no rebanhos bovinos tem sido estudado em vários países e no Brasil. A associação positiva entre a presença de cães nas propriedades e a ocorrência de abortos em bovinos já foi avaliada por diversos autores (PARÉ *et al.*, 1998; BARTELS *et al.*, 1999; MAINAR-JAIME *et al.*, 1999; SANTOS, 2000; CORBELLINI *et al.*, 2000; CUNHA FILHO *et al.*, 2008). Sartor *et al.*, (2005) demonstraram no estado de São Paulo uma ocorrência de 35% em rebanho de gado de leite e 20% em gado de corte. As perdas econômicas com o aborto bovino foram medidas por Walker (2004) na Califórnia (EUA), chegando a 35 milhões de dólares ao ano no rebanho leiteiro.

Somente em 1998, McAllister *et al.*, comprovaram a eliminação do oocistos nas fezes de cães infectados por via oral, o que determina o cão (*Canis familiaris*) como sendo o hospedeiro definitivo do protozoário, e em 2004, Gondim *et al.*, também relataram o coioote (*Canis latrans*) como parte do ciclo da doença, agindo também como hospedeiro definitivo.

O primeiro relato de caso clínico de infecção natural em cães ocorreu somente em 2001, na Argentina por Basso *et al.* O cão apresentava histórico de diarreia, e o animal era alimentando com carne mal cozida por diversas vezes.

## 2.2 Sistemática

A classificação taxonômica do *Neospora caninum* segundo Long (1990) é:

Reino – Protozoa

Filo – Apicomplexa

Classe – Sporozoasida

Sub-classe – Coccidiasina

Ordem – Eucoccidiorina

Sub-ordem – Eimeriorina

Família – Sarcocystidae

Sub-família – Toxoplasmatinae

Gênero – Neospora

Espécie – *Neospora caninum*

## 2.3 Morfologia

Os taquizoítos podem medir cerca de  $6 \times 2 \mu\text{m}$ , apresentam formato semi-lunar e se caracterizam por ser a fase de multiplicação rápida do parasito. Apresentam todas as estruturas características dos membros do filo Apicomplexa como por exemplo o complexo apical, que possui a função de secretar enzimas, fixação e adesão a receptores

de superfície e sustentação. Podem se localizar em várias partes do organismo como células nervosas, macrófagos, células endoteliais vasculares entre outras (DUBEY, 1999a). Sua multiplicação vai ocorrer dentro das células dos tecidos infectados, com formação do vacúolo parasitóforo.

Os bradizoítos que são a forma de multiplicação lenta do parasito podem medir cerca de  $7 \times 1,5 \mu\text{m}$ , apresentando as mesmas organelas encontradas nos taquizoítos (HEMPHILL, 1999).

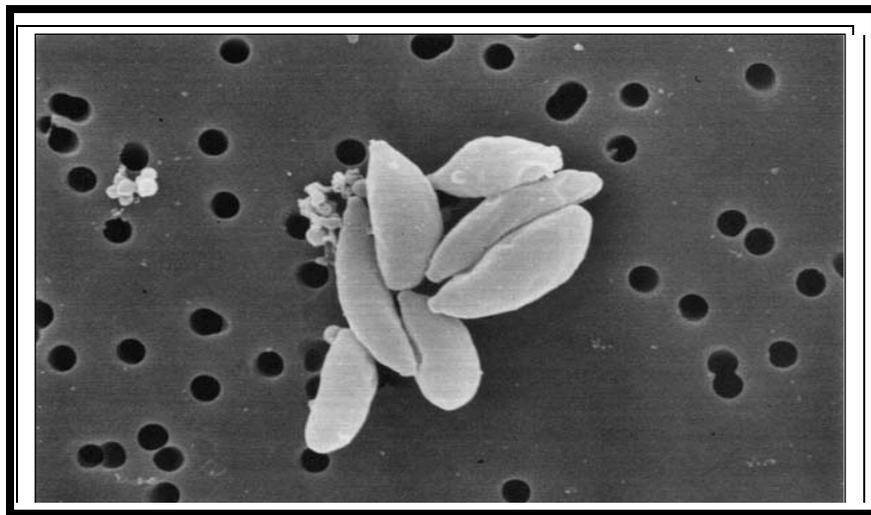


Figura 01 – Taquizoítos de *N. caninum* em cultivo celular.

Fonte: [http://www.gds18.org/Neosporose/images\\_NEO/neo1.jpg](http://www.gds18.org/Neosporose/images_NEO/neo1.jpg)

Os cistos podem chegar a medir  $107 \mu\text{m}$  de diâmetro (DUBEY & LINDSAY, 1996), apresentam formato oval e parede lisa que pode medir de 1 a  $4 \mu\text{m}$  de espessura. No seu interior podemos encontrar de 20 – 100 bradizoítos. Estão localizados principalmente no tecido nervoso do hospedeiro intermediário (PETERS *et al.*, 2001).

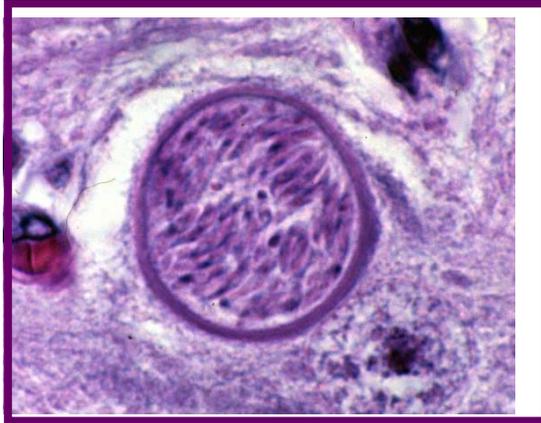


Figura 02 – Cisto de *N. caninum*

Fonte : <http://www.k-state.edu/parasitology/625tutorials/Cysts01.html>

Os oocistos liberados nas fezes dos hospedeiros definitivos são esféricos e extremamente semelhantes ao oocisto de *Hammondia heydorni* (DUBEY, 1999a). Medem cerca de 10 – 11  $\mu\text{m}$  de diâmetro, e possuem, quando esporulados, dois esporocistos com quatro esporozoítos cada (DUBEY, 1999b).



Figura 03 – Oocisto esporulado de *N. caninum*

Fonte: WWW. liv.ac.uk

#### 2.4 Biologia do *Neospora caninum*

O *N. caninum* apresenta um ciclo de vida heteroxeno, onde uma grande variedade de espécies podem ser consideradas como hospedeiros intermediários, entre elas os bovinos, ovinos, caprinos, cães e outros mamíferos.

McAliister *et al.*, em 1998 determinou a participação dos cães na epidemiologia da doença, atuando como hospedeiros definitivos do *N. caninum*. Neste estudo, os autores alimentaram os cães com camundongos contendo cistos teciduais. Foi

observado eliminação de oocistos pelos cães, que foram inoculados novamente em camundongos, onde foi possível observar em um único camundongo a presença de taquizoítos em vários órgãos e tecidos. Através da utilização das técnicas de histopatologia, imunohistoquímica e da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi possível fazer a identificação do parasito.

O coioite foi identificado como sendo hospedeiro definitivo na doença no ano de 2004, quando um dos animais alimentados com cistos teciduais eliminou oocistos nas fezes, confirmado por PCR como sendo de *Neospora caninum*.

Em relação ao ciclo biológico do protozoário podemos afirmar que o período pré-patente após a ingestão de cistos teciduais é de cinco a oito dias (LINDSAY & DUBEY, 2000). Após a ingestão dos cistos pelos hospedeiros definitivos ocorre um período de reprodução sexuada (multiplicação endógena) no interior das células intestinais, que resulta na eliminação de oocistos nas fezes destes hospedeiros. Segundo McAllister *et al.*, (1998) os oocistos esporulam em um período de 24 horas em temperatura ambiente.

Os hospedeiros intermediários ingerem os oocistos esporulados juntamente com água e comida, e são liberados os esporozoítos na luz intestinal. Estas estruturas penetram nas células intestinais, e passam a se chamar de taquizoítos, forma de multiplicação rápida do protozoário. Os taquizoítos podem atingir varias células do hospedeiro intermediário, causando diversas lesões. Alguns destes taquizoítos se transformam em bradizoítos (forma de multiplicação lenta) no interior dos cistos e podem permanecer sob forma de latência por vários anos. Quando um dos hospedeiros definitivos ingerirem carne/cistos teciduais o ciclo de inicia novamente (DUBEY, 1999b)

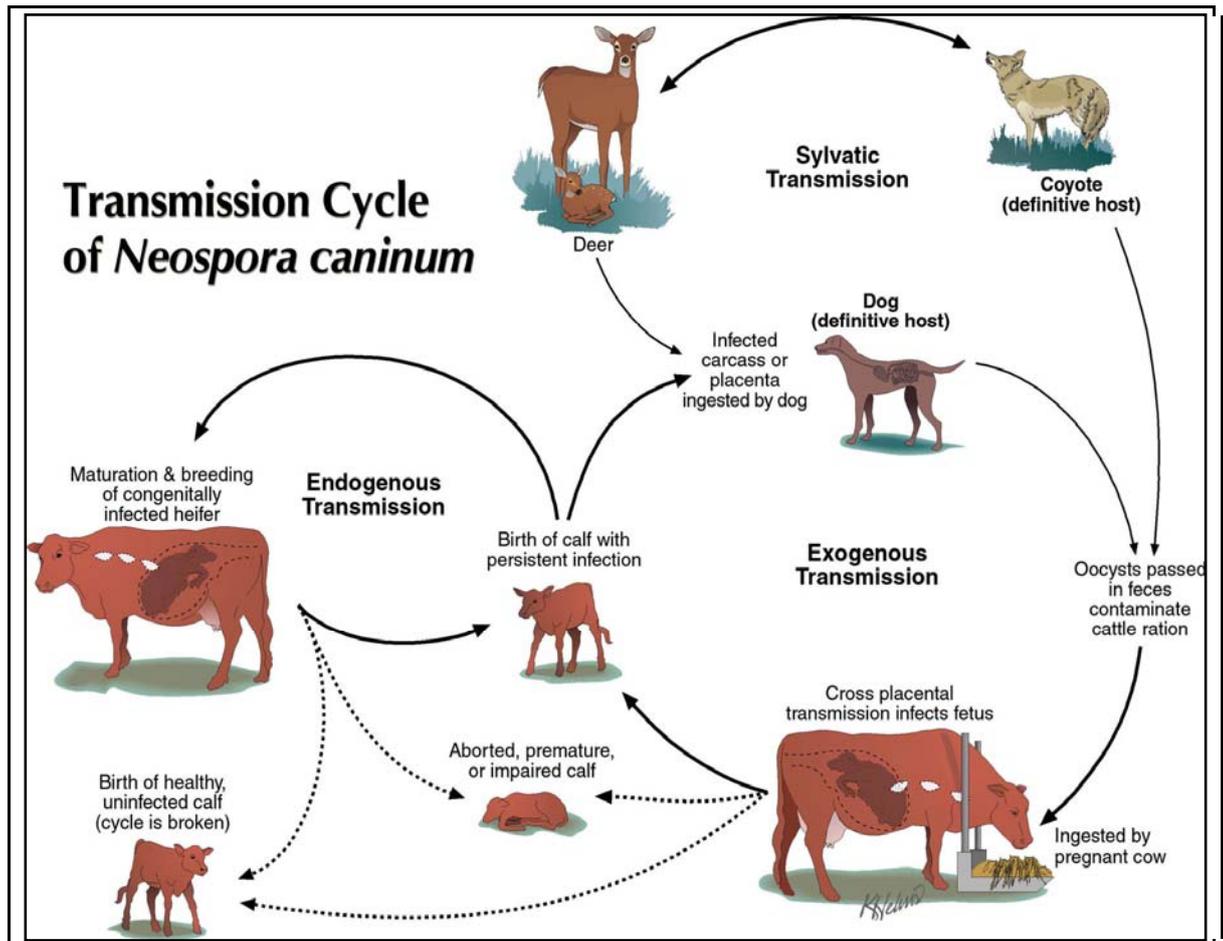


Figura 04 – Ciclo evolutivo do *Neospora caninum* evidenciando as diferentes formas de transmissão

Fonte : <http://vetmed.illinois.edu/faculty/path/images/Neosporalifecycle2007.jpg>

## 2.5 Ocorrência em hospedeiros Intermediários

Diversas espécies animais já foram descritas como hospedeiros intermediários do *N. caninum* entre eles bovinos (MELO *et al.*, 2001), ovinos (McALLISTER *et al.*, 1996), caprinos (DUBEY *et al.*, 1996b), búfalos (GUARINO *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2004), galinhas (FURUTA *et al.*, 2007), animais silvestres (GONDIM *et al.*, 1999; McGUIRE *et al.*, 1999; PETERS *et al.*, 2001a; LINDSAY *et al.*, 2001; VIANA *et al.*, 2005) entre outros. Uma grande variedade de carnívoros silvestres já foram diagnosticados como soropositivos para *N. caninum* no Brasil e no mundo (GONDIM *et al.*, 2004; CAÑON-FRANCO *et al.*, 2004; VITALIANO *et al.*, 2004; HAMILTON *et al.*, 2005)

Sartor *et al.*, (2005) relataram que, através de levantamentos soroepidemiológicos, o *N. caninum* está amplamente distribuído no rebanho bovino

brasileiro, com frequências variando entre 8,06% (AGUIAR *et al.*, 2006) a 87,5% (MUNHOZ *et al.*, 2002). Andreotti *et al.*, (2006) relataram que nos bovinos da região de Campo Grande com histórico de aborto a ocorrência de *N. caninum* é 5,5 vezes maior do que nos animais sem histórico.

Muitos trabalhos relacionam a ocorrência de anticorpos em bovinos e incidência de abortos com a presença de cães nas propriedades rurais, o que revela existir uma correlação positiva (PARÉ *et al.*, 1998; DIJKSTRA *et al.*, 2002).

## **2.6 Neosporose nos cães**

Os cães de qualquer idade podem se infectar com o protozoário (TREES *et al.*, 1993), embora os jovens sejam os animais mais comumente afetados (DUBEY *et al.*, 1990). Cadelas assintomáticas podem transmitir a doença para seus fetos, tornando-os infectados (DUBEY *et al.*, 1990).

Na Argentina, Basso *et al.*, (2005), relataram o caso de um cão filhote, da raça Boxer, de 2 meses de idade com neosporose clínica. Foi realizada coleta de sangue para realização da Técnica de Imunofluorescência Indireta, sendo positiva e com uma titulação 1:12.800. Após a eutanásia foi possível observar a presença de taquizoítos e cistos no cérebro por técnicas histológicas. A confirmação do diagnóstico foi realizada através das técnicas de Imunohistoquímica, Western Blot e inoculação em gerbis. Foi possível identificar o DNA do parasito no cérebro, pulmão e musculatura estriada do cão e após no cérebro de um gerbil inoculado.

Os animais com neosporose congênita desenvolvem os sinais clínicos entre a terceira e oitava semana de vida, e as alterações neurológicas que estes podem apresentar variam de intensidade leve até grave (CUDDON, 2002). A transmissão vertical nos cães é responsável pela maioria dos casos clínicos observados (DUBEY *et al.*, 1990; DUBEY, 1999b). Cães que sofrem contaminação intra-uterina, podem nascer saudáveis, porém mantém a infecção por muitas gerações (ANDRESON *et al.*, 1997), ninhadas sucessivas podem nascer infectadas (DUBEY, 1999b).

Animais adultos apresentam alterações neurológicas em menor intensidade. Já foram descritos relatos de manifestações clínicas em cães com dois dias de vida (BARBER E TREES, 1996) até quinze anos (DUBEY, 2003).

Barber e Tress (1996) sugerem que se deve suspeitar de neosporose em qualquer caso clínico envolvendo cão com idade inferior a um ano que apresente fraqueza progressiva ou até mesmo paralisia flácida.

Os sinais clínicos associados a neosporose variam de acordo com os órgãos ou tecidos parasitados (JACKSON *et al.*, 1995; DUBEY, 2003). Na maioria das vezes os membros pélvicos são severamente mais afetados que os membros torácicos (DUBEY, 2003; DUBEY *et al.*, 2007).

Segundo Dubey (2003), a neosporose em cães pode apresentar as seguintes manifestações clínicas: paresia e paralisia progressiva dos membros, hiperextensão flácida ou rígida, contrações espásticas dos membros e desordens neurológicas.

Sinais neuromusculares são observados com maior frequência, podendo apresentar com menos incidência: fraqueza muscular (DUBEY *et al.*, 2007), mialgia, hemiparesia a quadriparesia, alterações de comportamento, cegueira, convulsões, dificuldade de deglutição, flacidez muscular (BASSO *et al.*, 2005). De acordo com Barber (1998), em cães adultos as manifestações clínicas podem ser mais variadas, além de sinais neuromusculares podem apresentar dermatite piogranulomatosa, miocardite e pneumonia.

Basso *et al.*, (2005) sugere que a neosporose clínica deve ser incluída no diagnóstico diferencial nos casos de megaesôfago em cães, já que foram observadas alterações nesse órgão em filhotes com infecção pelo *N. caninum*.

Wouda *et al.*, (1999) e Cheadle *et al.*(1999) apontam algumas raças de cães como o Labrador, Boxer, Basset Hound e o Golden Retrievers como sendo mais susceptíveis a doença.

## **2.7 Soroprevalência em cães**

Estudos de soroprevalência têm sido realizados em vários países do mundo, utilizando diferentes técnicas de diagnóstico, e apresentando uma variação nos resultados de 1% a 37,8% em cães (BARBER *et al.*, 1997; KLEIN E MULLER, 2001; BASSO *et al.*, 2001).

Em cães existem relatos de ocorrência de anticorpos para *N. caninum* em diversos países como Holanda (WOUDA *et al.*, 1999), Argentina (BASSO *et al.*, 2005),

Japão (SAWADA *et al.*, 1998), Áustria (WANHA *et al.*, 2005), Inglaterra (DUBEY *et al.*, 1990), Uruguai (BARBER *et al.*, 1997) e Chile (PATTITUCI *et al.*, 2001). No Brasil as frequências em cães variam de 4,8% (MINEO *et al.*, 2001) a 45% (TEIXEIRA *et al.*, 2006).

Wanha *et al.*, (2005) na Áustria, coletaram 1770 soros de cães que foram examinados pela técnica de Imunofluorescência Indireta. Foi observada uma ocorrência de 3,6% das amostras positivas, com títulos de 1:50 até 1:6400. Os cães de áreas rurais apresentaram diferença significativa na positividade quando comparados aos cães da área urbana de Viena (5,3% e 2,1%, respectivamente).

Moraes *et al.*, (2008), no estado de São Paulo, analisaram 963 amostras de sangue de cães sem sintomatologia clínica de zonas urbanas, rural e peri – urbana da Serra de Botucatu. Os mesmos autores relatam que todos os 11 municípios da região apresentaram cães soropositivos, o que revela uma ampla distribuição do parasito na região.

No município de Ilhéus (BA), Magalhães *et al.*, (2009) após analisarem 161 amostras de sangue de cães pela Técnica de RIFI, constataram que animais residentes em zonas urbanas apresentam uma maior soropositividade quando comparados a animais de zonas periurbanas.

Cunha Filho *et al.*, (2008), no município de Pelotas (RS), após analisarem amostras de sangue de 339 cães de origem urbana e rural pela técnica de RIFI, determinaram que animais da zona rural possuem um risco 3.5 vezes maior de contato com o parasito do que cães da área urbana. Constataram também que os animais com idade superior a três anos de idade têm maior risco do que animais com idade inferior.

O crescimento dos níveis de anticorpos com o aumento da idade dos cães sugere que a transmissão pós-natal é frequente e possui importante papel na epidemiologia na doença (BASSO *et al.*, 2001; SOUZA, 2001; CAÑON-FRANCO *et al.*, 2003; WANHA *et al.*, 2005). Barber (1998) relata que a taxa de transmissão vertical da neosporose é baixa em cães, apresentando índices de até 80 % da prole de mães soropositivas, nascerem não infectadas. Fato este que aumenta significativamente a importância da transmissão pós natal em cães.

Os trabalhos referentes a ocorrência de anticorpos em cães no Brasil para *N. caninum* estão na tabela 01.

Tabela 01 – Soroprevalências de anticorpos para *Neospora caninum* em cães, registradas em diversos inquéritos sorológicos no Brasil.

Estado	Frequência	Técnica	Referência
SP	25% (CCZ)* 10% (domiciliados)	NAT**	Gennari <i>et al.</i> (2002)
RO	8,3%	RIFI	Cañon-Franco <i>et al.</i> (2003)
MG	18,9% (Peri - urbano) 21,7% (rural)	RIFI	Fernandes <i>et al.</i> (2004)
MG	4,8% (domiciliados) 12,8% (CCZ)*	ELISA	Mineo <i>et al.</i> (2004)
PA	8,4%	RIFI	Azevedo <i>et al.</i> (2005)
BA	13,3% (domiciliados) 11,2% (CCZ)*	RIFI	Jesus <i>et al.</i> (2006)
MA	45%	RIFI	Teixeira <i>et al.</i> (2006)
MT	45%	RIFI	Benetti <i>et al.</i> (2008)
GO	32,9%	RIFI	Boaventura <i>et al.</i> (2008)
RS	5,5% (urbanos) 20,4% (rural)	RIFI	Cunha Filho <i>et al.</i> (2008)
PE	28,30%	RIFI	Figueiredo <i>et al.</i> (2008)
PR	12,7%	RIFI	Fridlund-Plugge <i>et al.</i> (2008)
SP	25,4%	RIFI	Moraes <i>et al.</i> (2008)
BA	11,8%	RIFI	Magalhães <i>et al.</i> (2009)

\* CCZ – Centro de Controle de Zoonoses

\*\* NAT – Neospora Agglutination Test

## **2.9 Diagnóstico de *N. caninum* em cães**

Nos cães o diagnóstico clínico pode ser difícil devido a sintomatologia neurológica apresentada por estes animais poder ser confundida com outras causas, como: traumatismo, cinomose, raiva entre outras.

As provas sorológicas podem ser consideradas uma ótima ferramenta de diagnóstico, principalmente na fase sub-clínica da doença em cães. Por que, segundo Farias (2002) a eliminação dos oocistos não ocorre de forma constante e estes só podem ser diferenciados dos oocistos de *Hammondia* sp. através de provas biológicas. Sendo assim o diagnóstico sorológico otimiza a conclusão do caso clínico.

Várias técnicas de diagnóstico direcionadas para o diagnóstico diferencial de *N. caninum* e outros coccídeos entre eles o *Toxoplasma gondii* e o *Sarcocystis* spp. Podem ser utilizadas, como: pesquisa de anticorpos séricos, microscopia, imunohistoquímica e histopatologia.

Os métodos diagnósticos podem ser classificados em indiretos que visam à pesquisa de anticorpos séricos no plasma e diretos como técnicas de imunohistopatologia entre outros.

### **2.9.1 Técnicas diretas**

#### **2.9.1.1 Isolamento *In Vitro***

Dubey e Lindsay (1993) relataram que o isolamento realizado a partir de tecido nervoso tem mais eficiência para esta técnica. O cultivo de *N. caninum* através de amostras de cistos teciduais possui uma baixa taxa de sucesso variando na maioria das vezes com a presença de bradizoitos viáveis no interior dos cistos.

#### **2.9.1.2 Técnicas histopatológicas**

O diagnóstico através das técnicas histopatológicas está baseado na detecção das lesões produzidas pelo parasito nos tecidos afetados. Os cistos são encontrados em

maior proporção no tecido nervoso e possuem uma parede de aproximadamente quatro  $\mu\text{m}$  de diâmetro (DUBEY & LINDSAY, 1996).

As lesões produzidas no cérebro são de encefalite não supurativa, com características de múltiplos focos de infiltrados mononucleares e células da glia ao redor de um foco central de necrose (DUBEY & LINDSAY, 1996).

Existem relatos da identificação de cistos e/ou taquizoitos pela técnica de histopatologia ou imunohistoquímica a partir de tecidos como cérebro, medula espinhal, pulmão (Greig et al., 1995), coração, fígado rins, retina (DUBEY et al., 1990; BARBER & TREES, 1996) e biópsias musculares (HAY *et al.*, 1990).

A técnica de imunohistoquímica é realizada utilizando soro policlonal ou anticorpo monoclonal anti- *Neospora*, e permite identificar o agente nos tecidos danificados.

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

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica de amplificação *in vitro* de fragmentos específicos de DNA.

As técnicas de PCR são de grande utilização para o diagnóstico de neosporose nos animais, esta técnica permite a amplificação de pequenas quantidades de DNA, mesmo estando o tecido autolisado (COLLANTES-FERNÁNDES *et al.*, 2002). Atualmente ainda possuem um custo de execução mais elevado o que dificulta sua utilização na rotina.

Hill *et al.*, (2001) padronizaram uma técnica de PCR para fazer a diferenciação entre os oocistos de *N. caninum* e *Hammondia hammondii* eliminados nas fezes de cão.

### **2.9.2 Técnicas Indiretas**

Segundo Barber e Trees (1996) a detecção de anticorpos séricos não é indicativa de doença clínica no animal e sim que houve exposição ao protozoário, visto que animais soropositivos podem ser assintomáticos. Mesmo cães eliminando oocistos

podem não soroconverter os anticorpos (LINDSAY *et al.*, 1999). As técnicas sorológicas são as mais utilizadas para identificação de neosporose em várias espécies de animais.

### **2.9.2.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)**

Os ensaios de Imunofluorescência indireta consistem em tornar visível a reação antígeno-anticorpo por meio de uma antiimunoglobulina marcada com fluorocromos.

Esta técnica foi primeiramente introduzida por Dubey *et al.*(1988 b) e desde então é amplamente utilizada como teste de referência para o diagnóstico de neosporose.

Segundo Lindsay *et al.*, (1999) podem ser utilizados neste teste amostras de soro sanguíneo, fluido cérebro espinhal, colostro e até mesmo leite.

Para o diagnóstico de neosporose em cães os títulos maior ou igual a 1:50 indicam exposição do cão ao agente (DUBEY *et al.*, 1988a). A positividade na RIFI é traduzida pela fluorescência na totalidade do parasito (PARÉ *et al.* 1995; HEMPHILL, 1999). Diluições inferiores podem resultar em reações inespecíficas, sendo que nestes casos os taquizoítos podem apresentar fluorescência incompleta. Segundo Atkinson *et al.*, (2000) podem ocorrer reações cruzadas com o *T. gondii*, onde os taquizoítos também apresentam-se com fluorescência periférica ou apical.

Segundo Giraldi *et al.*, (2001) títulos maiores ou iguais a 1:800 em cães que apresentem sinais clínicos , podem sugerir neosporose clínica.

A principal desvantagem desta técnica pode ser considerada a sua subjetividade no momento da leitura, o que pode resultar na baixa reprodutividade do teste (BJORKMAN & UGGLA, 1999; HEMPHILL, 1999 e CAÑON-FRANCO *et al.*, 2003).

### **2.8.2.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)**

Nos ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), as reações antígeno-anticorpo são detectadas por meio de conjugação de um destes componentes com uma enzima, que posteriormente age sobre um substrato, produzindo uma coloração, que pode ser detectada visualmente ou mensurada por espectrofotometria.

Essas técnicas, normalmente, utilizam uma superfície sólida para a imobilização do antígeno ou anticorpo, permitindo que se realize a remoção dos componentes que não reagiram por lavagem.

A técnica de ELISA possui um fator limitante no que diz respeito a ampliação das enzimas de reações inespecíficas, que com frequência estão relacionadas com reações cruzadas com outros coccídios ou com o tipo de antígeno utilizado (CAÑON-FRANCO *et al.*, 2003; CUNHA FILHO, 2007).

Segundo Bjorkman e Ugglá (1999) os antígenos mais específicos das espécies do Filo Apicomplexa são encontrados na superfície do parasito, o que pode explicar a maior especificidade da técnica de RIFI para *N. caninum* em comparação ao ELISA indireto.

O ELISA de avidéz tem sido utilizado recentemente, pois permite identificar infecções recentes de infecções crônicas, principalmente em bovinos (DUBEY, 2003). Segundo Dubey e Schares (2006), animais que apresentam, infecção primária recente possuem IgG com baixa avidéz, enquanto que animais infectados há mais de seis meses possuem IgG de alta avidéz.

### **2.8.2.3 NAT (*Neospora* Agglutination Test)**

Está técnica baseia-se na sedimentação dos taquizoítos fixados com formalina e detecta unicamente IgG (DESMONTS e REMINGTON, 1980). Nos resultados negativos ocorre a formação de um ponto no fundo do poço da placa, e em caso de resultado positivo ocorre uma sedimentação difusa (malha).

Está técnica é muito utilizada para pesquisas com sorodiagnóstico em animais silvestres em função de não necessitar conjugados específicos para a espécie (CAÑON-FRANCO *et al.*, 2003). Como desvantagem pode-se citar a dificuldade em produzir o antígeno em escalas comerciais.

## 2.9 Potencial zoonótico

Embora anticorpos para *N. caninum* já tenham sido relatados em humanos, o protozoário ainda não foi detectado nos tecidos, portanto ainda se desconhece o potencial zoonótico desta parasitose (TRAMAS *et al.*, 1999).

Lobato *et al.*, (2006) indicam a exposição ou infecção por *N. caninum* em seres humanos, especialmente pacientes infectados por SIDA e em pacientes com alterações neurológicas. É importante ressaltar a importância de métodos diagnósticos complementares como a PCR e imunohistoquímica com o material coletado em biópsia ou autópsia para uma melhor caracterização da infecção humana pelo protozoário.

## 2.10 Controle e profilaxia

É importante a adoção de medidas efetivas de controle para diminuir os riscos relativos à infecção pelo *N. caninum*. Segundo Atkinson *et al.*, (2000), estas medidas visando o controle tem como foco limitar as vias de transmissão vertical e/ou horizontal. Controlar os fatores como o uso de água e alimentos contaminados, o não fornecimento de carne crua na alimentação de cães e a redução da exposição de cães a tecidos infectados como fetos abortados ou crias mortas (ANDREOTTI, 2001).

Ainda não se tem um esquema terapêutico preventivo disponível para utilização em pequenos animais (DUBEY & LINDSAY, 1996). O tratamento em bovinos é sabidamente ineficaz, porém em cães com sinais neurológicos o tratamento é longo com prognóstico de reservado a desfavorável. Os protocolos mais utilizados no tratamento de cães podem incluir clindamicina (11-22 mg/kg, BID-TID), sulfonamidas (15mg/kg, BID) e pirimetamina (1 mg/kg, SID) (BARBER, 1998).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Área de estudo

Foram avaliados cães da área urbana do município de Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

O município de Porto Alegre (Figura 5) está localizado na mesorregião metropolitana, possui uma população de 1.360, 590 habitantes (Censo IBGE/2000) e uma área total de 470, 25 km<sup>2</sup>. Atualmente pode ser dividida em 78 bairros, com características sócio-econômicas e geográficas distintas. Possui ainda cerca de 70 km de suas margens banhadas pelo lago Guaíba.

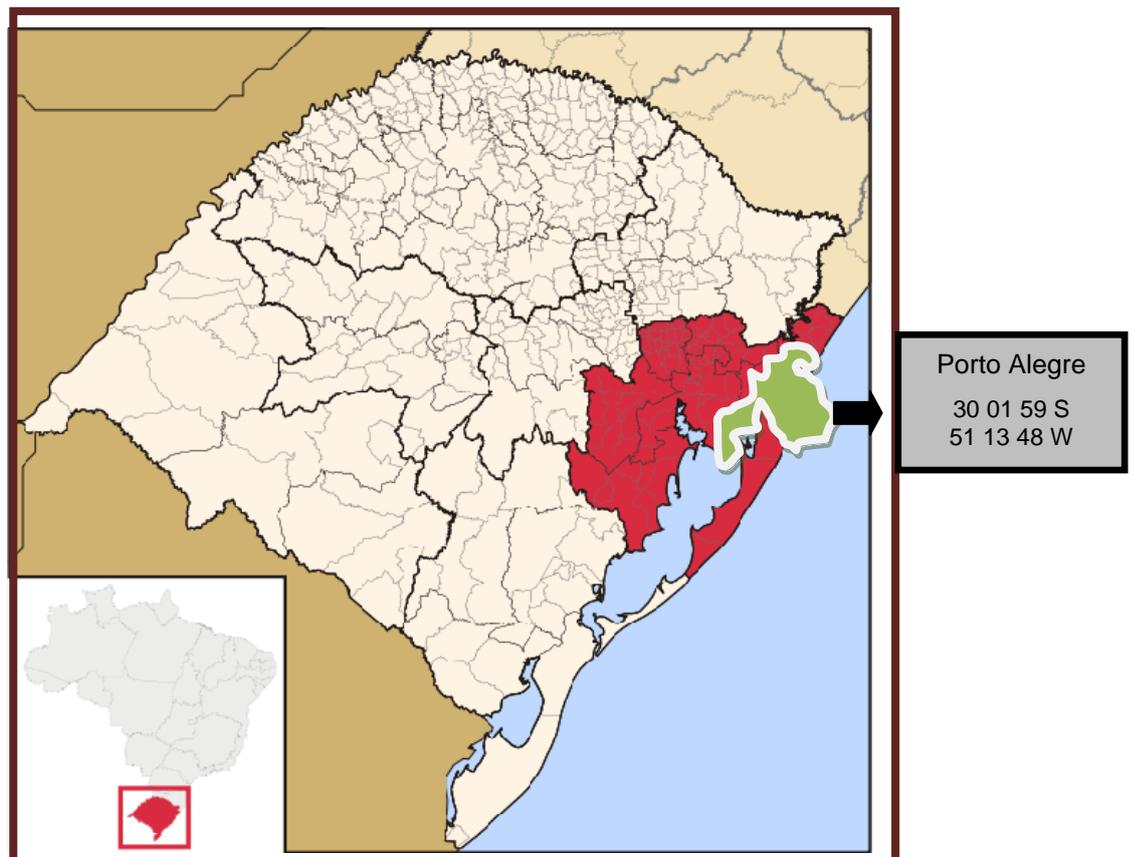


Figura 05: Localização geográfica do município de Porto Alegre-RS em verde.  
Fonte: [http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:RioGrandedoSul\\_Meso\\_MetropolitanadePortoAlegre.svg](http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:RioGrandedoSul_Meso_MetropolitanadePortoAlegre.svg)

Segundo a Organização Mundial de Saúde, aplica-se a proporção de 1 cão para cada 7 habitantes, o que representaria na cidade de Porto Alegre uma população canina de aproximadamente 194.370 cães.

### 3.2 Amostras

A amostragem foi determinada de forma parcialmente randômica, de acordo com Thrusfield (2004), para uma expectativa de prevalência de 20%, com precisão absoluta de 5%, e nível de confiança de 95%, totalizando uma amostragem de no mínimo 245 amostras de sangue de cães.

Foram colhidas 260 amostras de cães, do município de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, BR. Os cães foram divididos em três grupos de acordo com a origem, animais domiciliados (Grupo A) com um total de 145 amostras coletadas, animais de criadores comerciais (Grupo B) com 45 amostras coletadas e animais errantes (Grupo C) com 70 amostras coletadas. As colheitas foram realizadas entre maio de 2008 e março de 2009, os exames realizados entre maio e julho de 2009. Dentro do grupo dos animais domiciliados (Grupo A), as amostras foram divididas em animais residentes em casa ou apartamento.

As amostras de cães domiciliados foram obtidas de animais atendidos em clínicas particulares e *pet shops* da cidade de Porto Alegre; as amostras de cães de criações comerciais obtidas em canis registrados no *Cannel Club* do RS e as amostras de cães errantes foram obtidas no Centro de Controle de Zoonoses do Município de Porto Alegre, RS. Foi Aplicado um questionário epidemiológico para cada animal. As amostras de sangue foram colhidas através de punção das veias cefálica e/ou jugular (Figura 6), acondicionadas em tubos sem EDTA identificados individualmente e enviadas sob refrigeração ao Laboratório de Protozoologia (PROTOLAB), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. No laboratório as amostras foram centrifugadas, e o soro obtido dividido em alíquotas e mantido a -20°C para posterior análise sorológica. A análise laboratorial foi realizada no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), nesta Universidade.



Figura 06: Coleta de sangue por punção venosa da jugular de um cão.

### 3.3 Questionário epidemiológico

O questionário epidemiológico apresentou perguntas referentes a idade, sexo, tipo de alimentação dos cães, questões relativas a manejo dos animais e breve histórico clínico. A aplicação do inquérito epidemiológico foi realizada diretamente com os proprietários ou responsáveis. Os questionários foram catalogados conforme a numeração do soro correspondente para posterior análise. (ANEXO 01)

### **3.4 Análise laboratorial**

#### **3.4.1 Antígeno de *Neospora caninum***

O antígeno utilizado para a realização da prova sorológica foi composto por taquizoítos de *N. caninum* (cepa NC-1), impregnados em lâminas de vidro, mantidos por cultivo celular na Universidade de São Paulo, no Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. As lâminas foram acondicionadas em caixas de polipropileno e mantidas a -20 °C. Os controles positivo e negativo utilizados também foram fornecidos pela mesma instituição.

#### **3.4.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)**

Os soros foram submetidos a técnica de RIFI segundo DUBEY *et al.* (1998). Os soros foram testados a partir da titulação inicial de 1:50 (2µl do soro testado em 98µl da solução diluente).

Em cada lâmina foram colocados os soros a serem testados em duplicata e os controles positivo e negativo. Os soros foram diluídos em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) pH 7,2 estéril.

O volume total colocado em cada orifício da lâmina foi de 20µl da diluição, sendo que foi realizado o mesmo procedimento com os controles. O material foi incubado em câmara úmida por 30 minutos em temperatura de 37°C. Após a incubação as lâminas foram submetidas a três lavagens de cinco minutos cada uma, em cuba de vidro com solução tampão carbonatada de lavagem estéril com pH 9,0.

Para otimizar o processo de secagem das lâminas, as mesmas foram colocadas na estufa em temperatura de 37°C. Após este processo foi adicionado 20µl do conjugado (IgG de coelho anti-IgG canina, marcada com isotiocianato de fluoresceína – SIGMA F-7884) na diluição de 1:128 em PBS estéril, pH 7,6 contendo azul de Evans 0,01%. Novamente as lâminas foram incubadas por 30 minutos a 37°C e após lavadas como descrito anteriormente, com a diferença que neste momento a técnica foi realizada em ambiente escuro para evitar a queima da fluoresceína. Foi realizada nova

secagem em estufa a 37°C, e se procedeu com a montagem das lâminas adicionando glicerina tamponada (pH 8,0) e lamínula.

A leitura foi realizada em microscópio de epifluorescência com objetiva de 40 vezes e ocular de 10 vezes (Olympus). Foram consideradas positivas somente as reações que apresentavam fluorescência periférica completa. As que apresentavam reações fracas, parciais ou fluorescência apical foram consideradas negativas de acordo com PARÉ *et al.* (1995).

Os soros positivos no ponto de corte (1:50) foram diluídos seqüencialmente na base dois e testados até a máxima titulação observada.

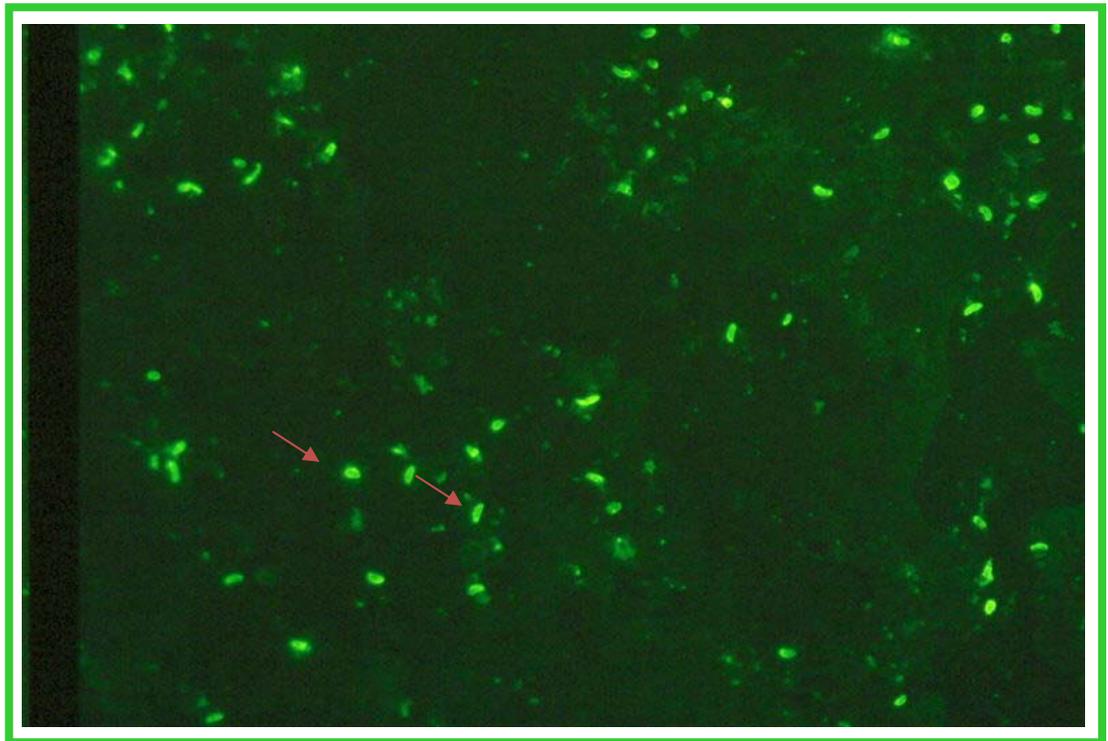


Figura 07 – Reação de Imunofluorescência Indireta com resultado positivo para anticorpos contra *Neospora caninum* em soro canino diluído a 1:50. Observar fluorescência periférica completa dos taquizoítos (seta). Aumento de 400x.

### 3.5 Análise Estatística

Os dados obtidos foram tabulados em planilhas eletrônicas (Microsoft Excel) para posterior análise estatística dos resultados.

A frequência de anticorpos para *Neospora caninum* foi calculada para os fatores de riscos e os valores comparados utilizando-se o Teste Exato de Fisher, através do pacote Estatístico Graphpad Instat.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Características da população estudada

A partir das informações colhidas pelo questionário epidemiológico, constatou-se que os cães domiciliados (Grupo A) apresentavam idade média de 2,4 anos (2 meses a 8 anos). Outra característica observada nestes animais foi que 56,5% dos animais eram cães de raça definida como Poodle, Shitzu, Maltês, Yorkshire entre outros) e 43,5 % dos animais era cães sem raça definida. Em relação à alimentação, 6,2% dos cães deste grupo recebiam somente comida caseira como dieta, 20% dos cães analisados recebiam ração comercial e 73,8% dos animais recebiam comida caseira e ração comercial. Não foi possível realizar a coleta de muitos animais de apartamento e com características de animais confinados em razão da resistência dos proprietários. Portanto dentro desse grupo se observou um maior número de animais que residiam em casa, com contato direto com outros animais e com acesso liberado a rua. Este grupo de animais não apresentou nenhuma outra característica marcante.

No grupo B foram visitados um total de sete criatórios comerciais de cães das seguintes raças: Rottweiler, Pastor Alemão, Pastor Belga de Malinois, Labrador, Schnauzer, Yorkshire e Terrier Brasileiro. Dos 45 animais coletados neste grupo, um total de 32 amostras eram de animais com idade superior a 12 meses (média de 3,5 anos) e 14 amostras de animais com idade inferior a 12 meses (média de 4 meses). Todos os locais visitados apresentam um ótimo cuidado com a sanidade dos animais e excelentes condições de higiene. Todos os animais recebiam somente ração comercial e tinham supervisão direta de médicos veterinário para os procedimentos necessários. Estes cães não mantinham contato com animais de rua e não tinham acesso liberado aos ambientes externos aos criatórios.

Os animais do grupo C (animais errantes) apresentaram média de idade 1,6 anos (2 meses a 3anos), nos casos onde não se tinha um histórico completo do animal a idade era determinada pela arcada dentária. Estes animais desde a retirada das ruas pelo serviço do Centro de controle de zoonoses de Porto Alegre foram mantidos em baias coletivas e recebiam ração comercial como dieta única. Somente dois animais eram de

raça definida (um Rottweiler e um Fila Brasileiro), os outros animais eram cães em raça definidas.

#### 4.2 Grupos Experimentais

Através da Técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI), foram observados anticorpos para *Neospora caninum* em 13,84% (36/260) das amostras analisadas de cães do município de Porto Alegre, RS, Brasil. (Figura 08)

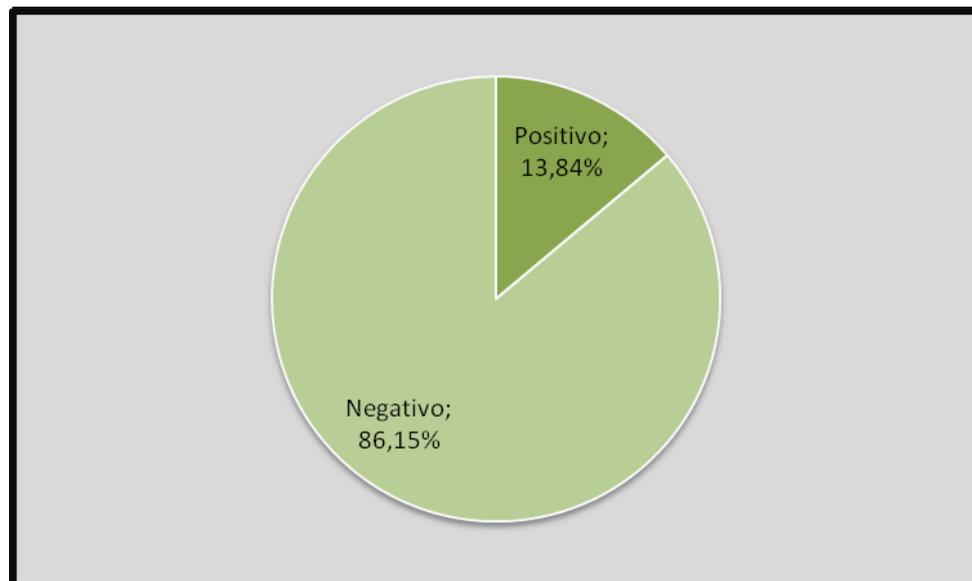


Figura 08: Resultado da Imunofluorescência Indireta para *Neospora caninum*.

Das 145 amostras pertencentes ao Grupo A (animais domiciliados), em 23 (15,8%) foram detectadas anticorpos para *N. caninum*. Em relação aos animais do grupo B (animais de criadores comerciais), das 45 amostras coletadas, apenas um (2,2%) foram positivas, enquanto que os animais pertencentes ao grupo C (animais errantes), do total de 70 amostras coletadas, 12 (17,10%) foram positivas (Figura 9).

A análise estatística através do Teste de Fisher detectou não haver diferença significativa entre os grupos A e C, porém foi detectada diferença significativa entre os grupos A e B; e entre os grupos B e C.

A Figura 09 apresenta a variação de acordo com os grupos de origem dos animais.

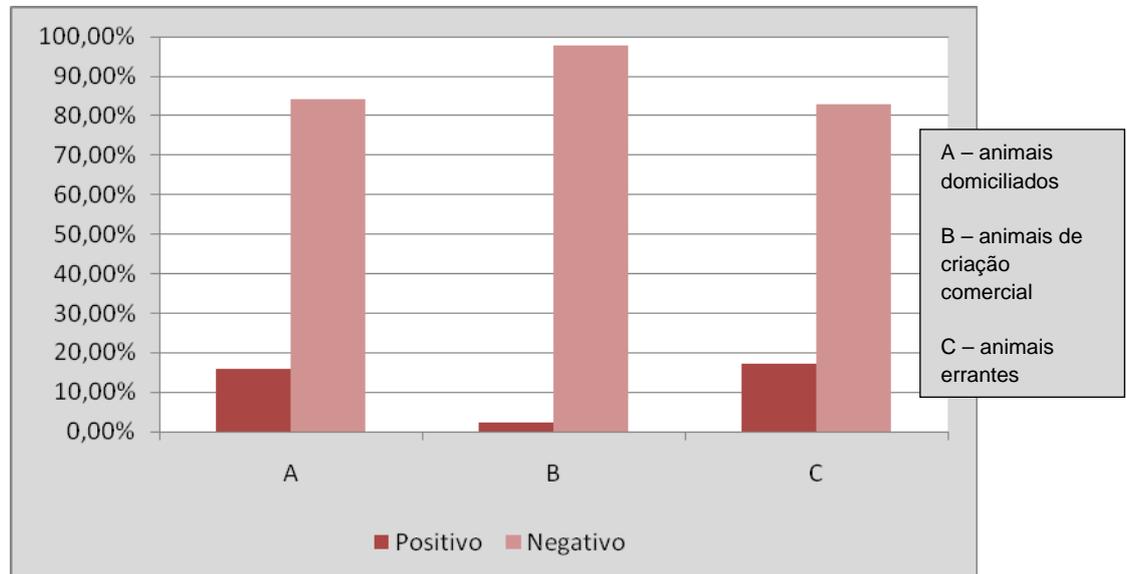


Figura 09 – Resultados da RIFI para *N. caninum* em relação aos grupos de origem dos animais.

Os títulos de anticorpos detectados através da Técnica de RIFI, em todas as amostras analisadas, variaram de 1:50 a 1:3200 (Figura 10).

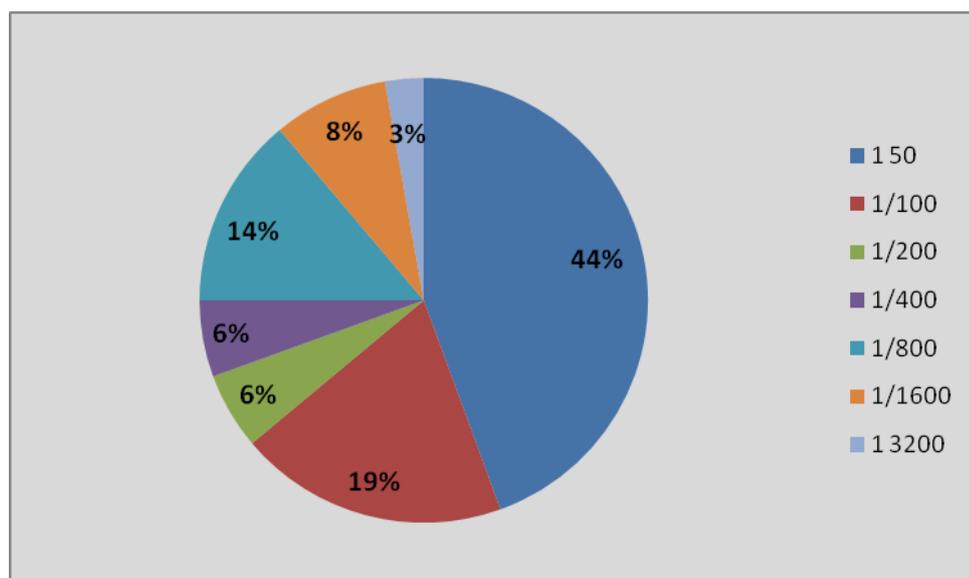


Figura 10: Títulos de anticorpos para *Neospora caninum* obtidos no presente estudo

Como pode ser observado na Figura 10, a maior concentração de soros ocorreu na diluição mínima (1:50), seguida da titulação de 1:100 (19,4%), 1:800 (13,8%), as demais diluições apresentaram distribuição variando entre 8,3% (1:1600) e 2,7% (1/3200).

### 4.3 Dados Epidemiológicos

A Tabela 02 demonstra a frequência de anticorpos observada de acordo com a alimentação oferecida aos cães.

TABELA 02 – Frequência de cães soropositivos e soronegativos pela técnica de RIFI quanto à variável alimentação, Porto Alegre, 2009.

	Somente ração comercial	Ração + comida caseira	Total
Positivo	01 (0,34%)	35 (13%)	36 (13%)
Negativo	73 (28%)	151 (58%)	224 (86%)
Total	74 (28%)	186 (72%)	260 (100%)

( $p < 0.0001$ )

Dos 36 animais detectados como positivos pela técnica de RIFI, somente um cão era alimentado exclusivamente com ração comercial. Os cães positivos recebiam total ou parcialmente comida caseira na sua dieta. Aplicando-se o teste de Fisher, esta variável foi considerada extremamente significativa para a infecção dos cães.

A tabela 03 mostra os resultados sorológicos referentes à variável acesso a rua dos animais coletados.

Tabela 03- Frequência de cães domiciliados soropositivos e soronegativos pela técnica de RIFI quanto a variável acesso a rua, Porto Alegre, 2009.

	Com acesso a rua	Sem acesso a rua	Total
Positivo	21 (14%)	2 (2%)	23 (16%)
Negativo	105 (72%)	17 (12%)	122 (84%)
Total	126 (87%)	19 (13%)	145 (100%)

(p= 0.785)

Quando analisamos somente os cães domiciliados em relação a variável acesso a rua, não foi observado uma diferença significativa.

Os dados referentes a variável idade dos animais coletados podem ser observados na tabela 04

Tabela 04 - Frequência de cães soropositivos e soronegativos pela técnica de RIFI quanto à variável idade dos animais, Porto Alegre, 2009.

	Menos 1 ano	Mais de 1 ano	Total
Positivo	9 (3%)	27 (10%)	36 (14%)
Negativo	86 (33%)	138 (53%)	224 (86%)
Total	95 (37%)	165 (63%)	260 (100%)

(p= 0.1385)

Do total de amostras positivas, nove eram de animais com menos de um ano de idade, enquanto que 27 amostras eram de animais com mais de um ano de idade.

Aplicando-se a análise estatística não observou-se diferença significativa entre eles. Não se revelou neste estudo a infecção pós-natal.

A tabela 05 mostra os valores obtidos referente à variável sexo dos animais analisados.

Tabela 05 - Frequência de cães soropositivos e soronegativos pela técnica de RIFI quanto à variável sexo dos animais, Porto Alegre, 2009.

	Macho	Fêmea	Total
Positivo	21 (8%)	15 (6%)	36 (14%)
Negativo	104 (40%)	120 (46%)	224 (86%)
Total	125 (48%)	135 (52%)	260 (100%)

(p= 0.2107)

Dos 125 soros analisados de cães do sexo masculino, 21 soros foram positivos, enquanto que dos 135 soros analisados do sexo feminino, 15 amostras foram positivas, não havendo diferença significativa entre eles. O *odds Ratio* foi de 1.615.

A tabela 06 demonstra os dados referentes a variável convivência direta ou não com outros cães analisadas de acordo com o questionário.

Tabela 06 - Frequência de cães soropositivos e soronegativos pela técnica de RIFI quanto a variável contato com outros cães, Porto Alegre, 2009.

	Contato direto Com cães	Sem contato direto Com cães	Total
Positivo	35 (13%)	1 (1%)	36 (14%)
Negativo	195 (75%)	29 (11%)	224 (86%)
Total	230 (88%)	30 (12%)	260 (100%)

(p= 0.0926)

Dos 230 cães que mantinham contato direto com outros cães 13% (35) animais foram positivos, enquanto que dos 30 animais que não mantinham contato direto com outros animais apenas um foi positivo para *N. caninum*. Embora a análise estatística não tenha detectado diferença significativa a taxa de exposição ao risco para os animais que convivem com outros cães foi de 5,253.

## 5 DISCUSSÃO

A frequência de anticorpos para *N. caninum* observada no presente estudo foi de 13,84% e vem ao encontro dos resultados encontrados por diferentes autores no Brasil como Magalhães *et al.* (2009); Fridlund-Plugge *et al.* (2008), Jesus *et al.* (2006) e Mineo *et al.* (2001). Alguns trabalhos apresentam uma frequência superior como Moraes *et al.* (2008); Benetti *et al.* (2008); Boaventura *et al.* (2008); Figueiredo *et al.* (2008) e Teixeira *et al.* (2006), enquanto que outros autores obtiveram frequências inferiores as relatadas nesse trabalho como Cunha Filho *et al.* (2008) em cães urbanos e Varadas *et al.* (2001).

Com relação aos dados obtidos neste estudo, a análise estatística revelou que não houve diferença significativa na positividade dos animais pertencentes ao grupo A (animais domiciliados) que foi de 15,8% (23/145) e dos animais do grupo C (animais errantes) que apresentou uma positividade de 17,1% (12/70). Embora os percentuais tenham sido menores, comparados aos encontrados por Boaventura *et al.*, (2008), em Goiânia- GO, onde também não foram detectadas diferenças entre a procedência dos animais. No estudo de Goiânia foram coletados 197 animais, sendo que 72 provenientes do Centro de Controle de Zoonoses e 125 animais de hospitais veterinários. Também foi utilizada a técnica de RIFI com ponto de corte de 1:50, apresentando uma positividade de 36,1% para animais provenientes do CCZ e 31,2% para animais domiciliados.

Jesus *et al.* (2006) em trabalho realizado no estado da Bahia também não detectaram uma diferença significativa em relação a procedência dos animais quando comparado animais domiciliados e animais errantes. Diferentemente deste estudo no qual não foi observada diferença em relação a procedência dos animais, Gennari *et al.* (2002) observaram uma diferença 2,5 vezes maior em animais errantes quando comparados aos domiciliados na cidade de São Paulo, utilizando a técnica de NAT, assim como Magalhães *et al.*, (2009) que obtiveram o dobro de positividade nos animais errantes quando comparados a animais domiciliados no município de Ilhéus (BA). Fato este pode ser explicado pela maior probabilidade de ingestão de roedores, pássaros e outros animais que podem servir de reservatórios para o *N. caninum* (HEMPHIL e GOTTSTEIN, 2000) e desta forma servir como fonte de infecção para cães de rua e até mesmo os domiciliados.

Teixeira *et al.* (2006) obtiveram uma frequência de 45 % de amostras positivas em cães de rua na cidade de São Luis - Maranhão. O autor relata como possível causa do alto índice encontrado que animais com acesso livre a rua ou contato direto com outras espécies de animais podem ser frequentemente mais infectados pelo *N. caninum* (FERNANDES *et al.* 2004; GENNARI *et al.* 2002).

Em relação aos animais do grupo B (animais de criação comercial), estes animais possuíam um controle mais rigoroso em relação ao acesso a rua, alimentação e cuidados veterinários, o que refletiu um valor de frequência de anticorpos abaixo dos obtidos nos outros grupos e já esperado pelos autores.

Analisando a variável alimentação, neste estudo foi observada uma diferença significativa em relação à dieta oferecida aos animais. Os animais que eram alimentados total ou parcialmente com comida caseira foram a grande maioria das amostras positivas. Concordando com os dados obtidos neste estudo, Patitucci *et al.* (2001) observaram que os cães alimentados com carne crua junto a dieta, tiveram um risco 2,6 vezes maior quando comparados a animais que recebiam dieta comercial. Bresciani *et al.* (2007) observaram diferença significativa entre os animais que recebiam dieta caseira, quando comparados aos que recebiam dieta comercial. Os autores Cañon-Franco *et al.* (2003) e Benetti *et al.* (2008) não obtiveram associação positiva da ocorrência de anticorpos e o tipo de alimentação oferecida aos animais, utilizando a mesma técnica de diagnóstico utilizada no presente estudo.

Quando analisou-se a variável acesso a rua, pode-se observar uma diferença significativa entre os animais que residiam em casa (com acesso parcial ou total a rua) e os animais de apartamento ou de criação comercial (acesso restrito a rua). Benetti *et al.* (2008) não obtiveram soropositividade em nenhum animal que permanecia constantemente confinado, confirmando os dados obtidos neste estudo. Cunha Filho *et al.*, (2008) demonstraram associação positiva com relação a animais que não ficam confinados nunca e a ocorrência de anticorpos em cães de área urbana e rural. Porém não houve diferença significativa quando analisamos essa variável somente entre os cães domiciliados. Esta característica pode ser explicada pelo baixo número de amostras de cães sem acesso a rua (confinados) neste estudo. Se o valor da amostragem fosse maior acreditamos que seria significativa essa variável dentro deste grupo.

Em relação aos animais que mantinham contato direto com outros cães e os animais que não mantinham, não foi observada diferença significativa entre esta variável, porém o risco de exposição nos animais que tinham contato direto com outros cães foi cinco vezes maior. Somente uma amostra de cão sem contato direto nenhum com outros cães apresentou sorologia positiva, neste caso específico acredita-se que a variável alimentação tenha sido a de maior importância. Acredita-se que o número de amostras coletadas pode ter influenciado na diferença estatística desta variável.

Os resultados encontrados no presente estudo, em relação à idade dos animais, não revelaram influência na soropositividade dos cães analisados. Diferentemente do observado neste trabalho, Moraes et al. (2008), obtiveram um percentual crescente em relação a idade dos animais, sendo maior a positividade entre os cães de um a quatro anos de idade. Fato este indica uma maior possibilidade de contato e por consequência infecção dos animais. Outros autores também observaram essa mesma característica de aumento da positividade com o incremento da idade dos animais em estudos na Argentina (Basso *et al.*, 2001) e em estudos no Brasil (SOUZA *et al.*, 2002; CAÑÓN-FRANCO *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2004 e AGUIAR *et al.*, 2006).

Entretanto o fator idade não foi observado como fator significativo para a presença de anticorpos para *N. caninum* em trabalhos realizados por Rasmussem e Jensen (1996) na Dinamarca. No Brasil, Varadas *et al.*, (2001), após analisarem 295 amostras de soro canino para pesquisa de anticorpos para *N. caninum*, pela técnica de RIFI e com ponto de corte 1:50, também não observaram relação positiva com relação a idade dos animais analisados.

Em relação ao gênero dos animais coletados e analisados; das amostras consideradas positivas pela técnica de RIFI, 8% (21/36) das amostras eram de cães machos e 6% (15/36) de fêmeas. Pela análise estatística não houve diferença significativa em relação a esta variável. Acredita-se em decorrência da análise dos dados, que cães de ambos os sexos eram expostos aos mesmos fatores de riscos na cidade de Porto Alegre. Cunha Filho *et al.*, (2008) analisaram soro de 339 cães de origem urbana e rural no município de Pelotas-RS, utilizando a técnica de RIFI e ponto de corte 1:50, e os autores não obtiveram, diferença significativa na variável sexo dos animais coletados, concordando com o estudo em questão.

As variáveis gênero e raça dos cães também não foram associadas com a ocorrência de *N.caninum* em trabalhos na Argentina (BASSO *et al.*, 2001), Uberlândia (FERNANDES *et al.*, 2004) e Paraíba (AZEVEDO *et al.*, 2005).

Oliveira *et al.*, (2004) em estudo se prevalência de anticorpos para *N. caninum* em cães de área urbana no município de Campo Grande, também não observaram diferença estatística em relação ao gênero dos cães.

Em estudo realizado em Goiânia com cães de área urbana, também não se observou diferença entre o gênero dos animais. Foram analisadas 197 amostras de cães pela técnica de RIFI, com ponto de corte de 1:50.

A titulação máxima encontrada neste estudo foi de 1:3200 (3%) das amostras positivas, e as titulações de maior frequência foram as de 1:50 (44%), 1:100 (19%) e 1:800 (14%) das amostras positivas. Na grande maioria dos trabalhos realizados no Brasil com cães de área urbana não foi possível observar uma correlação positiva entre altos níveis de anticorpos e sinais clínicos nos cães. Trabalhos de Souza *et al.*, (2002), Cañon-Franco *et al.*, (2003) e Cunha Filho *et al.*, (2008) obtiveram resultados semelhantes ao obtido neste estudo.

No presente estudo também não foi possível observar essa relação, porém dois animais que apresentaram titulações de anticorpos altas (1:3200 e 1:800), houve relato dos proprietários no questionário sobre a presença de alterações neuromusculares e neurológicas nos dois casos.

## 6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que:

- Mesmo já sendo esperada a ocorrência de anticorpos para *Neospora caninum* em cães da área urbana de Porto Alegre, os valores determinados estão acima do esperado pelos pesquisadores, necessitando que novas investigações esclareçam as formas de contaminação destes animais em meio urbano.
- Conforme já esperado nas hipóteses deste trabalho os fatores alimentação e contato direto com outros cães aumentam a chance de contaminação dos animais de área urbana, porém os resultados determinados para a variável idade não foram os esperados.
- Os resultados encontrados evidenciam a necessidade de se continuar pesquisando o *Neospora caninum* nesta área para se determinar a cadeia epidemiológica deste protozoário e esclarece dúvidas que foram suscitadas no presente estudo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; RODRIGUES, A.A.R.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; ERNEY, P.C.; GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. **Veterinary Parasitology**. v.142, p.71-77, 2006.
- ALMEIDA, M.A.O. Epidemiologia de *Neospora caninum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.13, suplement 1, 2004.
- ANDERSON, M.L.; ANDRIANARIVO, A.G.; CONRAD, P.A. Neosporose in cattle. **Animal Reproduction Science**. v. 60-61 p. 417-431, 2000.
- ANDERSON, M.L.; REYNOLDS, J.P.; ROWE, J.D.; SVERLOW, K.M.; PACKHAN, A.E.; BARR, B.C.; CONRAD, P.A. Evidence the vertical transmission of *Neospora* infection in diary cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 210, p. 1169-1172, 1997.
- ANDREOTTI, R. Neosporose: um possível problema reprodutivo para o rebanho bovino – Campo Grande: **Embrapa Gado de Corte**. 14p. (Documentos Embrapa gado de Corte, ISSN 1517-3747; 104), 2001.
- ANDREOTTI, R.; OLIVEIRA, J.M.; SILVA, E.A.; OSHIRO, L.M.; MATOS, M.F.C. Occurrence of *Neospora caninum* in dogs and its correlation with visceral leishmaniasis in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 135, p.375-379, 2006.
- ATKINSON, R.; HARPER, P.A.W.; REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. **Parasitology Today**, v.16, n.3, p.100-114, 2000.
- AZEVEDO, S.S.; BATISTA, C.S.A.; VASCONCELLOS, S.A.; AGUIAR, D.M.; RAGOZO, A.M.A.; RODRIGUES, A.A.R.; ALVES, C.J.; GENNARI, S.M. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. **Research in Veterinary Science**. v. 79, p.51-56, 2005.
- BARBER, J.S. Neosporosis canina. **Waltham Focus**. v.8, p.25-29, 1998.
- BARBER, J.S.; GASSER, R.B.; ELLIS, J.; REICHEL, M.P.; ILLAN, D.; TREES, A.J. Prevalence of serum antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. **Journal of Parasitology**. v. 83, p. 1056-1058, 1997.
- BARBER, J.S.; TREES, A.J. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. **The Veterinary Record**. v. 139, p. 439-443, 1996.
- BARTELS, C.J.; WOUDA, W.; SCHUKKEN, Y.H. Risk factors for *Neospora caninum* – associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995-1997). **Theriogenology**. v. 52, n.2, p. 247-257, 1999.

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

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

BENETTI, A.H.; TONIOLLO, G.H.; SANTOS, T.R.; GENNARI, S.M.; COSTA, A.J.; DIAS, R.A. Ocorrência de anticorpos anti- *Neospora caninum* em cães no município de Cuiabá, Mato Grosso. **Ciência Animal Brasileira**. v. 9, n.1, p.177-180, 2008.

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

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

BOAVENTURA, C.M.; OLIVEIRA, V.S.F.; MELO, D.P.G.; BORGES, L.M.F.; SILVA, A.C. Prevalência de *Neospora caninum* em cães de Goiânia. **Revista de Patologia Tropical**. v. 37, n. 1, p.15-22, 2008.

BRESCIANI, K.D.S.; COSTA, A.J.; NUNES, C.M.; SERRANO, A.C.M.; MOURA, A.B; STOBBE, N.S.; PERRI, S.H.V.; DIAS, R.A.; GENNARI, S.M. Ocorrência de anticorpos contra *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* e estudos de fatores de risco em cães de Araçatuba-SP. **ARS Veterinária**. v. 23, p.40-46, 2007.

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

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

CHEADLE, M.A.; LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs. **Veterinary Parasitology**. v. 85, n.4, p.325, 1999.

COLLANTES-FERNANDES, E.; ZABALLOS, A.; ÁLVARES-GARCIA, G.; ORTEGAMORA, L.M. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n.4, p.1194-1198, 2002.

CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.; DIAS, M.M. Aborto bovino por *Neospora caninum* no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural, Santa Maria**. v. 30, n.5, p.863-868, 2000.

CUDDON, P.Q. Acquired canine peripheral neuropathies. **Veterinary Clinics of North America :Small Animal Practice**. v. 32, n.1, p.225-229, 2002.

CUNHA FILHO, N.C.; LUCAS, A.S.; PAPPEN, F.G.; RAGOZO, A.M.; GENNARI, S.M.; JUNIOR, T.L.; FARIAS, N.A.R. Fatores de risco e prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães urbanos e rurais do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 17, n1. p.301-306, 2008.

DESMONTS, G; REMINGTON, J.S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: Method for increasing sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 11. n. 6, p. 562-568. 1980.

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

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

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

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

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

DUBEY, J.P.; HATTEL, A.L.; LINDSAY, D.S.; TOPPER, M.J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission Neospora. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 193, n.10, p.1259-1263, 1988b.

DUBEY, J.P.; HOLLIS, K.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; KWOK, O.C.H.; HUNGERFORD, L.; ANCHOR, C.; ETTER, D. High prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **International Journal Parasitology**. v. 29, p.1709-1722, 1999.

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

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Neosporosis. **Parasitology Today**. v.9, n.12, .p452-458, 1993.

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

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; ADANS, D.S.; GAY, J.M.; BASZLER, T.V.; BLAGBURN, B.L.; THULLIEZ, P. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. **American Journal of Veterinary Research**. v. 57, n.3, p.329-336, 1996.

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

DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical microbiology Review**. v. 20(2), p. 323-367, 2007.

DUBEY, J.P.; VIANNA, M.C.B.; KWOK, O.C.H.; HILL, D.E.; MISHA, K.B.; TUO, W.; VELMURUGAN, G.V.; CONORS, M.; JENKINS, M.C. Neosporosis in Beagle dogs: clinical, signs, diagnosis, treatment, isolation and genetic characterization of *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**. v. 149, n.3-4, p.158-166, 2007.

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

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

FIGUEREDO, L.A.; DANTAS-TORRES, F.; FARIA, E.B.; GONDIN, L.F.P.; SIMÕES-MATTOS, L.; BRNDÃO-FILHO, S.P.; MOTA, R.A. Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs from Pernambuco, Northeast Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 157, p.9-13, 2008.

FRIDLUND-PLUGGE, N.; MONTIANI-FERREIRA, F.; RICHARTZ, R.R.T.B.; PIZZOL, J.D.; MACHADO, P.C.; PATRICIO, L.F.L.; ROSINELLI, A.; LOCATELLI-DITTRICH, R. Frequency of antibodies against *Neospora caninum* in stray and domiciled dogs from urban, periurban and rural areas from Paraná state, Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 17, n. 4, p. 222-226, 2008.

FURUTA, P.I.; MINEO, T.W.P.; CARRASCO, A.O.T.; GODOY, G.S.; PINTO, A.A.; MACHADO, R.Z. *Neospora caninum* infections in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. **Parasitology**, v. 134, p. 1931-1939, 2007.

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

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

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

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

GREIG, B.; ROSSOW, K.D.; COLLINS, J.E.; DUBEY, J.P. *Neospora caninum* pneumonia in a adult dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 206, n.7, p.1000-1001, 1995.

GUARINO, A.; FUSCO, G.; SAVINI, G.; DI FRANCESCO, G.; CRINGOLI, G. Neosporosis in water buffalo (*Bubalus bulalis*) in southern Italy. *Veterinary Parasitology*. v. 91, p.15-21, 2000.

HAY, W.H.; SHELL, L.G.; LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. Diagnosis and treatment of *Neospora caninum* infection a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 197, n.1, p.87-89, 1990.

HEMPHILL, A. The host-parasite relationship in neosporosis. *Advances in Parasitology*. v. 43, p.47-107, 1999.

HEMPHILL, A. & GOTTSTEIN, A european perspective on *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*. v.30, p. 877-924, 2000.

HILL, D.E.; LIDDELL, S.; JENKINS, M.C.; DUBEY, J.P. Specific detection of *Neospora caninum* oocysts in fecal samples from experimentally – infected dogs using the polymerase chain reaction. *Journal of Parasitology*. v. 87, n.2, p.395-398, 2001.

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

KLEIN, B.U.; MULLER, E. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs with and without clinical suspicion for neosporosis in Germany. *Praktische Tierarzt*. v. 82, n.6, p.437-440, 2001.

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

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

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; DUNCAN, R.B. Confirmation that the dogs is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*. v.82, n.4, p.327-333, 1999.

LINDSAY, D.S.; WESTON, J.L.; LITTLE, S.E. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) from South Carolina. **Veterinary Parasitology**. v. 97, p.159-164, 2001.

LOBATO, J.; DEISE, A.O.S.; MINEO, W.P.T.; AMARAL, J.D.H.F.; GESMAR, R.S.S.; COSTA-CRUZ, J.M.; FERREIRA, M.S.; BORGES, S.A.; MINEO, R.J. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: High seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. **Clinical and Vaccine Immunology**. v. 13, n.1, p.84-89, 2006.

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

MAGALHÃES, V.C.S.; SICUPIRA, P.M.L.; GONDIM, L.F.P.; MUNHOZ, A.D. Frequência de anticorpos contra *Neospora caninum* em cães do município de Ilhéus, Bahia. **Ciência Animal Brasileira**. v. 10, n. 1, p.306-311, 2009.

MAINAR-JAIME, R.C.; THURMOND, M.C.; BERZAL-HERRANZ, B.; HIETALA, S.K. Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. **Veterinary Record**. v. 145, n.3, p.72-75, 1999.

McALLISTER, M.M.; HUFFMAN, E.M.; HIETALA, S.K.; CONRAD, P.A.; ANDERSON, M.L.; SALMAN, M.D. Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, n. 3, p. 355-357, 1996.

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

McGUIRE, A.; McALLISTER, M.; WILLS, R. A.; TRANAS, J. D. Experimental inoculation of domestic pigeons (*Columbia livia*) and zebra finches (*Poephila guttata*) with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1525-1529, 1999.

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

MINEO, T. W. P.; SILVA, D. A. O.; COSTA, G. H. N.; VON ANCKEN, A.C.B.; KASPER, L. H.; SOUZA, M. A.; CABRAL, D. D.; COSTA, A. J.; MINEO, J.R. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 98, p. 239-245, 2001.

MORAES, C.C.G.; MEGID, J.; PITUCO, E.M.; OKUDA, L.H.; FAVA, C.D.; STEFANO, E.; CROCCI, A.J. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães da microrregião da serra de Botucatu, estado de São Paulo, BR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p.1-6, 2008.

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

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

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

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

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

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

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

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

SANTOS, A. P. M. E. **Diagnóstico imuno-histoquímico do *Neospora caninum* em rebanho bovino leiteiro, da região Norte do Paraná Londrina/PR**. 92 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual de Londrina. 2000.

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

SAWADA, M.; PARK, C. H.; KONDO, H.; MORITA, T.; SHIMADAS, A.; YAMANE, I.; UMEMURA, T. Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60, n. 7, p. 853-854, 1998.

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

SOUZA, S. L. P. **Soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em cães de propriedades rurais produtoras de leite B da região Norte do Estado do Paraná.** 2001. 115 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada à Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

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

TRANAS, J.; HEINZEN, R. A.; WEISS, L. M.; McALLISTER, M. M. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 5, p. 765-767, 1999.

TREES, A. J.; GUY, F.; TENNANT, B. J.; BALFOUR, A. H.; DUBEY, J. P. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in a population of urban dogs in England. **Veterinary Record**, v. 132, n. 6, p. 125-126, 1993.

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

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

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

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

WALKER B. *Neospora caninum* infection in cattle , Agnote DAI -314, **Veterinary Officer New South Wales Agriculture.** Australia, Ed.Gunnedah, 2004.

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

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

**ANEXO1**  
**QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO**

Data da coleta: \_\_\_\_\_ **NÚMERO DA AMOSTRA:** \_\_\_\_\_  
**Nome do animal:** \_\_\_\_\_ **Raça:** \_\_\_\_\_ **Sexo:** \_\_\_\_\_ **Idade:** \_\_\_\_\_

Proprietário: \_\_\_\_\_

Endereço: (Rua/Avenida) \_\_\_\_\_

Nº: \_\_\_\_\_ Apto.: \_\_\_\_\_ Fones: \_\_\_\_\_

**Procedência:** ( ) cão errante (CCZ)\* ( ) criador/ canil ( ) domiciliado

\* foi capturado há quanto tempo: \_\_\_\_\_

**Ambiente:** ( ) casa \* ( ) pátio cimentado\* ( ) pátio gramado/terra\* ( ) apartamento  
 ( ) canil com celas individuais ( ) canil com celas coletivas com \_\_\_\_\_ animais/cela  
 ( ) permanência na cela: \_\_\_\_ horas/dia ( ) permanência no pátio: \_\_\_\_ horas/dia  
 Passeios na rua: ( ) nunca ( ) eventualmente ( ) com freqüência Qual? \_\_\_\_\_  
 ( ) passeio livre (sem guia) ( ) passeio restrito (com guia) ( ) passeio restrito e livre  
 Convive com outros animais? ( ) não ( ) sim Quais? \_\_\_\_\_  
 Relação de parentesco com outros cães do ambiente? ( ) não ( ) sim (especificar em observações)

Limpeza do ambiente e recolhimento das fezes? ( ) nunca ( ) mensal ( ) semanal ( ) diário  
 ( ) outra \_\_\_\_\_

\* Presença de gatos de rua? ( ) não ( ) sim Roedores? ( ) não ( ) sim

**Alimentação:** ( ) somente ração ( ) somente comida caseira\* ( ) ração e comida caseira\*\*

\* alimentos utilizados: \_\_\_\_\_

\*\* com que freqüência é oferecida à comida caseira: \_\_\_\_\_

**Outras informações:**

**Vacinação:** ( ) nunca ( ) atrasadas ( ) em dia Quais? \_\_\_\_\_

**Vermifugação:** ( ) nunca ( ) atrasado\* ( ) em dia\*

\*Com que freqüência e qual produto utilizado? \_\_\_\_\_

**Castração:** ( ) não ( ) sim Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

**Doenças recentes:** ( ) não ( ) sim\*

\*Qual e tratamento utilizado: \_\_\_\_\_

Observações: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_