

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

Prevalência de anticorpos para *Neospora caninum* em cães das áreas urbana e rural do município de Caxias do sul, Rio Grande do Sul.

JANINE CRISTINA BRINKER

**PORTO ALEGRE – RIO GRANDE DO SUL
2012**

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

Prevalência de anticorpos para *Neospora caninum* em cães das áreas urbana e rural do município de Caxias do sul, Rio Grande do Sul.

JANINE CRISTINA BRINKER

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

Orientador:

Prof. Dr. Flávio A. Pacheco de Araújo

Co-Orientador (a):

Profa. Dra. Neusa Saltiel Stobbe

**PORTO ALEGRE
2012**

CIP - Catalogação na Publicação

Brinker, Janine Cristina

Prevalência de anticorpos para *Neospora caninum* em cães das áreas urbana e rural do município de Caxias do sul, Rio Grande do sul. / Janine Cristina Brinker. -- 2012.
73 f.

Orientador: Flávio Pacheco de Araújo.
Coorientadora: Neusa Saltiel Stobbe.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Fatores de risco. 2. Imunofluorescência Indireta. 3. Neosporose. I. Pacheco de Araújo, Flávio, orient. II. Saltiel Stobbe, Neusa, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Candidato (a): JANINE CRISTINA BRINKER

Prevalência de anticorpos para *Neospora caninum* em cães das áreas urbana e rural do município de Caxias do sul, Rio Grande do Sul.

Aprovada em ____/____/____

APROVADO POR:

Prof. Dr. Flávio A. Pacheco de Araújo
Orientador

Profa. Dra. Neusa Saltiel Stobbe
Co-Orientadora

Prof. Dr. David Driemeier (UFRGS)
Membro da Banca

Prof. Dr. Jerônimo Lopes Ruas (UFPEL)
Membro da Banca

Profa. Marilise Brittes Rott (UFRGS)
Membro da Banca

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu marido, Olímpio pela compreensão, paciência e apoio nesse período difícil em que passei.

Ao meu pai Alberto, muito obrigada pela confiança em todos os momentos e principalmente quando deixava de acreditar em mim mesma.

A minhas cunhadas Maria Cristina e Maria Bernadete que me acolheram em suas casas, nesse tempo em que ficava indo e vindo de Porto Alegre.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Flávio de Araújo, pela confiança e paciência todos esses anos.

As minhas colegas do Laboratório de Protozoologia da UFRGS, Tatiana, Alessandra e principalmente em especial a Mariana, pela ajuda, paciência e pelas nossas eternas discussões sem fim. Todas me ajudaram a crescer como pessoa. Muito obrigada por tudo!

À minha co-orientadora professora Dra. Neusa Stobbe, pela dedicação, paciência, sua ajuda foi fundamental para a realização deste trabalho.

Aos funcionários e professores da UFRGS e do PPGCV desta Faculdade.

RESUMO

Pertencente ao filo Apicomplexa, *Neospora caninum* causa infecções associadas à perda fetal e mortalidade neonatal em várias espécies animais. A doença é descrita desde 1984, quando ocorreram os primeiros casos de encefalite e miosite em cães. Estes desempenham um papel fundamental na epidemiologia do protozoário, pois são seus hospedeiros definitivos, assim como os coiotes e o cão australiano dingo. Devido à sua importância no mundo e às diferenças de prevalência nos diversos estados brasileiros há necessidade de investigar a ocorrência do protozoário em cães no Rio Grande do Sul. Amostras de soro de 313 cães de origem urbana e rural do município de Caxias do Sul foram testadas para a presença de anticorpos para *N. caninum* mediante a reação de imunofluorescência indireta (RIFI \geq 1:50). Na área urbana a prevalência foi de 2% (5/160) e na rural foi de 12% (36/153) ($p < 0,0001$). Os títulos sorológicos variaram de zero (86,9%) a 1:6400 (0,64%), sendo 1:50 (5,11%), o mais prevalente dentre os positivos. Nenhum dos cães examinados apresentou sinais clínicos de neosporose durante a coleta de sangue. Dos fatores de risco avaliados, a idade dos cães rurais foi o único significativo ($p = 0,0053$), com prevalência de 1% (2/34) entre aqueles com menos de um ano de idade e de 22% (34/119) entre os com mais de um ano de idade. Quanto aos fatores gênero, alimentação confinamento, contato com bovino e recolhimento de carcaças, os cães rurais não apresentaram diferença significativa em relação à soropositividade. Nos cães urbanos, os fatores gênero, alimentação e idade não apresentaram diferença significativa em relação à positividade dos animais. Este estudo demonstrou que os cães da área rural de Caxias do Sul estão mais predispostos à infecção por *N. caninum*, principalmente animais com mais de um ano de idade. Nos cães de área urbana o protozoário também se fez presente no município de Caxias do Sul, necessitando maiores estudos nessa população.

Palavras chave: Fatores de Risco, Imunofluorescência indireta, neosporose.

ABSTRACT

Belonging to the phylum Apicomplexa, *Neospora caninum* causes infections associated with fetal loss and neonatal mortality among several animal species. This disease has been reported since 1984, when the first cases of encephalitis and myositis in dogs occurred. They play a key role in the epidemiology of the protozoan, because they are its definite hosts, as well as the coyotes and the Australian dog dingo. Due to its importance in the world and to the differences of prevalence in the several Brazilian states, there is the need to investigate the occurrence of the protozoan among dogs in Rio Grande do Sul. Serum samples from 313 dogs from urban and country areas of Caxias do Sul were tested for the presence of antibodies to *N. caninum* by indirect immunofluorescence assay (RIFI \geq 1:50). In urban areas the prevalence was 2% (5/160) and in rural areas was 12% (36/153) ($p < 0.0001$). The serological titers ranged from zero (86.9%) to 1:6400 (0.64%) and 1:50 (5.11%), the most prevalent among the positives. None of the dogs examined showed clinical signs of neosporosis during blood collection. Among the risk factors evaluated, the age of rural dogs was the only significant one ($p = 0.0053$), with a prevalence of 1% (2/34) among those with less than a year old and 22% (34/119) among the ones which were more than one year old. Concerning the factors gender, feeding, confinement, contact with cattle and carcasses collection, the country dogs did not show significant difference related to seropositivity. Among urban dogs, the factors gender, feeding and age did not show significant difference regarding the positivity of the animals. This study showed that dogs from country areas of Caxias do Sul are more likely to get infected by *N. caninum*, especially the animals which are more than one year old. In dogs from urban areas the protozoan was also present in Caxias do Sul, requiring further studies among this population.

Key-words: risk factors, indirect immunofluorescence, neosporosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Ciclo de vida do <i>N. caninum</i>	20
Figura 2-	Mapa delimitando a área de estudo no trabalho.....	39
Figura 3-	Lâminas sendo preparadas para posterior leitura.....	42
Figura 4-	Foto da reação de Imunofluorescência Indireta.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Ocorrência de anticorpos contra <i>Neospora caninum</i> em cães de diversos países segundo a origem dos animais.....	23
Tabela 2-	Soroprevalência de anticorpos (Reação de Imunofluorescência Indireta) para <i>Neospora caninum</i> em cães no Brasil, segundo a origem dos animais.....	25
Tabela 3-	Ocorrência de cães soropositivos para <i>Neospora caninum</i> através da técnica de RIFI em relação à origem (urbanos e rurais) em Caxias do Sul, RS.....	45
Tabela 4-	Frequência de amostras de cães de origem rural soropositivas ¹ para <i>Neospora caninum</i> segundo fatores de risco, no período de junho a dezembro de 2010 no município de Caxias do sul, RS.....	47
Tabela 5-	Frequência de amostras de cães de origem urbana soropositivas ¹ para <i>Neospora caninum</i> segundo fatores de risco, no período de junho a dezembro de 2010 no município de Caxias do sul, RS.....	52
Tabela 6-	Distribuição dos resultados dos testes sorológicos para <i>Neospora caninum</i> pela técnica de imunofluorescência indireta em cães do município de Caxias do sul, RS, segundo o título de anticorpos.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Percentual
°C	Graus Celsius
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
BID	A cada 12 horas
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
HIV	Human Immunodeficiency Virus
SNC	Sistema Nervoso Central
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

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Histórico.....	15
2.2 Sistemática.....	17
2.3 Morfologia.....	17
2.4 Biologia do <i>Neospora caninum</i>.....	19
2.5 Neosporose em cães.....	21
2.6 Epidemiologia e soroprevalência em caninos	22
2.7 <i>Neospora caninum</i> em bovinos.....	26
2.8 Potencial Zoonótico.....	28
2.9 Diagnóstico de <i>Neospora caninum</i>.....	29
2.9.1 Diagnóstico Direto.....	30
2.9.1.1 Técnicas Histopatológicas.....	30
2.9.1.2 Técnicas de PCR.....	31
2.9.1.3 Isolamento <i>In vitro</i>.....	31
2.9.2 Diagnóstico Indireto.....	31
2.9.2.1 Reação de Imunofluorescência Indireta.....	32
2.9.2.2 Ensaio Imunoenzimático.....	33
2.9.2.3 <i>Neospora</i> Agglutination Test.....	34
2.10 Medidas de controle e profilaxia.....	34
3. Objetivos.....	37
3.1 Objetivo geral.....	37
3.2 Objetivo específico.....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	38

4.1 Área de estudo.....	38
4.2 Amostras.....	39
4.3 Questionário Epidemiológico.....	40
4.4 Análise Laboratorial.....	41
4.4.1 Antígeno de <i>Neospora caninum</i>.....	41
4.4.2 Reação de Imunofluorescência Indireta.....	41
4.4.3 Análise Estatística.....	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÃO.....	58
7. PERSPECTIVAS.....	59
REFERÊNCIAS.....	60
ANEXOS.....	73

INTRODUÇÃO

O *Neospora caninum* é um protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, família Sarcocystidae e gênero *Neospora* que causa infecções associadas a abortos e mortalidade neonatal em várias espécies animais (DUBEY e LINDSAY 1996).

Foi primeiramente descrito na Noruega como agente de doença neuromuscular em cães que apresentavam paralisia associada à presença de cistos no cérebro e no tecido muscular (BJERKAS *et al*, 1984).

No Brasil, o primeiro caso de neosporose foi descrito em um feto bovino abortado na região de Botucatu (GONDIM *et al*, 1999). Já em cães, o primeiro isolado de *N. caninum* foi descrito na Bahia em um cão da raça Collie, que apresentava incoordenação e paralisia dos membros posteriores (GONDIM, *et al* 2001). Posterior a isso anticorpos para *N. caninum* foram relatados por vários outros autores em vários estados brasileiros.

Em cães os valores de ocorrência variam de 4,3% a 58,9% (GENNARI *et al.*, 2004). Segundo Gennari *et al.*, (2004) relatam que, as ocorrências de cães soropositivos para *N.caninum*, no Brasil, variam muito de região para região em função dos diferentes ambientes em que os cães habitam.

O *N. caninum* já foi identificado em tecidos de cães, os quais são classificados como os hospedeiros definitivos e intermediários (DUBEY *et al.*, 1998), assim como em tecidos de vários hospedeiros intermediários como ovinos (DUBEY *et al.*, 1990), bovinos (ANDERSON *et al.*, 1991; DIJKSTRA *et al.*, 2002), suínos (HELMICK *et al.*, 2002; ROMANELLI *et al.*, 2007), caprinos

(BARR *et al.*, 1993), cervídeos (DUBEY *et al.*, 1996; VIANNA *et al.*, 2005) em equinos (DUBEY *et al.*, 1999) e de bubalinos (RODRIGUES *et al.*, 2004).

Em galinhas, *N. caninum* já foi identificado por métodos moleculares (COSTA *et al.*, 2008) e em felinos domésticos foram detectados anticorpos para *N. caninum* (DUBEY *et al.*, 2002; BRESCIANI *et al.*, 2007).

Em animais silvestres, anticorpos para *N. caninum* já foram encontrados em alpacas (*Vicugna pacos*), lhamas (*Lama glama*), camelos (HILAI *et al.*, 1998), gambás (YAI *et al.*, 2003), capivaras (YAI *et al.*, 2008), raposas (BUXTON *et al.*, 1997), coiotes (GONDIM *et al.*, 2004). Recentemente na Austrália (KING *et al.*, 2010) verificou-se que o cão australiano dingo (*Canis lupus dingo*) também é hospedeiro definitivo de *N. caninum*. É desconhecido se outros atuam como hospedeiros definitivos embora as espécies lobo-guará, graxaim-do-campo e cachorro-do-mato tenham apresentado sorologia positiva (VITALIANO *et al.*, 2004, CÂNON-FRANCO *et al.*, 2004).

O ciclo enteroepitelial de *N. caninum* no intestino dos hospedeiros definitivos, ainda não foi completamente elucidado. Os oocistos excretados, que são a forma de resistência no ambiente pelo hospedeiro definitivo, esporulam entre 24 e 72 horas, dependendo de condições como temperatura, oxigenação e umidade. Os cães eliminam os oocistos ao redor do quinto dia após a ingestão de tecidos de animais naturalmente ou experimentalmente infectados (GONDIM *et al.*, 2002).

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

os fatores de risco, dentre os quais, a ocorrência do parasito em cães de áreas rurais e urbanas.

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

Apesar de anticorpos para *N. caninum* já terem sido reportados em humanos (LOBATO *et al.*, 2006), o parasito ainda não foi demonstrado em tecidos, portanto seu potencial zoonótico ainda é incerto.

No Rio Grande do sul, embora tenha sido confirmada a ocorrência do *N. caninum* existem poucos trabalhos a respeito. A sorologia varia de 5,5% a 13,84% para cães urbanos e 14,1% para cães de área rural e 17,10% em cães errantes sendo que na região serrana do estado ainda não se tem dados (CUNHA FILHO *et al.*, 2008, TEIXEIRA *et al.*, 2010). Demonstrando uma necessidade de se continuar pesquisando o *Neospora caninum*, para se determinar sua cadeia epidemiológica e vir a esclarecer dúvidas sobre este protozoário.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

A espécie *N. caninum*, foi descrita pela primeira vez como *Toxoplasma like* em cães com encefalomielite severa e sem anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em 1984 [Bjerkas, Mohn e Presthus (1984), citados por Dubey e colegas (2002)]. Assim, este parasito foi confundido com o *Toxoplasma gondii* até 1988, quando Dubey, Carpenter, Speer, Topper e Uggla, isolaram e caracterizaram o parasito, atribuindo-lhe o nome de *Neospora caninum*. O seu estudo baseou-se na análise de cortes histológicos de 23 cães cujo diagnóstico inicial foi Toxoplasmose. Como resultado *Toxoplasma gondii* foi identificado em 13 destes animais e *Neospora caninum* em dez, devido às diferenças morfológicas encontradas na microscopia óptica e eletrônica.

O parasito se tornou importante quando se descobriu sua relação com doenças neurológicas em cães e com abortamentos em bovinos (DUBEY et al., 1999; DUBEY e LINDSAY, 1993) . Ocasionalmente, também pode causar aborto em caprinos, ovinos, veados, rinocerontes, lhamas e alpacas (DUBEY, BUXTON & WOUDA, 2006). Os coiotes também foram confirmados como hospedeiros definitivos, eliminando oocistos em suas fezes (GONDIM et al., 2004), e recentemente na Austrália, verificaram que o cão australiano dingo (*Canis lupus dingo*) também é hospedeiro definitivo do *N. caninum* (KING et al., 2010).

A neosporose foi diagnosticada em cavalos adultos com sinais clínicos semelhantes aos da mieloencefalomielite protozoária equina, MEP (DUBEY et al., 2001). O parasito foi isolado de cérebro e medula espinhal. Esta nova

espécie foi denominada de *N. hughesi*, devido às diferenças estruturais e moleculares em relação ao *N. caninum*. As cepas de *N. hughesi* foram isoladas somente nos Estados Unidos, de equinos adultos com MEP (CHEADLE *et al.*, 1999; DUBEY *et al.*, 2001). Os sinais clínicos em equinos são cegueira, perda de peso, paralisia dos membros posteriores, comportamento bizarro, dificuldade de mastigação, incoordenação, ataxia e aborto (DALF *et al.*, 1996; MARSH *et al.*, 1996; WALSH *et al.*, 2000).

No Brasil, existem relatos de mieloencefalite equina (BARROS *et al.*, 1986; MARSI *et al.*, 1992). No Paraná, a soroprevalência observada foi de 30 a 47% para *Neospora sp.* em éguas e 22,2% em potros pré-colostrais (LOCATELLI-DITRICH *et al.*, 2006).

Diferentes estudos sorológicos permitiram concluir que muitos animais domésticos, silvestres e de zoológicos foram expostos ao protozoário (DUBEY *et al.*, 2007) e vários investigam a importância de sua ocorrência. Em seres humanos, foram detectados baixos níveis de anticorpos nestes, indicando apenas exposição ao agente (TRAMAS *et al.*, 1999).

Muitas pesquisas hoje em dia tem-se voltado para compreender a epidemiologia do parasito. Até o momento há mais informações sobre a transmissão vertical em bovinos do que em cães, desconhecendo-se ainda se nos cães *N. caninum* atua de forma similar. Para isso mais estudos são imprescindíveis para uma melhor compreensão sobre o comportamento deste agente na transmissão vertical quanto horizontal dos cães.

2.2 Sistemática

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

Reino- Protozoa

Filo- Apicomplexa

Classe- Sporozoasida

Sub-classe- Coccidiasina

Ordem- Eucoccodiorina

Sub-ordem- Eimeriorina

Família- Sarcocystidae

Sub-família- Toxoplasmatinae

Gênero- *Neospora*

Espécie- *Neospora caninum*

2.3 Morfologia

N. caninum apresenta as três formas evolutivas características da família Sarcocystidae: taquizoíto, bradizoíto e esporozoíto.

Os taquizoítos, tem formato semi-lunar e podem medir cerca de 6x2µm, e se caracterizam por apresentarem multiplicação rápida. Apresentam várias estruturas no seu interior localizadas na porção apical, que desempenham funções de secreções de enzimas, fixação com adesão aos receptores de superfície e sustentação. Os taquizoítos podem ser encontrados em várias

partes do organismo hospedeiro, como em células nervosas, macrófagos, células endoteliais vasculares, miócitos, células epiteliais tubulares renais, hepatócitos, coração, pulmão, rins e placenta (DUBEY, 1999b). Sabe-se hoje que se encontram no citoplasma da célula hospedeira, no interior de um vacúolo parasitóforo (este não foi visualizado por Dubey e co-autores em 1988) e que cada taquizoíto pode conter 6 a 16 róptrias. Os taquizoítos contêm a maioria das organelas encontrados nos merozoítos dos coccídeos, embora os seus microporos não sejam facilmente detectáveis (DUBEY *et al.*, 2002). Os taquizoítos apresentam um núcleo central e poucos grânulos de amilopectina, contrariamente aos bradizoítos. Estas formas infectantes são a forma de replicação rápida do parasito (DUBEY *et al.*, 2006).

Os bradizoítos que são a forma de multiplicação lenta do parasito podem medir cerca de 6,5 x 1,5 µm, apresentam uma forma alongada (Dubey *et al.*, 2004), um núcleo subterminal e 6-12 róptrias (DUBEY *et al.*, 2002), assim como alguns grânulos de amilopectina que se coram de vermelho pela Reação de Ácido Periódico de Schiff (DUBEY *et al.*, 2006). Usando microscopia fluorescente, os bradizoítos podem ser diferenciados dos taquizoítos através de análises imunohistoquímicas (PETERS *et al.*, 2001).

Cerca de 20 a 100 bradizoítos (SPEER *et al.*, 1999) ficam inclusos em cistos teciduais que podem chegar a 107 µm de diâmetro (DUBEY AND LINDSAY, 1996), geralmente encontrados no tecido nervoso dos hospedeiros intermediários e muito raramente no tecido muscular (PETERS *et al.*, 2001). Sua parede é lisa, medindo 1 a 4µm de espessura e não sendo observados septos nem paredes císticas secundárias (DUBEY *et al.*, 2002; SPEER *et al.*, 1999).

Os esporozoítos são alongados, apresentando uma dimensão de 6,5 x 2,0 µm (DUBEY *et al.*, 2002). Eles desenvolvem-se dentro dos oocistos durante o processo de esporulação. Os oocistos são esféricos e medem cerca de 10-11µm de diâmetro. Cada oocisto contém dois esporocistos, com dimensões médias correspondentes a 8,4 x 6,1 µm, cada um destes com quatro esporozoítos. Na microscopia ótica os oocistos são morfologicamente indistintos dos parasitos *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* e *Hammondia hammondi*, sendo o primeiro de ocorrência em cães e demais em felinos (DUBEY, 2004).

2.4 Biologia de *Neospora caninum*

Neospora caninum é um protozoário de que apresenta ciclo de vida heteroxeno, onde uma grande variedade de espécies animais podem ser consideradas como hospedeiros intermediários entre elas bovinos, ovinos, caprinos, cães e outros mamíferos. Dentre os hospedeiros intermediários os bovinos são considerados os mais importantes devido ao seu grande impacto econômico por causar perdas relativas aos abortos, reposição de animais positivos, queda da produção de leite, gastos com diagnóstico entre outros (HERNANDEZ *et al.* 2001, BARR *et al.*, 1997).

Os cães atuam tanto como hospedeiros definitivos quanto intermediários para *N. caninum* (McALLISTER *et al.*, 1998; DUBEY *et al.*, 2002). Os coiotes, apesar de também serem hospedeiros definitivos do *N. caninum* são considerados hospedeiros ineficientes pelo fato de eliminarem baixos níveis de oocistos após infecção experimental (GONDIM , 2004).

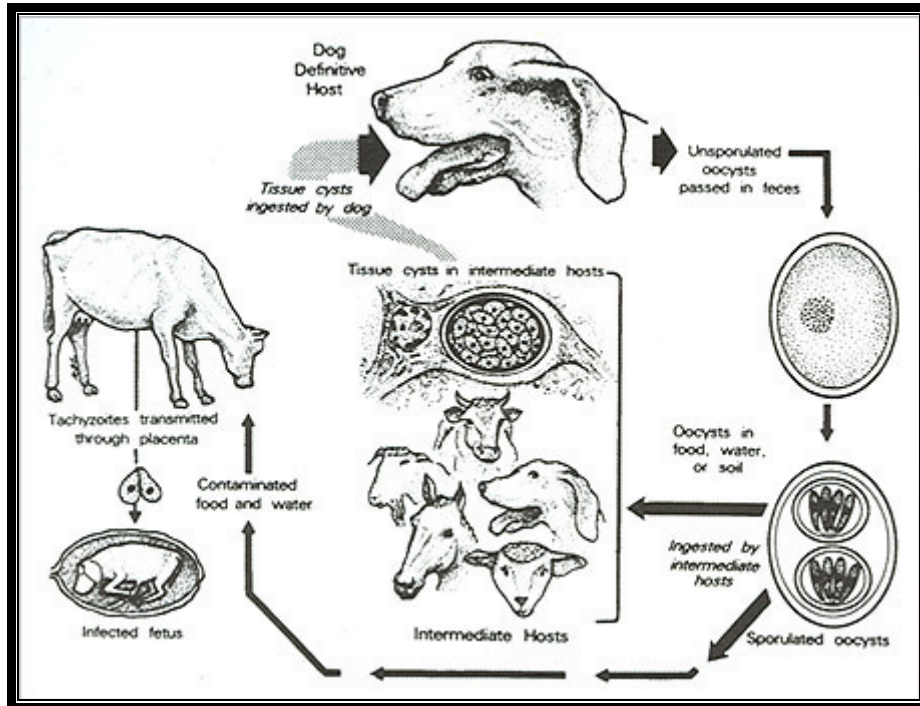


Figura 01. Ciclo de vida do *N. caninum* evidenciando as diferentes formas de transmissão. Fonte: Dubey 1999.

Sabe-se pouco acerca da frequência com que os cães excretam oocistos e da sua viabilidade no ambiente (DUBEY *et al*, 2006), no entanto, uma vez que este parasito é bastante semelhante a *T. gondii*, acredita-se que suas resistências no ambiente sejam parecidas (DUBEY, SCHARES & ORTEGA-MORA, 2007).

Os oocistos excretados esporulam no ambiente entre 24 e 72 horas, dependendo das condições de temperatura, oxigenação e umidade. Os cães eliminam os oocistos próximo ao quinto dia após a ingestão de tecidos de animais naturalmente ou experimentalmente infectados (GONDIM *et al.*, 2002).

O total de dias que eles permanecem eliminando varia de cinco a trinta dias dependendo de fatores como idade do animal e quantidade de cistos ingeridos (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA *et al*, 2007).

A transmissão horizontal é de grande importância, pois se estima que um único hospedeiro definitivo seja capaz de eliminar, aproximadamente, 500.000 oocistos após a ingestão de uma única carcaça contaminada, o que seria suficiente para infectar milhares de animais (GONDIM *et al.*, 2002).

2.5 Neosporose em cães

A neosporose canina foi primeiramente descrita na Noruega como doença neuromuscular em cães que apresentavam quadro clínico de paralisia associado à presença de cistos no cérebro e tecido muscular (BJERKAS *et al.*, 1984). O primeiro isolamento de *N. caninum* em cães no Brasil foi realizado na Bahia em um animal da raça Collie, macho, com sete anos de idade e que apresentava sinais neurológicos (GONDIM *et al.*, 2001)

O *N. caninum* apresenta sintomatologia de infecção persistente, que pode reaparecer na fêmea durante a prenhez, resultando em uma parasitemia materna e infecção do útero grávido, de onde passa prontamente para a placenta e para o feto. Assim, a idade e conseqüentemente a maturidade imunológica do feto podem influenciar significativamente no resultado da infecção (BUXTON *et al.*, 2002).

Os sinais neuromusculares variam em função da localização da lesão. Pneumonia, miocardite, hepatite, necrose muscular e encefalomielite são as principais lesões observadas em neonatos. Há relatos esporádicos de infecção ocular, úlcera na mucosa oral e dermatite ulcerativa (LORENZO *et al.*, 2002).

No SNC, ocorrem meningoencefalite não-supurada e multifocal. O número de organismos no SNC não está relacionado com a idade do cão ou com o efeito do tratamento. Também não há uma relação clara entre o número

de organismos e a intensidade dos sinais clínicos. A variação do número e da distribuição do parasito reflete-se nas diferenças de resposta imunológica e nas rotas de infecção. Acredita-se que a disseminação dos taquizoítos nos órgãos viscerais ocorra na fase aguda da infecção e que mais tardiamente, os organismos se restrinjam aos sistemas nervoso e muscular (CANTILE *et al.*, 2002).

A neosporose em cães pode ser fatal, em qualquer faixa etária, mas possui uma tendência a ser mais grave em filhotes infectados congenitamente, que geralmente se apresentam conscientes e com paralisia ascendente progressiva. Nestas condições, os filhotes podem sobreviver meses ou apresentar evolução rápida com acometimento da medula espinhal cervical e disfagia seguida de morte. Manifestações como acometimento multifocal do SNC, polimiosite e infecção disseminada ocorrem principalmente em cães adultos (CANTILE *et al.*, 2002).

2.6 Epidemiologia e soroprevalência em caninos

Várias espécies de animais já foram descritas como hospedeiros intermediários de *Neospora caninum*. Estudos sorológicos foram realizados pelo mundo em diferentes espécies não-domésticas, tanto carnívoras quanto herbívoras, sendo que muitas apresentam positividade para *N. caninum*. Na América do sul, evidências de exposição a *N. caninum* foram mencionados em bovinos, cabras, ovelhas canídeos, gatos, gambás (*Didelphis marsupialis*), búfalos, alpacas, lhamas (MOORE, 2005) e Cervídeos (WOODS *et al* 1994).

Dentre os canídeos, pesquisas demonstram soropositividade para *N. caninum* em coiotes (*Canis latrans*) (LINDSAY *et al.*, 1996), raposa-vermelha

(*Vulpes vulpes*) (ALMERIA *et al.*, 2002) e raposa-cinzenta (*Urocyon cinereoargenteus*) (LINDSAY , WESTON, LITTLE, 2001). No Brasil poucos estudos sorológicos foram realizados em canídeos selvagens. Dentre as espécies brasileiras testadas, encontram-se resultados positivos para lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (VITALIANO *et al.*, 2004), graxaim-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*) e o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) (CÂNON-FRANCO *et al.*, 2004).

A participação do cão na epidemiologia da neosporose foi demonstrada experimentalmente por McALLISTER *et al.*, (1998), atuando como hospedeiro definitivo, quando pela primeira vez foi observada a eliminação de oocistos de *N. caninum* em suas fezes. Neste experimento, os autores alimentaram cães com camundongos contendo cistos teciduais. Os cães por sua vez eliminaram os oocistos que posteriormente foram inoculados em outros camundongos, observando-se a presença de taquizoítos em vários órgãos e tecidos de um animal inoculado. Como métodos de diagnóstico foram realizados histopatologia, imunohistoquímica e PCR sendo possível então, fazer a identificação do parasito.

Vários pesquisadores vem estudando alguns fatores de risco na epidemiologia do *N.caninum* como ambiente no qual o animal vive (urbano ou rural) o tipo de alimentação, a idade e outros fatores.

Vários estudos investigando a influência do ambiente na soroprevalência de *N. caninum* em alguns países e no Brasil são apresentados nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela.1- Ocorrência de anticorpos contra *Neospora caninum* em cães de diversos países segundo a origem dos animais.

Local:	Amostragem/origem dos cães:	Técnica/Ponto de Corte:	Frequência:	Autor/Ano:
Chile	201 (urbanos e rurais)	IFA (1:50)	Urbanos 12,5% Rurais 26%	Patitucci <i>et al.</i> , 2001
Itália	707 (domiciliados e canil)	Elisa	10,9%	Capelli <i>et al.</i> , 2004
Áustria	1770 (urbanos e rurais)	IFI (1:50)	Urbanos 2,1% Rurais 5,3%	Wanha <i>et al.</i> , 2005
Polônia	257 (clínicas veterinárias)	ELISA <i>Western blot</i>	21,7%	Go'zdik <i>et al.</i> , 2011

Tabela 2- Soroprevalência de anticorpos (reação de imunofluorescência indireta) para *Neospora caninum* em cães no Brasil, segundo a origem dos animais.

Estado	Cães de áreas urbanas e domiciliados	Cães errantes	Cães de áreas rurais	Referência
Minas Gerais	45%			Benetti <i>et al.</i> , 2008.
Paraná	12,71%	15,73% (Peri-urbano)	25,38%	Fridlund-Plugge <i>et al.</i> , 2008.
Rio Grande do Sul	5,5%		20,4%	Cunha Filho <i>et al.</i> , 2008.
São Paulo	25,8%	33,3% (Peri - urbano)	16,9%	Moraes <i>et al.</i> , 2008.
Bahia	9,3%	21,9%		Magalhães <i>et al.</i> , 2009.
Minas Gerais	3,1%			Guimarães <i>et al.</i> , 2009.
São Paulo		14%		Greca <i>et al.</i> , 2010.
São Paulo	0,7%			Gonzalez <i>et al.</i> , 2010.
Rio Grande do Sul	15,8%	17,1%		Teixeira <i>et al.</i> , 2010.
Minas Gerais		4,5%		Ribeiro <i>et al.</i> , 2011.
Pará	14%		11,11%	Valadas <i>et al.</i> , 2011
Santa Catarina	12,3%			Moura <i>et al.</i> , 2011.

Alguns estudos revelaram associação de soroprevalência ao fator idade como em Campo Grande, MS onde encontrou-se 31,38% de cães adultos e 10,52% de cães jovens soropositivos para *N. caninum* (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Em Lages e Camboriú, SC, verificou-se que 83,7% dos cães soropositivos tinham mais de 13 meses de idade (MOURA *et al.* 2011).

2.7 *Neospora caninum* em bovinos

Thilsted e Dubey, (1989) descrevem o *N. caninum* como um importante agente etiológico de aborto em bovinos em grande parte do mundo.

No Brasil, o *N. caninum* foi diagnosticado em fetos abortados a partir de 1999 e em levantamentos sorológicos de bovinos e cães de diferentes estados, além de outras espécies domésticas e silvestres (GENNARI, 2004).

Existem evidências da transmissão transplacentária de *N. caninum* em bovinos de leite, sugerindo que infecções por *N. caninum* podem persistir dentro de uma propriedade leiteira (ANDERSON *et al.*, 1997).

Existem vários relatos da ocorrência de anticorpos *anti-N.caninum* no Brasil, com valores que variam de 7,7% (ANDREOTTI *et al.*, 1999) e 67,85% (BELO *et al.*, 1999).

Segundo Ragozo *et al.*, (2003) em bovinos a frequência de soropositivos em seis estados brasileiros variou de 28,2% no Mato Grosso do Sul, 29% em Minas Gerais, 22,2% no Paraná, 14,7% no Rio de Janeiro, 20% no Rio Grande do Sul e 23,6% em São Paulo.

A grande importância econômica do *N. caninum* em bovinos deve-se principalmente aos custos associados ao aborto, valor dos fetos, diminuição da produção de leite, aumento do descarte, reposição de animais, dentre outros (ANDREOTTI *et al.*, 2005).

Além dos custos associados diretamente com o aborto, contabilizam-se custos indiretos associados à assistência veterinária, ao diagnóstico, a necessidade de realizar novas inseminações ou montas, à possível diminuição da produção leiteira e ao custo das novilhas de substituição, necessárias quando são identificados os animais soropositivos. O custo do aborto é variável dependendo da idade e da genética da fêmea, como também da capacidade produtiva e da sua descendência. Economicamente, a perda mais importante da neosporose encontra-se associada ao refugo dos animais soropositivos (DUBEY *et al.*, 2007).

A via venérea parece ser pouco provável. Apesar de que em 2005, Ferre e colegas demonstraram a presença de DNA do parasito no sêmen e no sangue de machos naturalmente infectados.

Mcallister (1998) e Dijkstra (2001) relatam que as vias de infecção do *N. caninum* são a vertical (ou congênita) e a horizontal, com a ingestão de oocistos esporulados ou de cistos teciduais por carnívoros. A principal via de infecção em bovinos é a vertical, pois contribui para a persistência da infecção no rebanho (ANDERSON *et al.*, 2000; INNES, 2007). Além disso, existem evidências de que a placenta dos bovinos naturalmente infectados também podem ser uma fonte de infecção para os cães (DUBEY *et al.*, 2006).

A transmissão transplacentária pode ser avaliada pela comparação da soroprevalência entre as vacas e a sua descendência (FRÖSSLING, UGGLA, BJÖRKMAN, 2005).

Segundo Innes *et al.*, (2007), os bovinos e os cães de várias regiões geográficas já foram expostos ao parasito e a neosporose se apresenta de ampla distribuição mundial. No Brasil, *Neospora caninum* foi isolado de cão (GONDIM *et al.*, 2001), de feto bovino e de bezerro com cegueira congênita (LOCATELLI-DITRICH *et al.*, 2003; 2004) e de búfalos (RODRIGUES *et al.*, 2004). Corbellini *et al.* (2002) encontraram uma prevalência em torno de 10% de anticorpos para *N.caninum* em bovinos de propriedades do Rio Grande do Sul, não havendo correlação desses resultados com a presença de cães residentes nas propriedades estudadas e sim com a frequência de cães errantes ou silvestres nas referidas propriedades.

2.8 Potencial zoonótico

Ainda se desconhece o potencial zoonótico desta parasitose, o primeiro relato de *Neospora caninum* em seres humanos foi um estudo epidemiológico no qual se observou um índice de 6,7% de pessoas soropositivas para *N. caninum* numa população de 172 pessoas soropositivas para *T. gondii* (NAM *et al.*, 1998). Em pesquisa semelhante realizada em 1.029 doadores de sangue, foi detectada a presença de anticorpos para *N. caninum* em 6,7% das pessoas, das quais 72% eram negativas para *T. gondii* (TRAMAS *et al.*, 1999).

No Brasil, são raros os trabalhos em humanos publicados até o momento. Apesar de duas pequenas populações de trabalhadores rurais (n=14; n=24) no estado de São Paulo serem soronegativas para *N. caninum*

(SOUZA *et al*, 2001; CASSOL *et al*, 2005), 3,8% dos doadores de sangue (n=80) e 15% das pessoas portadoras do vírus HIV (n=80) apresentaram anticorpos específicos no estado da Bahia (FRANKLIN, B. M., 2002). No Rio Grande do Sul, NUNES *et al.*, (2012) encontraram diferença estatística significativa ($p=0,0008$) entre a soroprevalência em pacientes aidéticos (29,7%, n=310), pacientes não aidéticos (16,9%, n=248) e doadores de sangue (18%, n=50).

Lobato *et al.* (2006) detectaram anticorpos IgG contra *N. caninum* em 38% de pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (SIDA), 18% em pacientes com sinais neurológicos e 6% em pessoas saudáveis em Uberlândia, Minas Gerais. Benetti *et al.* (2009) encontraram soroprevalência de 10,5% em trabalhadores rurais residentes na região sudoeste do estado de Mato Grosso, Brasil.

2.9 Diagnóstico de *N. caninum*

As técnicas diagnósticas precisas para a detecção de animais infectados com *N. caninum* são a chave para o entendimento dos aspectos epidemiológicos da neosporose. O diagnóstico da neosporose pode ser realizado por detecção parasitológica pós-morte, por histopatologia, imunohistoquímica ou por detecção de anticorpos específicos (HEMPHILL *et al.*, 2000).

As infecções por *N. caninum* e *T.gondii* em cães são muito semelhantes sob o ponto de vista clínico e anatomopatológico requerendo o uso de técnicas microscópicas e/ou imunológicas para obtenção do diagnóstico diferencial (RUEHLMANN *et al.*, 1995). Além disso, a eliminação do oocisto não é

constante e diferenciação de oocistos de *Hammondia sp.* requerem provas biológicas como a inoculação em gerbil (*Meriones unguiculatus*) (FARIAS *et al.*, 2002).

2.9.1 Diagnóstico direto

2.9.1.1 –Técnicas histopatológicas

O diagnóstico definitivo de *N. caninum* está baseado em lesões histológicas produzidas nos tecidos parasitados. As lesões mais características são múltiplos focos de infiltrado mononucleares e células da glia ao redor de um foco central de necrose (DUBEY e LINDSAY, 1996).

Lesões de neosporose são encontradas em vários órgãos, sendo o cérebro o órgão mais consistentemente afetado. As lesões também estão presentes na placenta, porém o parasito é difícil de ser encontrado nesse tecido (BARR *et al.* 1991). As lesões histológicas encontradas são caracterizadas por infiltrados de células inflamatórias, compostos basicamente por mononucleares, e podem ser encontradas em todos os órgãos dos fetos abortados, principalmente no SNC, coração, fígado e músculo esquelético (DUBEY & LINDSAY, 1996). As lesões produzidas no cérebro consistem de encefalite não supurativa, caracterizada por múltiplos focos de infiltrado inflamatórios mononucleares e células da glia, geralmente ao redor de um centro de necrose (DUBEY & LINDSAY, 1996).

A identificação do protozoário pode ser realizada pela técnica de imunohistoquímica onde se permite evidenciar o agente nos tecidos, utilizando soro policlonal ou anticorpo monoclonal *anti-Neospora* (LINDSAY e DUBEY, 1989).

2.9.1.2 Técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

As técnicas de PCR possuem como sequência alvo a região ITS1 do DNA ribossômico e a sequência Nc5 do DNA genômico de *N. caninum*. Sendo de grande utilidade no diagnóstico da doença, pois permitem amplificar pequenas quantidades de DNA até em tecidos que já se encontram em autólise (COLLANTES-FERNÁNDES *et al.*, 2002). Porém ainda são pouco utilizadas na rotina devido ao seu alto custo.

2.9.1.3 Isolamento *In Vitro*

O *Neospora caninum* foi primeiramente cultivado *in vitro* em monócitos e células endoteliais de artéria cardiopulmonar de bovinos. Desde então é cultivado em rim bovino, fibroblasto humano, em cérebro de feto de rato, células Vero (células de rim de macaco verde africano) e em várias outras linhagens estabelecidas. Alguns isolados de *N. caninum* multiplicam-se mais rapidamente que outros. Os organismos provenientes do cultivo celular são infectivos para animais (DUBEY e LINDSAY, 1996).

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

2.9.2. Diagnóstico Indireto

As provas sorológicas como a RIFI e o teste ELISA, também são utilizados no diagnóstico de neosporose subclínica que indicam a exposição

dos animais ao *Neospora* não significando que estejam acometidos pela doença (DUBEY e LINSAY, 1996).

2.9.2.1 RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta)

Para *Neospora caninum* o teste de RIFI é considerado como teste de referência, com os quais outros métodos são comparados (BJORKMAN e UGGLA, 1999). Assim, ele foi o primeiro teste sorológico usado para detecção de anticorpos para *N. caninum*. O teste é baseado no princípio de fixação de taquizoítas de *N. caninum* em lâminas de microscopia, que são incubadas inicialmente com soros diluídos e em uma segunda etapa, com anticorpos ligados a fluoresceína (conjugado). Esses anticorpos são direcionados contra as imunoglobulinas da espécie animal sob investigação. A reação é avaliada pela observação da reação em microscopia de fluorescência (BJORKMAN e UGGLA, 1999).

Como os taquizoítos utilizados para o antígeno nos testes de RIFI estão intactos, o teste detecta principalmente anticorpos direcionados para antígenos presentes na superfície celular do parasito.

A imunofluorescência com título maior ou igual a 1:50 , indica exposição do cão ao agente (DUBEY *et al.*, 1988). O teste de RIFI para *N. caninum* tem sido utilizado para um grande número de espécies animais, incluindo cães, raposas, felinos, bovinos, ovinos, caprinos, búfalos, eqüinos, roedores e primatas (BJORKMAN e UGGLA, 1999).

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

2.9.2.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Os testes de ELISA são aplicados para a detecção de anticorpos direcionados a uma variedade de agentes infecciosos, incluindo o *T. gondii* e *N. caninum*. O princípio do teste consiste em uma preparação de antígeno absorvida a uma superfície de plástico. Após a incubação com o soro diluído a ser analisada, uma enzima ligada a uma antiimunoglobulina espécie-específica (conjugado) é aplicada. Ao final, um substrato é adicionado e em presença do conjugado é transformado em um produto colorido. Após a ocorrência da reação enzima substrato, uma solução de parada da reação é adicionada e a absorbância é medida por um espectrofotômetro.

Pode ser problemático em função da ampliação enzimática de reações inespecíficas, comumente relacionadas com reações cruzadas com parasitos coccídeos ou com o tipo de antígeno utilizado (CAÑON-FRANCO *et al.*, 2003). O ELISA indireto contém antígenos solúveis, com uma preponderância de antígenos de superfície dos parasitos (BJORKMAN e UGGLA, 1999).

Evidências apontam que os antígenos mais específicos das espécies do filo Apicomplexa encontram-se na superfície do parasito, podendo justificar a maior especificidade do teste de RIFI para *Neospora caninum* sobre o ELISA indireto (BJORKMAN e UGGLA, 1999).

O teste mais recente que vem sendo utilizado é o ELISA de avidéz, onde se pode distinguir infecções recentes de infecções crônicas em bovinos, parecendo ser de grande importância para se diferenciar abortos epidêmicos de abortos endêmicos (DUBEY,2003).

2.9.2.3 NAT (Neospora Agglutination Test)

Este teste NAT foi aprimorado por Romand, Thulliez e Dubey (1998) para a pesquisa de anticorpos para *N. caninum* empregando, como antígeno, taquizoítos da cepa NC-1 isolado de monocamadas de fibroblastos humanos, numa concentração de 2×10^4 taquizoítos por microlitro. Este método mede a aglutinação de taquizoítos na presença de anticorpos específicos presentes no soro, eliminando a utilização de anticorpos secundários empregados nos testes anteriores.

Neste teste foi observada uma especificidade e sensibilidade semelhantes às da RIFI (BJORKMAN e UGGLA, 1999).

2.10 Medidas de Controle e Profilaxia

A adoção de medidas preventivas e efetivas de controle são essenciais para a diminuição dos riscos em relação ao protozoário *N. caninum*.

Em relação à bovinocultura, não existem dados concretos sobre as perdas econômicas, mas são estimados em milhões de dólares (DUBEY, 2003). Por isso as estratégias de controle devem sempre levar em consideração a prevalência da infecção no rebanho entre outros fatores como tamanho do rebanho para se adotar as medidas adequadas.

Em relação aos cães das propriedades devem-se programar medidas de controle para que se evitem a contaminação de bovinos pelos oocistos, reduzindo-se a possibilidade de contato dos bovinos com as fezes de cães infectados. Assim como também é muito importante realizar o manejo adequado de tecidos infectados por *N. caninum* para que os cães não entrem em contato com estes. Diminuir o número de cães que tenham acesso ao

rebanho, proteger locais de armazenamento de alimento e água e remoção de fezes de cães de locais como os cochos e bebedouros (ANDREOTTI *et al.*, 2005).

Os fatores de risco de infecção para bovinos são vários dentre eles podemos citar a idade dos animais que pode ser explicado pelo fato de que, quanto mais vivem, mais oportunidades de infecção existem; assim como pelas diferenças nas taxas de substituição dos animais (BARTELS *et al.*, 2006). Outro fator é a presença de hospedeiros definitivos que estão positivamente relacionados com o risco de infecção (VANLEEUEWEN *et al.*, 2010). Gondim, Mc Allister & Gao em (2005) demonstraram em um estudo que cães mais novos excretam uma maior quantidade de oocistos comparativamente aos cães mais velhos. Acrescentando que os cães presentes nas imediações da exploração também podem representar um fator de risco de infecção (DUBEY *et al.*, 2007). Segundo Benetti *et al.*(2009) no Mato Grosso ao avaliarem anticorpos para *N. caninum* em 67 humanos de 24 propriedades de bovinos de leite, verificaram soropositividade em 7 pessoas (10,5%).

A presença de outros carnívoros como os felinos e pelo fato de serem predadores de animais como os roedores, por exemplo, que podem funcionar como hospedeiros intermediários ajudam na redução da frequência de oportunidade para a infecção dos hospedeiros definitivos (DUBEY *et al.*, 2007).

A presença de outros hospedeiros intermediários, além dos bovinos, pode representar uma fonte de infecção para os hospedeiros definitivos (DUBEY *et al.*, 2007).

O pasto, forragem e água de bebida quando contaminados com oocistos, funcionam como fonte de infecção pós-natal (DUBEY *et al.*, 2007).

O aumento da densidade animal correlaciona-se positivamente com a prevalência da infecção (BARLING *et al*, 2001). O risco individual de soropositividade é considerado maior nas propriedades com explorações onde há maior número de animais, pois nestas o risco aumenta porque normalmente, estas propriedades possuem maior quantidade de cães (OTRANTO *et al.*, 2003).

Quanto ao clima, presume-se que em altas temperaturas ambientais favoreçam a esporulação e conseqüentemente aumentem o risco de infecção (DUBEY *et al.*, 2007). A densidade populacional humana parece ter um efeito positivo em relação ao número de cães das propriedades (DUBEY *et al.*, 2007). Existem outros fatores como o alojamento, raça dos bovinos, índice da vegetação e presença de anticorpos contra agentes de infecção possam sofrer influência no risco de infecção.

O tratamento em bovinos é ineficaz, mas em cães com sinais neurológicos apesar de o prognóstico ser reservado a desfavorável o tratamento é longo. Os mais utilizados como tratamento em cães são clindamicina (11-22mg/kg, BID-TID), sulfonamidas (15mg/kg, BID) e pirimetamina (1mg/kg, SID) (BARBER, 1998). Contudo, o grau de sucesso desses tratamentos é usualmente baixo, embora haja relato de resolução completa dos sintomas de neosporose em cão adulto com a administração combinada de 1mg/kg/dia de pirimetamina e 20mg/kg/dia de sulfadoxina durante um mês (THATE, F.M., *et al* 1998).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Contribuir para o conhecimento da epidemiologia de *N. caninum* no estado do Rio Grande do Sul,

3.2 Objetivo específico

- Através da técnica sorológica de imunofluorescência indireta pretende-se:
- Avaliar a prevalência de *Neospora caninum* em cães de área urbana do município de Caxias do sul, RS.
- Avaliar a prevalência de *Neospora caninum* em cães de área rural do município de Caxias do sul, RS.
- Correlacionar a prevalência de anticorpos com as variáveis: alimentação, idade, origem dos animais.
- Verificar fatores de risco para a infecção de cães com *N. caninum*, no município de Caxias do Sul, RS.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

O município de Caxias do Sul, está localizado na encosta do Nordeste do Rio Grande do sul, a 127 Km de Porto Alegre. Parte de seu território estende-se na extremidade leste da microregião vitivinícola e parte no planalto dos Campos de cima da Serra. Geograficamente está situado na longitude de 51°10'06" oeste e latitude de 29°10'05" sul.

Essa região também é conhecida como "Roteiro da Uva e do Vinho". Possui uma área total de 1.644 Km² de extensão e uma população de 435.564 habitantes. É dividida em 65 bairros e 10 distritos: Ana Rech, Criúva, Fazenda Sousa, Forqueta, Galópolis, Santa Lúcia do Piaí, São Marcos, Vila Seca, Vila Oliva e Vila Cristina (IBGE,2010).

O clima de Caxias do Sul é temperado, com verões amenos, invernos relativamente frios e geadas frequentes. Pode nevar nos meses mais frios, mas geralmente com pouca intensidade. Porém, já foram registradas precipitações abundantes, com acumulações consideráveis. A temperatura média anual do município é de 16,5°C. Os meses mais quentes são janeiro e fevereiro, com média de 21°C, enquanto os mais frios são junho e julho, com média de 12°C.

Pelo censo demográfico 2010 do IBGE, constataram que a população residente urbana de Caxias do sul, RS é de 419.406 pessoas enquanto que a população residente rural é de 16.158 pessoas.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, aplica-se a proporção de um cão para cada sete habitantes, o que representaria na cidade de Caxias do sul, uma população canina de aproximadamente 59.915 cães.

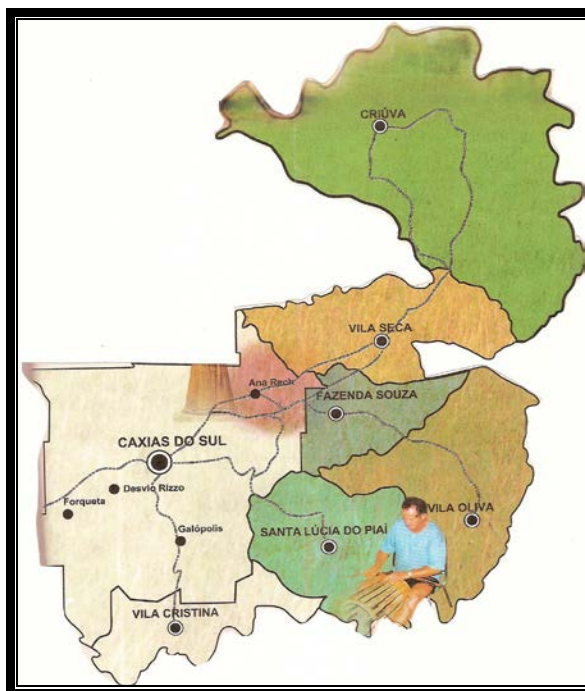


Figura 02. Mapa da região de Caxias do sul e distritos

Fonte: <http://fatnatureza.blogspot.com/2010/03/fatnaturezablogspotcom.html>

4.2 Amostras

A amostragem foi determinada de forma parcialmente randômica, de acordo com Thrusfield (2004), para uma expectativa de prevalência de 10% para cães urbanos e 15% para cães rurais com precisão absoluta de 5% e nível de confiança de 95%, totalizando uma amostragem de no mínimo 138 cães urbanos e 192 cães rurais. Desta amostragem, entretanto, foi possível coletar somente 153 amostras da área rural devido à pequena quantidade de cães por propriedade visitada. Em contrapartida, a amostragem urbana foi aumentada para 160 animais, totalizando 313 amostras.

As amostras foram coletadas na presença dos proprietários com prévia autorização após esclarecimento de dúvidas. As amostras sanguíneas foram obtidas através de venocentese da veia jugular em tubos sem EDTA, com um volume de aproximadamente 3 ml de sangue.

A contenção dos cães foi realizada com a utilização de um mordação e após realizada a colheita do sangue, sempre com do proprietário. As colheitas foram realizadas entre junho e dezembro de 2010.

Após a colheita de sangue, cada amostra foi identificada registrando-se informações sobre o ambiente, manejo e sanidade em questionário. (Anexo 1 e 2). As amostras foram mantidas congeladas a menos 20°C em tubos do tipo “ependorf”, até o momento da realização da prova sorológica.

A análise estatística foi efetuada pelo programa INSTAT.

4.3 Questionário Epidemiológico

Os animais incluídos neste estudo passaram primeiramente por uma avaliação clínica e apresentavam-se sadios. Foram aplicados dois questionários epidemiológicos distintos condizentes com os hábitos e ambiente dos cães urbanos e rurais. A aplicação deste foi realizada durante entrevista com o proprietário ou para uma pessoa responsável pelos cães.

Aos cães urbanos as perguntas foram referentes a idade, sexo, tipo de alimentação e um breve histórico clínico conforme o Anexo 1.

Já aos cães rurais, as perguntas foram referentes ao contato com bovinos, recolhimento de carcaças, manejo, ingestão de alimentos e um histórico do animal conforme Anexo 2.

4.4 Análise Laboratorial

4.4.1 Antígeno de *Neospora caninum*

Para a realização da prova sorológica utilizou-se lâminas sensibilizadas com taquizoítos de *N. caninum* (cepa NC-1), adquiridos do Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade de São Paulo. Os controles, positivo e negativo, foram utilizados do banco de soros do Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal do Rio Grande do sul.

4.4.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Os soros dos cães foram submetidos à RIFI, segundo DUBEY *et al.* (1988).

Em cada lâmina foram colocados os soros a serem testados, além dos controles positivo e negativo de origem canina. Os soros foram diluídos em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,2 estéril. O volume total colocado em cada orifício de lâmina foi de 20µl da diluição. Posteriormente, os soros eram incubados 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 um recipiente com solução tampão carbonatada de lavagem estéril com pH 9,0.

Para secagem as lâminas foram colocadas na estufa em uma temperatura de 37°C. Após este processo, foi adicionado 20µl do conjugado (IgG de coelho anti-IgG canina, marcado com isotiocianato de fluoresceína – SIGMA F-7884) na diluição de 1:128 em PBS estéril, pH7,6 contendo azul de Evans 0,01%. Novamente, as lâminas são incubadas por 30 minutos a 37°C e posteriormente lavadas como feito anteriormente, sendo que a única diferença

é que neste momento a técnica foi realizada em ambiente escuro para evitar a queima da fluoresceína. Foi realizado uma nova secagem em estufa a 37°C e se finalizou a montagem das lâminas adicionando glicerina tamponada com o pH 8,0 e lamínula.

Posteriormente a leitura foi realizada em um microscópio de epifluorescência com filtro de luz ultravioleta e lâmpada de mercúrio, objetiva de 40 vezes e ocular de 10 vezes (Olympus). As reações foram consideradas positivas quando apresentaram fluorescência periférica completa e negativas as que apresentaram reações fracas, parciais ou apicais de acordo com PARÉ, HIETALA, THURMOND (1995).

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

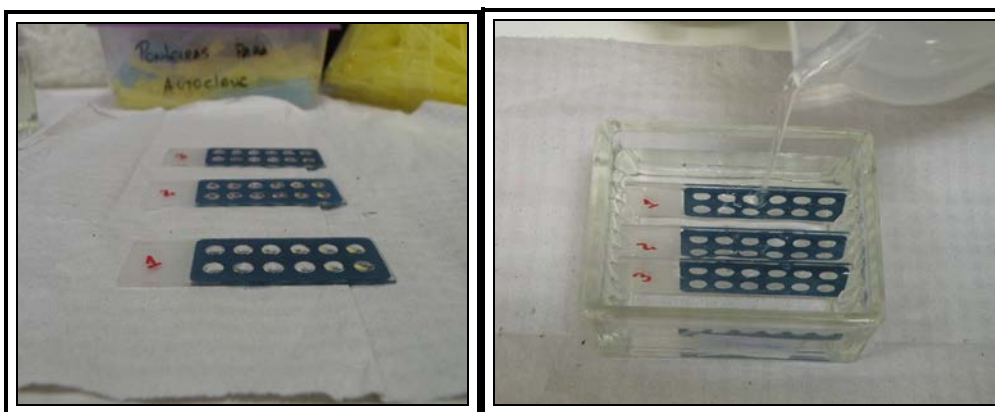


Figura 3. Lâminas sendo preparadas para posterior leitura em microscópio de epifluorescência.

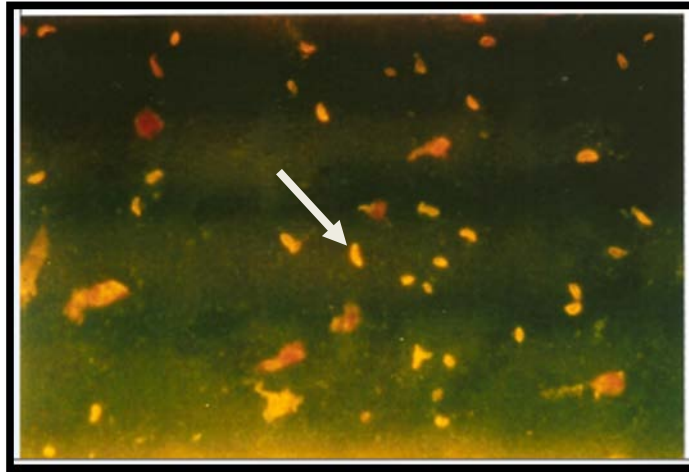


Figura 4. Reação de Imunofluorescência Indireta com resultado positivo para anticorpos contra *Neospora caninum*. Observar fluorescência periférica completa dos taquizoítos como mostra a seta. Aumento de 400x.

4.4.3 Análise Estatística

Os dados obtidos foram lançados em planilhas eletrônicas (Microsoft Excel) em formato de banco de dados para posterior análise.

As frequências de cães soropositivos para anticorpos de *Neospora caninum* foram calculadas segundo os fatores de risco, utilizando-se o Teste Exato de Fisher, através do pacote Estatístico Graphpad InStat (versão 2.04).

5. Resultados e Discussão

A partir das informações colhidas pelo questionário epidemiológico foram investigadas um total de 30 propriedades. Sendo que a média de cães rurais por propriedade foi de 5,1. Em relação à idade dos cães rurais, 22% eram de animais com menos de um ano de idade e 78% eram de mais de um ano de idade. Sobre o gênero, 34% eram fêmeas e 66% eram machos. Quanto à dieta oferecida pelos proprietários, 59% dos cães consumiam comida caseira enquanto que 42% consumiam ração comercial. Em relação ao tipo de manejo adotado, 33% dos cães possuíam vida livre enquanto que 67% ficavam temporariamente presos e o contato com bovinos foi evidenciado em 56% dos cães enquanto que 44% não apresentavam contato.

Em relação aos cães urbanos é importante informar que todas as amostras foram coletadas de animais que freqüentavam clínica veterinária, sendo que no máximo foram utilizados dois cães para cada proprietário. As amostras foram coletas por conveniência. Quanto às variáveis analisadas em relação à idade, 18% eram de cães com menos de um ano de idade e 82% de cães com mais de um ano de idade. Sobre o gênero dos cães, 63% eram fêmeas e 37% eram machos e sobre a dieta, 44% eram alimentados somente com ração comercial e 56% com dieta mista, ou seja, ração e comida caseira.

Das amostras examinadas, 13,1% (41/313) apresentaram soropositividade para *Neospora caninum*. Dos animais de origem rural, 12% (36/153) foram sororeagentes enquanto que os de origem urbana 2% (5/160) mostraram-se soropositivos como mostra a Tabela 3. Esta diferença em relação à origem dos animais foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$ e *Odds Ratio*=0,1048), demonstrando assim que na população canina a

influência da origem e a condição de sua vida são os fatores de risco para a infecção (MELO *et al.*, 2005).

Tabela 3. Ocorrência de cães soropositivos para *Neospora caninum* através da técnica de RIFI em relação à origem (urbanos e rurais) em Caxias do Sul, RS.

Origem	Positivos	Total Examinados	%
Urbanos	5	160	2%
Rurais	36	153	12%
Total	41	313	13%

($p < 0,0001$)

Cunha Filho *et al.*, (2008) em Pelotas, Rio Grande do Sul, demonstraram uma prevalência quatro vezes maior de anticorpos para *N. caninum* em cães do meio rural (20,4%) em comparação com os da área urbana (5,5%), corroborando os dados acima mencionados.

Outros estudos semelhantes avaliando a ocorrência de anticorpos em cães na área urbana e rural mostram concordância com estes resultados (PATITUCCI *et al.*, 2001; SICUPIRA *et al.*, 2011).

Uma característica muito importante observada nesse estudo, em relação às propriedades rurais se deve ao fato de que o município de Caxias do sul é localizado em uma região onde a topografia é bastante acidentada, passando a ter como economia outras atividades sem ser a bovinocultura, como o cultivo de hortifrutigranjeiros e a vitivinicultura.

Observamos também a presença de outras espécies de animais nessas propriedades como: suínos, caprinos, aves e felinos. Isso reforça a hipótese de

que no meio rural a prevalência é maior, devido ao acesso mais facilitado dos cães à carne, vísceras contaminadas, oocistos esporulados, restos de abortos e de carcaças de animais mortos, contribuindo para a infecção dos cães (DIJKSTRA *et al.*, 2002).

Em uma propriedade rural, os cães eram utilizados exclusivamente para a caça e nestes foram encontrados nove soropositivos (9/36). Sabendo-se que no caso de cães que são utilizados com essa finalidade, a alta soroprevalência pode ser atribuída aos hábitos de alimentação diferenciados e o acesso no campo a carcaças e tecidos de hospedeiros intermediários contaminados (DIJKSTRA *et al.*, 2001, 2002).

Na América do Norte onde a caça é liberada, muitas vezes, como recompensa pelo sucesso da caçada, são oferecidos pedaços de carne do animal ao cão, isso pode ser uma possível fonte de infecção em função dos cistos teciduais (ROSYPAL e LINDSAY, 2005). Patitucci *et al.*, (2001) detectaram uma maior porcentagem de animais infectados entre os cães que eram utilizados para trabalhos ou esportes em áreas rurais.

Nas amostras, provenientes de cães rurais, dados quanto às variáveis, idade, gênero, tipo de alimentação, confinamento, contato com bovinos e recolhimento das carcaças, são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Frequência de amostras de cães de origem rural soropositivas¹ para *Neospora caninum* segundo fatores de risco, no período de junho a dezembro de 2010 no município de Caxias do sul, RS.

Variáveis		Frequência percentual (positivo/n)	Estatística ²
Idade	Menos de 1 ano	1% (2/34)	p = 0,0053* Odds Ratio: 0,1563
	Mais de 1 ano	22% (34/119)	
Gênero	Fêmea	6% (9/52)	p = 0,2305 Odds Ratio: 0,5736
	Macho	18% (27/101)	
Alimentação	Comercial	8% (12/63)	p = 0,3346 Odds Ratio: 1,545
	Mista**	16% (24/90)	
Confinamento	Vida livre	9% (14/51)	p = 0,4258 Odds Ratio: 1,376
	Confinado	14% (22/102)	
Contato com bovinos	Sim	17,64% (15/85)	p = 0,0835 Odds Ratio: 0,479
	Não	30,88% (21/68)	
Recolhimento das carcaças	Recolhe	9% (14/62)	p = 0,8487 Odds Ratio: 0,9148
	Não recolhe	14% (22/91)	

1. Reação de Imunofluorescência Indireta com antiimunoglobulina G ao título 50. 2. Teste Exato de Fisher, através do pacote estatístico de Graphad Instat * significativo. ** Comida caseira e comercial.

Na população de cães rurais, em relação á variável idade, animais com menos de um ano de idade obtiveram uma positividade 1% (2/153) enquanto que os com mais de um ano de idade obtiveram 22% (34/153). Segundo a análise estatística e aplicação do Teste de Fisher essa variável foi extremamente significativa ($p > 0,005$ e *Odds Ratio* de 0,1563) para a positividade dos cães.

Na literatura, não existe ainda um consenso sobre a idade e a associação positiva para a infecção dos cães, alguns estudos demonstram não haver influência (ROMANELLI *et al.*, 2007; GOZ'DZIK *et al.*, 2011). Outros consideram o fator idade um maior risco para a infecção pelo *N. caninum* (COLLANTES-FERNÁNDEZ *et al.*, 2008; MOURA *et al.*, 2011; MORAES *et al.*, 2008). Demonstrando que a soroprevalência de anticorpos aumentam com a idade, inferindo que a maioria dos cães infecta-se após o primeiro ano de vida (GONDIM *et al.*, 2005 ; CUNHA FILHO *et al.*, 2008).

Segundo Moura *et al.*, (2011), também obtiveram uma associação positiva em relação a idade, 83,7% dos cães acima de 13 meses de idade ou mais velhos foram positivos corroborando com os dados obtidos neste trabalho.

Gondim *et al.*, (2005) ainda discute sobre a possibilidade de haver uma falha ou retardo na soroconversão em alguns casos podendo levar vários meses em alguns animais. Fato esse que reafirma a possibilidade de a positividade ser maior nos casos de cães acima de um ano de idade.

Em relação ao gênero dos animais analisados nas áreas rurais, das amostras consideradas positivas pela técnica de RIFI, 6% (9/36) foram de cães fêmeas e 18% (27/36) de machos. Pela análise estatística não houve diferença significativa em relação a esta variável.

Apesar de não ter sido relevante, os cães machos parecem ser mais propensos a adquirir infecção do que as fêmeas. Sendo uma das possibilidades ao fato de os machos possuírem uma característica de andarilhos. Na literatura vários estudos prévios, não indicam uma ocorrência preferencial da infecção a um determinado sexo (JESUS *et al.*, 2006; BENETTI *et al.*, 2008; COLLANTES-FERNÁNDEZ *et al.*, 2008; YAKHCHALI *et al.*, 2010; VALADAS *et al.*, 2010).

Analisando a variável alimentação, 8% (12/36) dos cães rurais eram alimentados com ração comercial, enquanto que 16% (24/36) com alimentação mista (comida caseira e comercial). Pela análise estatística não houve diferença significativa em relação a esta variável.

Acredita-se mesmo que nos cães que eram alimentados somente com ração comercial, essa variável ainda possa ser duvidosa, sugerindo que nos próximos estudos exista um maior questionamento em relação aos proprietários, para que possamos nos certificar da alimentação e da quantidade de vezes administrada aos animais. Sabendo-se da dificuldade de restrição de alimentos em ambientes rurais.

Ainda faltam trabalhos relacionados com os tipos de dieta oferecidos para os cães para podermos associar a ocorrência de anticorpos para *N. caninum* aos tipos de alimentos oferecidos pelos proprietários.

Benetti *et al.*, (2008), em um estudo feito no município de Cuiabá, MT também não encontrou associação entre a ocorrência de anticorpos para *N. caninum* e o tipo de alimentação. Outros autores obtiveram o mesmo resultado (CANÓN-FRANCO *et al.*, 2003; CUNHA FILHO *et al.*, 2008).

Patitucci *et al.*, (2001), no Chile observaram que cães alimentados com carne crua ou que tinham acesso a animais abatidos clandestinamente, obtiveram um risco 2,6 vezes maior de serem soropositivos.

Foi verificado no presente estudo que a variável confinamento dos cães quando testada na análise, demonstrou não ter associação significativa com a sorologia dos cães ($p = 0,4258$). Em 9% (14/36) dos cães soropositivos possuíam vida livre com acesso á toda propriedade enquanto que em 14% (22/36) dos cães soropositivos permaneciam temporariamente presos.

Sugerindo que quanto á variável confinamento, mesmo nos casos onde os cães permaneçam parte do dia presos, eles também poderiam ter acesso a outras possíveis fontes de infecção por *N. caninum* como roedores, pássaros e outros animais que possam servir como reservatório.

Alguns autores chegam a relatar que às aves possam funcionar como vetores mecânicos de oocistos e que cães podem infectar-se pela ingestão destas aves (HEMPHILL *et al.*, 2000).

Em relação à variável contato com bovino, também não foi possível observar uma correlação para a infecção, talvez pelo fato de que onde as amostras foram coletadas o contato cão- bovino não era muito intenso em função de as propriedades não dependerem exclusivamente da pecuária.

Sobre o hábito de recolhimento das carcaças não revelaram influência na soropositividade dos cães rurais analisados. Em relação às amostras positivas, apenas 9% (14/36) das propriedades davam destino adequado às carcaças enquanto em 14% (22/24) esses materiais eram deixados a campo.

Em Pelotas um trabalho semelhante encontrou uma soropositividade de 2,2 vezes maior nas propriedades nas quais as carcaças de animais não eram

removidas do campo considerando importante como proteção a sua queima quando comparadas aos que deixavam os animais a campo ($p = 0,03$) (CUNHA FILHO *et al.*, 2008).

A positividade foi maior nos cães que segundo os proprietários, não tinham contato com bovinos 21 (14%), mostrando que não necessita obrigatoriamente bovinos na propriedade para encontrarmos cães positivos. A associação entre a soropositividade de cães e do contato com bovinos não foi significativa ($P=0,083$ e *Odds Ratio*= 0,479).

Outro fator importante foi que apesar de neste trabalho não termos realizado a sorologia nos bovinos podemos considerar o aspecto de que mesmo os cães que não apresentavam contato com bovinos serem positivos, possam ter se contaminado com outras fontes de infecção, como por exemplo, a ingestão de cistos teciduais em outros hospedeiros intermediários.

Das amostras dos cães urbanos obtivemos uma positividade de 2% (5/160) que é considerada baixa em relação a outros trabalhos em cães de domiciliados. Teixeira *et al.*, (2010) na cidade de Porto Alegre, foram detectados anticorpos para *N. caninum* em 15,8% (23/145) dos cães domiciliados.

Moura *et al.*, (2011), obtiveram uma positividade em Lages de 13% e no Balneário Camboriú 11,5% sendo que em cada município 200 amostras foram coletadas. Gennari *et al.*, 2002 observaram 18% de cães reagentes a *N. caninum* na área urbana da cidade de São Paulo. Já em outros trabalhos como de Sicupira *et al.*, (2011), na cidade de Ilhéus, Bahia a positividade de cães urbanos foi de 2,6% (4/156).

Entretanto devido a diferenças no número e tipo de amostras, técnicas de diagnóstico e pontos de corte essas comparações devem ser feitas com cautela.

Das amostras de cães urbanos, foram observados os seguintes resultados quanto às variáveis idade, gênero e tipo de alimentação, especificados na Tabela 5.

Tabela 5. Freqüência de amostras de cães de origem urbana soropositivas¹ para *Neospora caninum* segundo fatores de risco, no período de junho a dezembro de 2010 no município de Caxias do sul, RS.

Variáveis		Freqüência percentual (positivo/n)	Estatística ²
Idade	Menos de 1 ano	1% (1/29)	p = 1,0000 Odds Ratio: 0,9071
	Mais de 1 ano	3% (6/132)	
Gênero	Fêmea	2% (3/101)	p = 1,0000 Odds ratio: 0,8724
	Macho	1% (2/59)	
Alimentação	Ração comercial	1% (2/70)	p = 1,0000 Odds Ratio: 0,8529
	Mista	2% (3/90)	

¹.Reação de Imunofluorescência Indireta com antiimunoglobulina G ao título 50. ².Teste Exato de Fisher, através do pacote estatístico de Graphad Instat.

Do total de amostras positivas, 3% eram de animais com mais de um ano de idade, enquanto que 1% das amostras foram de animais com menos de um ano de idade. Aplicando-se análise estatística não foi observada diferença significativa entre eles.

Alguns trabalhos também sugerem que o fator idade dos cães não tenha importância na infecção por *N. caninum* (JESUS *et al.*, 2006; BENETTI *et al.*, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2010; SICUPIRA *et al.*, 2011). Outros pelo contrário já encontram uma associação positiva (COLLANTES-FERNÁNDEZ *et al.*, 2008; YAKHCHALI *et al.*, 2010; MOURA *et al.*, 2011).

Moraes *et al.*, (2008), em cães da microrregião da serra de Botucatu, estado de São Paulo, observaram um percentual crescente de positividade com a idade dos animais, sendo maior em cães entre 1 a 4 anos de idade, indicando maior possibilidade de contato e conseqüentemente infecção. Moura *et al.*, (2011), detectaram uma associação entre a idade dos cães acima de 13 meses de idade e a soropositividade.

Cavalcante, *et al.*, (2011) avaliaram a infecção de cães com 60 dias de idade e em cães com 12 meses de idade alimentados com diferentes tecidos de bovinos infectados. Embora nenhum dos animais tenha soroconvertido, os cães jovens eliminaram oocistos em suas fezes em 40% dos que ingeriram masseter, em 40% dos que ingeriram coração, em 33% dos que ingeriram fígado e em 75% dos que ingeriram cérebro. Demonstrando que a quantidade do inóculo que poderia ser um fato importante para a infecção desses animais (BERGERON *et al.*, 2001; CEDILLO *et al.*, 2008).

Analisando a frequência de cães soropositivos quanto à variável gênero dos cães urbanos, 2% (3/5) eram do sexo feminino enquanto que 1% (2/5) eram de cães do sexo masculino.

Os resultados encontrados no presente estudo, em relação à idade dos animais, não revelaram influência na soropositividade dos cães analisados. No entanto observamos neste estudo que as fêmeas se apresentaram em maior

número na área urbana. Isso pode ser justificado pelo fato de que atualmente em áreas urbanas, a procura por fêmeas ser maior em função de sua característica em não demarcar o território. Na área rural os cães machos se apresentaram em maior quantidade talvez pelo fato de não gestarem filhotes.

A existência de susceptibilidade ao gênero dos cães nos casos de ocorrência de neosporose ainda é desconhecida (DUBEY *et al.*, 2003), entretanto existem trabalhos que observaram uma maior ocorrência de anticorpos em fêmeas quando comparados aos cães machos, este fato foi correlacionado com possíveis fatores hormonais presente nas fêmeas durante a gestação (BARBER; TREES, 1998 ; WOUDA *et al.*, 1999).

Analisando a variável alimentação, neste estudo não foi observada uma diferença significativa em relação à dieta oferecida aos animais urbanos, dos positivos somente 1% (2/5) alimentavam-se exclusivamente de ração enquanto que 2% (3/5) alimentavam-se com comida caseira total ou parcialmente.

Benetti *et al.*,(2008), em um estudo feito no município de Cuiabá, Mato Grosso do Sul, também não encontrou associação entre a ocorrência de anticorpos para *N. caninum* e o tipo de alimentação, mesmo resultado obtido por MOURA *et al.*, (2011). Cañon-Franco *et al.*, (2003), utilizando a mesma técnica de diagnóstico, não encontraram associação entre a ocorrência de *N. caninum* e o tipo de alimentação, corroborando com os dados obtidos neste estudo.

A positividade não ter sido significativa em relação á variável alimentação dos cães urbanos pode ser explicada pelo fato de que em relação aos cães rurais, os cães urbanos nesse caso todos frequentam clínicas veterinárias onde recebem uma maior orientação dos veterinários sobre os

tipos de alimentos que os cães podem e que não podem ingerir. Além de que os passeios em áreas urbanas se tornam mais restritos em função de regras impostas pelo município em praças públicas e calçadas por caminharem acompanhados de seus proprietários com coleira e guia impossibilitando os cães de se alimentarem de restos de alimentos.

Em relação à dieta oferecida, assim como também na amostragem de cães rurais, um dos aspectos a ser investigado é a composição da dieta oferecida aos animais, havendo necessidade de compor grupos experimentais com dietas exclusivas de origem industrial e de origem caseira. Por isso para trabalhos futuros sugere-se um questionário mais detalhado visando identificar os tipos de dieta oferecidos pelos proprietários.

Obtivemos uma amostra em que o percentual entre os tipos de dieta foram semelhantes, 44% para dieta exclusiva com ração comercial e 56% para dieta mista o que nos levou ao questionamento sobre até que ponto os proprietários ocultam informações sobre petiscos caseiros e guloseimas presenteadas para seus cães.

Os títulos de anticorpos e número de animais soropositivos dos ambientes, urbano e rural variaram de zero (86,9%) a 1:6400 (0,64%), sendo 1:50 (5,11%), o mais prevalente como mostra a Tabela 6. Nenhum dos cães examinados apresentou sinais clínicos no momento da coleta de sangue.

Tabela 6. Distribuição dos resultados dos testes sorológicos para *Neospora caninum* pela técnica de imunofluorescência indireta em cães do município de Caxias do sul, RS, segundo o título de anticorpos.

	Rurais (n=153)		Urbanos (n=160)		Total (n=313)	
	%	Frequência	%	Frequência	%	Frequência
Negativos	76,47%	117	96,87%	155	86,90%	272
1:50	8,49%	13	1,87%	03	5,11%	16
1:100	5,22%	08	0	0	2,55%	08
1:200	3,26%	05	1,25%	02	2,23%	07
1:400	1,96%	03			0,95%	03
1:800	1,96%	03			0,95%	03
1:1600	1,30%	02			0,63%	02
1:3200	0%	0			0%	0
1:6400	1,30%	02			0,63%	02

Na maioria dos trabalhos realizados no Brasil, não foi observada correlação entre a titulação alta e a neosporose clínica como também foi observado no presente estudo. Cañon-Franco *et al.*, (2003) e Cunha Filho *et al.*, (2008), Teixeira *et al.*, (2010) obtiveram resultados semelhantes ao obtido neste estudo.

Estes resultados sugerem a necessidade de mais estudos relacionados aos sinais clínicos de alterações neuromusculares e neurológicas em cães com neosporose.

CONCLUSÕES

- Em relação aos cães urbanos, a soroprevalência detectada pelos autores do trabalho está abaixo dos 10% esperados.
- A influência das variáveis dos cães urbanos: o gênero, idade e alimentação, sobre a soroprevalência não foram significativas
- Em relação aos cães rurais, o valor sorológico ficou dentro da expectativa de 15% de prevalência esperada.
- A diferença estatística encontrada entre os cães rurais e urbanos demonstrou que a origem dos cães foi significativa para a soroprevalência de anticorpos para *N. caninum*

PERSPECTIVAS

Os resultados encontrados evidenciam a necessidade de se continuar pesquisando o *Neospora caninum* nas áreas urbana e rural para se determinar a cadeia epidemiológica deste protozoário e esclarecer dúvidas que foram levantadas no presente estudo.

Um dos aspectos a ser investigado é a composição da dieta oferecida aos animais, havendo necessidade de compor grupos experimentais com dietas exclusivas de origem industrial e de origem caseira.

Como os cães representam papel no ciclo epidemiológico, é importante manter a vigilância sorológica nestes casos para se detectar precocemente possíveis alterações do ponto de vista de saúde animal e de saúde pública.

11. REFERÊNCIAS

ALMERIA, S. *et al.* Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*, **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 107, n.4, p.287-294, 2002.

ANDERSON, M.L. *et al.* *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Association**, Schaumburg, v.198, p.241-244, 1991.

ANDERSON, M.L. *et al.* Evidence of vertical transmission of *Neospora* infection in dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 210, p. 1169-1172, 1997.

ANDERSON, M.L., ADRIANARIVO, A.G., CONRAD, P.A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, V.60-61, n.2, p.417-431, 2000.

ANDREOTTI, R. *et al.* Clonagem e expressão da porção C-terminal do antígeno de superfície NC-43 de *Neospora caninum* e sua identidade com anticorpos de bovinos no estado de Mato Grosso do Sul. In: FORUM BRASILEIRO DE ESTUDOS SOBRE *Neospora caninum*, 1, 2005, São Paulo. **Anais.....**Jaboticabal: CBPV, 2005.

ANDREOTTI, R., PINCKNEY, R.; GOMES, A. Diagnóstico sorológico de um rebanho bovino de corte de Mato Grosso do Sul. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11. 1999, Salvador. 1999. **Anais....** Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, P.226, 1999.

AZEVEDO, S. S. *et al.* Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. **Research in veterinary science**, London, v. 79, n.1, p. 51-56, 2005.

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

BARLING, K. S. *et al.* Ranch-management factors associated with antibody seropositivity for *Neospora caninum* in consignments of beef calves in Texas, USA. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 52, p.53-61, 2001.

BARR, B. C. *et al.* Neospora-like protozoal infections associated with bovine abortions. **Veterinary Pathology**, Washington, v.28, n.2, p.110-116, 1991.

BARR, B.C. *et al.* Neosporosis – report of the international *Neospora* workshop. **Compendium On Continuing Education For The Practicing Veterinarian**, Princeton, v.19, p.120-144, 1997.

BARR, B.C. *et al.*, Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1002). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Princeton, v.202, n.1, p.113-117, 1993.

BARROS, C.S.L.; BARROS, S.S.; SANTOS, M.N. Equine protozoal myeloencephalitis in southern Brazil. **Veterinary Record**, London, v.119, p.283-284, 1986.

BARTELS, C. J. M. *et al.* Supranational comparasion of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, the Netherlands, Spain and Sweden. **Veterinary Parasitology**, Amterdam, v. 137, p.17-27, 2006.

BASSO, W. *et al.* First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 87, p.612-618, 2001.

BELO, M.A.A., REZENDE, L. M. & COSTA, A. J. Presença de anticorpos contra *Neospora caninum* em bovinos com histórico de abortos não diagnosticados etiologicamente. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11. 1999, Salvador. 1999. **Anais.....**Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, P.229, 1999.

BENETTI, A.H. *et al.* Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais da região sudoeste do Estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.18, supl.1, p.29-33, 2009.

BENETTI, A. H. *et al.* Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães no município de Cuiabá, Mato Grosso. **Ciência Animal Brasileira**. Goiânia, v.9, n.1, p.177-180, 2008.

BERGERON, N. *et al.* Failure of dogs to shed oocysts fed bovine fetuses infected by *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.97, p.145-152, 2001.

BJERKAS, I. *et al.* Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Parasitology Research**, Berlin, v.70, n.2, p.271-274, 1984.

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

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

BRESCIANI, K.D.S. *et al.* Ocorrência de anticorpos contra *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em cães de região urbana de Araçatuba, SP. **Parasitology Research**, Berlin, 2006.

BUXTON, D. *et al.* Examination of red fox (*Vulpes vulpes*) from Belgium for antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Records**, v. 141, p.308-309, 1997.

BUXTON, D.; McALLISTER, M. M.; DUBEY, J.P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends Parasitology**, Oxford, v. 18, n.12, p. 546-552. 2002.

CAÑON-FRANCO, W.A. *et al.* Comparasion between direct agglutination test and indirect fluorescent antibody test for the detection of *Neospora caninum* antibodies in naturally exposed dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.12, n.1, p. 4-6, 2003.

CÂNON-FRANCO, W.A. *et al.* Detection of antibodies to *Neospora caninum* in two espécies of wild canids, *Lycalopex gymnocercus* and *Cerdocyon thous* from Brazil, **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 123, n.3-4, p.275-277,2004.

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

CANTILE, C.; ARISPICI, M. Necrotizing cerebelis due to *Neospora caninum* infection in in dog. **Journal of veterinary Medicine**, v.49, p. 47-50, 2002.

CAPELLI, G. *et al.* Sero-epidemiological survey of *Neospora caninum* infection in dogs in north-eastern Italy. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.123, n.3-4, p.143-148, 2004.

CASSOL, D. M. S. *et al.* Investigation of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle, dogs and human of the northeastern Sao Paulo county. **A-Hora-Veterinaria**, v. 25, n. 145, p. 23-26, 2005.

CAVALCANTE, G.T. *et al.* Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed different tissues from naturally infected cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.179, p.220-223, 2011.

CEDILLO, C. *et al.* Models for experimental infection of dogs fed with tissue from fetuses and neonatal cattle naturally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.154, p.151-155, 2008.

CHEADLE, M. A. *et al.* Prevalence of antibodies to *Neospora sp.* In horses from Alabama and characterization of an isolate recovered from a naturally infected horse. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.29, p.1537-1543. 1999.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E. *et al.* Seroprevalence and risk factors associated with *Neospora caninum* infection in different dog populations in Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.152, p.148-151, 2008.

CORBELINI, L. G. *et al.* Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 103, n.3, p.195-202, 2002.

CUNHA FILHO, N. A. *et al.* 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**, São Paulo, v. 17, suplemento 1, 2008.

DAFT, B.M. *et al.* *Neospora* encephalomyelitis and polyradiculoneuritis in an aged mare with Cushing's disease. **Equine Veterinary Journal**, London, v.29, p.240-243, 1996.

DIJKSTRA, T. *et al.* Dogs shed *Neospora caninum* oocyst after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. **Internacional Journal for Parasitology**, Oxford, v.31, n.8, p.747-752, 2001.

DIJKSTRA, TH. *et al.* 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**, Amsterdam, v. 105, n.2, p.89-98, 2002.

DUBEY, J.P & Lindsay, D.S. Neosporosis, toxoplasmosis and sarcocystosis in ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, 22, 645-671, 2006.

DUBEY, J.P & Schares, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, 140, 1-34, 2006.

DUBEY, J.P. et al. Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. **The Journal of Parasitology**, Oxford, v.87, n.2, p.345-353, 2001.

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

DUBEY, J.P. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related Coccidia. **Internacional Journal for Parasitology**, Oxford, V.32, p.929-946, 2002.

DUBEY, J.P. et al. Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 197, n. 7, p. 857-860, 1990.

DUBEY, J.P. et al. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Review**, Washington, v. 20(2), p. 323-367, 2007.

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

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

DUBEY, J.P. Neosporosis. In J.A. W. Coetzer & R.C. Tustin, **Infectious diseases of livestock**, Oxford: Oxford University Press, Oxford, Vol.I, 2nd ed, pp. 382-393, 2004.

DUBEY, J.P., Buxton, D. & Wouda, W. Pathogenesis of bovine neosporosis **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v.134, p. 267-289, 2006.

DUBEY, J.P., SCHARES, G. & ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and Control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.20, p.323-367, 2007.

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

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

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. *et al.* Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city of Uberlândia, Minas Gerais- Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam,v. 123, n. 1-2, p. 33-40, 2004.

FRANKLIN, B. M. **Evidências sorológicas da infecção humana por *Neospora caninum* no Brasil**. 2002. 81p. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2002.

FRIDLUND-PLUGGE, N. *et al.* 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**, São Paulo, 17, 4, 222-226, 2008.

FRÖSSLING, J.; UGGLA, A.; BJÖRKMAN, C. Prevalence and transmission of *Neospora caninum* within infected Swedish dairy herds. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 128, p.209-218, 2005.

GENNARI, S. M. *et al.* Presence of anti-*Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs with visceral leishmaniosis from the region of Araçatuba, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, p.613-619, 2006.

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

GENNARI, S.M. *Neospora caninum* no Brasil, situação atual da pesquisa. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.13, p.23-28, 2004.

GENNARI, S.M.; *et al.* Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 106, n.2, p.177-179, 2002.

GO´ZDZIK, K. *et al.* Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* in dogs from urban areas in central Poland. **Parasitology Research**, Berlin, 108:991-996, 2011.

GONÇALEZ, C.C. *et al.* Anticorpos para *Leptospira spp.*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em cães errantes albergados em canil privado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Vol.62, no.4, Belo Horizonte, 2010.

GONDIM, L. F. P. *et al.* Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.101, p.1-7, 2001.

GONDIM, L. F. P.; GAO, L.; McALLUISTER, M.M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, clinical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. **Journal of Parasitology**, Oxford, v. 88, n.6, p.1159-1163, 2002.

GONDIM, L. F. P.; McALLISTER, M. M; GAO, L. Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.134, p.22-29, 2005.

GONDIM, L. F.P. *et al.* Soroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, V.86, p.71-75, 1999.

GONDIM, L.F.P. *et al.* Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**. Oxford, v. 34, p. 159-161, 2004.

GRECA, H.; SILVA, A. V.; LANGONI, H. Associação entre a presença de anticorpos anti-*Leishmania sp.* e anti-*Neospora caninum* em cães de Bauru, SP. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, V. 62, n.1, p.224-227, 2010.

GUIMARÃES, A. M. *et al.* Fatores associados à soropositividade para *Babesia*, *Toxoplasma*, *Neospora* e *Leishmania* em cães atendidos em nove clínicas veterinárias do município de Lavras, MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, V. 18, supl.1, p.49-53, dez. 2009.

GUIMARÃES, MDC - Estudo das Doenças Associadas temporais à AIDS no Brasil, 1980-1999. **Cadern. Saúde públ. (Rio de J.)**, 16 (Supl. 1): 21-36, 2000.

HELMICK, B.; OTTER, A.; McGARRY, J.; BUXTON, D. Serological investigation of aborted sheep and pigs for infection by *Neospora caninum*. **Research in Veterinary Science**, London, V.73, p.187-189, 2002.

HEMPHILL, A. *et al.* European perspective on *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.30, p.877-924, 2000.

HEMPHILL, A. The Host-parasite relationship in neosporosis. **Advances in Parasitology**, London, V.43, p.47-107, 1999.

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**, Shaumburg, v. 219, p.632-635, 2001.

HILAI, M. *et al.* Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from camels from Egypt. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 28, p.269-271, 1998.

INNES, E.A. The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. **Parasitology**, Cambridge, v. 134, n.13, p.1903-1910, 2007.

JESUS, E. E. V., *et al.* 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 Science**, São Paulo, V.43, n.1, p.5-10, 2006.

KING, J.S. *et al.* Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, 2010.

LINDSAY, D.S. *et al.* Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of coyotes with *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 82, n. 4, p.657-659, 1996.

LINDSAY, D.S.; WESTON, J. L.; LITTLE, S. E. Short communication: Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) from South Carolina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 97, n. 2, p.159-164, 2001.

LOBATO. *et al.* 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**, Washington, v.1, p.84-89, 2006.

LOCATELLI-DITTRICH. *et al.* Investigation of *Neospora sp.* and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Parana state, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.135, p.215-221, 2006.

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

LORENZO, V.; PUMAROLA, M.; SISO, S. Neosporosis with cerebellar involvement in adult dog. **Journal of small animal practice**, Oxford, v.43, n.2, p.76-79, 2002.

MACHADO, G. P., *et al.* Seroprevalence and risk factors associated with neosporosis in sheep and dogs farms. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.021, 2011.

MAGALHÃES, V. C. S. *et al.* Frequência de anticorpos contra *Neospora caninum* em cães no município de Ilhéus, Bahia. **Ciência Animal Brasileira**, Goiania, v.10, n.1, p.306-311, 2009.

MARSH, A.E. *et al.* Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Princeton, v.209, p.1907-1913, 1996.

MARSI, M.D.; LOPEZ de ALDA, J.; DUBEY, J.P. Sarcocystis neurona – associated ataxia in horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.44, p.311-314, 1992.

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

MELO, C. B., LEITE, R. C. , LEITE, R. C. Infecção por *Neospora caninum* em cães e outros carnívoros. **Revista do CFMV**, v.11, n.35, p-32-43, 2005.

MINEO, T.W. *et al.* Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.98, n.4, p. 239-245, 2001.

MOORE, D.P. Neosporosis in South América. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.127, p.n.2, 87-97, 2005.

MORAES, C.C.G. DE *et al.* Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora* em cães da microrregião da serra de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 17, n. 1, p.1-6, 2008.

MOURA, AB. *et al.* *Neospora caninum* anticorpos e fatores de risco em cães de Lages e Balneário Camboriú, SC. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belorizonte,[online], vol.63, n.1, pp 262-265, 2011.

NAM, H. W.; KANG, S. W.; CHOI, WON. Y. Antibody reaction of human para*Toxoplasma gondii* positive and negative sera with *Neospora caninum* antigens. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 36, n. 4, p. 269-275, 1998.

NUNES, E.; KANAN, J. H. C.; STOBBE, N. S. **Identificação de *Neospora caninum* por Reação de Imunofluorescência Indireta utilizando-se soropositividade para HIV como parâmetro de imunodeficiência em amostras de soros humanos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**. 2012. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

OLIVEIRA, M. J. *et al.* Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs in the urban área of Campo Grande, MS, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, V.13, p.155-158, 2004.

OTRANTO, D. *et al.* Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.118, p.7-18, 2003.

PARÉ, J. *et al.* Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. V. 213, p.1595-1598, 1998.

PARÉ, J.; HIETALA, S. K.; THURMOND, M. C. Interpretation of na 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.

PATITUCCI, A. N., *et al.* *Neosporose canina*: Presencia de anticuerpos sericos en poblaciones caninas rurales y urbanas de Chile. **Arquivos de Medicina Veterinária**, v.33, n.2, Valvidia, 2001.

PETERS, M. *et al.* Immunohistochemical and ultrasctructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscle of naturally infected dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 31, p.1114-1148, 2001.

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

RIBEIRO, R. R., *et al.* Occurrence of anti-*Neospora caninum* and anti-*Toxoplasma gondii* em cães com Leishmaniose visceral, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.31,n.6, 2011.

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

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

ROMANELLI, P., *et al.* Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. **Research in veterinary Science**, London, V.82, p.202-207, 2007.

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

RUEHLMANN, D., *et al.* Canine neosporosis: a case report and literature review. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Princeton, V.31, n.2, p.174-183, 1995.

SICUPIRA, P. M. L., *et al.* Factors associated with infection by *Neospora caninum* in dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amterdam, doi:10.1016/j.vetpar.2011.09.029, 2011.

SOUZA, S.L.P. *et al.* Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Parana, Brazil. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.88, p.408-409, 2002.

SOUZA, L. M. *et al.* Antibodies for *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in water buffaloes from Sao Paulo State, Brazil. **Semina:-Ciencias-Agrarias**, v. 22, n. 1, p. 39-48, 2001.

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

TEIXEIRA, C. M. *et al.* **Soroepidemiologia de Neospora caninum em cães no município de Porto Alegre, RS.** 2010. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

THATE, F.M.;LAANEN, S.C. Successful treatment of neosporosis in an adult dog. **Veterinary Quarterly**, Holanda, v.20, Suppl 1, p.113-114, 1998.

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

TRAMAS, J. *et al.* Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. Washington,v. 6(5), p. 765-767, 1999.

VALADAS, S. *et al.* Occurrence of antibodies anti-*Neospora caninum*, anti-*Toxoplasma gondii*, and anti-*Leishmania chagasi* in serum of dogs from Pará sate, Amazon, Brazil. **Parasitology Research**, Berlin, 107: 453-457, 2010.

VANLEEVWEN, J. A. *et al.* Risk factors associated with *Neospora caninum* seropositivity in randomly sampled Canadian dairy cows and herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.93, p.129-138, 2010.

VIANNA, M.C.B. *et al.* Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam,v. 129, p.253-257, 2005.

VITALIANO, S.N. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neopora caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from southeastern and midwestern regions of Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam,v. 128, n.4, p.253-260,2004.

WALSH, C.P. *et al.* *Neospora hughesi*: Experimental infections in mice, gerbils and dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.31, p.119-129, 2000.

WANHA, K. *et al.* Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs and foxes in Austria. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.128,n.3-4, p.189-193, 2005.

WOODS, L.W., ANDERSON, M. L., SWIFT, P.K., *et al* Sistemic neosporosis in a California black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.6, p.508-510,1994.

WOUDA, W. *et al.* Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. **Internacional Journal for Parasitology**, oxford, v. 29, n.10, p.1677-1682, 1999.

YAI, L. E. O. *et al.* Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo state, Brazil. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.94, n.3, p.766, 2008.

YAI, L. E. O. *et al.* Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) from the city of São Paulo, Brazil. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.89, p.870-871, 2003.

YAKHCHALI, M. *et al.* Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in stray dogs of Urmia,Iran. **Parasitology Research** , Berlin, v.106, p. 1455-1458, 2010.

ANEXOS

ANEXO 1

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO PARA CÃES DE ÁREA URBANA

Data da coleta: ____/____/____ NÚMERO DA AMOSTRA: _____

Nome do Animal: _____

Raça: _____

Idade: _____

Sexo: () M () F

Proprietário: _____

Endereço (Rua/Avenida): _____

Nº: _____ Apto: _____ Fones: _____

1) Passeios na rua:

() NUNCA () EVENTUALMENTE () COM FREQUÊNCIA (qual?) _____

2) Tipo de passeio:

() LIVRE (sem guia) () RESTRITO (com guia) () LIVRE E RESTRITO

3) Convive com outros animais?

() SIM () Não Quais? _____

4) Alimentação

() Somente ração

() Somente Comida caseira, tipos de alimentos utilizados: _____

() Ração e comida caseira (qual a frequência oferecida): _____

5) Outras informações:

Vacinação: () NUNCA () ATRASADA () EM DIA QUAIS? _____

Vermifugação: () NUNCA () ATRASADO () EM DIA QUAL? _____

Castração: () SIM () NÃO Há quanto tempo? _____

Doenças Recentes: () SIM* () NÃO

*Qual e qual tratamento utilizado? _____

Observações: _____

ANEXO 2

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO PARA CÃES DE ÁREA RURAL

Data da Coleta: ___/___/___ NÚMERO DA AMOSTRA _____

Nome do Animal: _____ Raça: _____ Idade: _____

Sexo: () M () F.

Nome do proprietário: _____

Município: _____ Localidade: _____

Telefone: _____.

1) Qual o tipo de exploração da propriedade? _____

2) Possui contato com Bovino? () Sim, () Não

3) Os cães têm contato com outros animais? Quais?

4) Qual o total de cães por propriedade: _____

5) Os cães ficam:

() Confinados temporariamente () confinados permanentemente

() sempre soltos

6) Qual o alimento administrado aos cães:

() Ração () Ração e restos de comida () restos de comida

7) Recolhe carcaças de animais mortos no campo?

() sim () Não

8) Qual o destino dado as carcaças? _____

9) Qual a utilidade do cão? () Companhia, () Guarda, () Caça, () pastoreio

10) Vacinação dos cães: () Nunca, () Atrasadas, () Em dia. Quais? _____

11) Vermifugação dos cães: () Nunca, () Em dia. Com quê frequência e qual produto utilizado? _____

12) Doenças recentes em cão? () Sim, () Não

Qual e tratamento utilizado? _____

Observações: _____
