

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU

**PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum* EM OVINOS E
CÃES DE PROPRIEDADES RURAIS DOS MUNICÍPIOS DE IBITINGA,
ITÁPOLIS, BORBOREMA E TABATINGA, SÃO PAULO, BRASIL**

GUSTAVO PUGLIA MACHADO

BOTUCATU – SP
2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU

**PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum* EM OVINOS E
CÃES DE PROPRIEDADES RURAIS DOS MUNICÍPIOS DE IBITINGA,
ITÁPOLIS, BORBOREMA E TABATINGA, SÃO PAULO, BRASIL**

Dissertação apresentada junto ao programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, área de Saúde Animal, Saúde Pública e Segurança Alimentar para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Paes

BOTUCATU – SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Machado, Gustavo Puglia.

Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em ovinos e cães de propriedades rurais dos municípios de Ibitinga, Itápolis, Borborema e Tabatinga, São Paulo, Brasil / Gustavo Puglia Machado. – Botucatu, 2010

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Antonio Carlos Paes

Capes: 50502000

1. Animais domésticos - Doenças. 2. Ovelha. 3. Canídeo. 4. Sorologia veterinária. 5. Parasitologia veterinária.

Palavras-chave: Canídeos; Neosporose; *N. caninum*; Ovelhas; Sorologia.

Nome do Autor: Gustavo Puglia Machado

Título: Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em ovinos e cães de propriedades rurais dos municípios de Ibitinga, Itápolis, Borborema e Tabatinga, São Paulo, Brasil.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Carlos Paes

Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Hélio Langoni

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Kátia Denise Saraiva Bresciane

Membro

Departamento de Apoio, Saúde e Produção Animal

Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP - Araçatuba

Data da Defesa: 18/11/2010

EPÍGRAFE

Nesta vida, nada é inútil, quando alguém se esforça, não tanto para ter alguma coisa, mas para ser alguém de verdade.

José Dias Goulart

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, meus pais e ao meu irmão que me incentivaram a estudar e a seguir meus sonhos, não importando as dificuldades da vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permanecer sempre perto, iluminando meus caminhos.

Aos meus pais Ana Maria e Munhoz e ao meu irmão Arthur pelo amor, amizade, paciência, dedicação e confiança que tiveram comigo. Agradeço pelo trabalho árduo que tiveram para me custear durante toda a faculdade e mestrado.

A toda equipe do núcleo de pesquisa em zoonoses (NUPEZO), que mais que profissionais são amigos: Diego Generoso, Carla Janeiro Coiro, Mariana Kikuti e Benedito Donizete Menozzi.

Ao professor Antonio Carlos Paes, por ter aceitado me orientar neste trabalho e que além de grande profissional, mostrou-se sempre compreensivo e motivador.

Ao professor Hélio Langoni a qual tenho imensa admiração, pela confiança, paciência, ensinamentos e por ser um excelente educador.

Aos amigos da pós-graduação: João Marcelo, Diego, Felipe, Haroldo, Rodrigo, Thiago, Bruna, Dulce, Ana, Leila, Luciana, Selene, Susan, Marcela, Marília e Simone.

Aos funcionários do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública: Adilson Aparecido Romeiro, Roberto Martins, Diego José de Almeida, Adriana Cristina Pavan Vieira, Adriana de Fátima David, Ana Rosa Camargo, Sergio Fávero e José Wanderlei Furlin.

Aos produtores rurais, por permitirem o acesso e colheita das amostras nas propriedades.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

MACHADO, G. P. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em ovinos e cães de propriedades rurais dos municípios de Ibitinga, Itápolis, Borborema e Tabatinga, São Paulo, Brasil. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010.

RESUMO

A neosporose é uma doença parasitária causada pelo protozoário *Neospora caninum* sendo causadora de problemas reprodutivos e distúrbios neurológicos nos animais. Os canídeos selvagens e domésticos são hospedeiros definitivos, e os ovinos, entre os hospedeiros intermediários, se constituem uma das espécies susceptíveis. A presença de cães nas propriedades rurais é um fator de risco para a infecção nos ovinos, indicando associação entre a infecção em ambas as espécies. Este trabalho teve por objetivo verificar a soro-ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em ovinos e cães naturalmente infectados. Foram colhidas amostras de sangue de 1497 ovelhas e 42 cães que compartilhavam o mesmo ambiente, provenientes de 16 propriedades rurais localizadas na microrregião de Araraquara. Para a pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* utilizou-se a técnica de reação de imunofluorescência indireta (RIFI ≥ 25). Para o estudo epidemiológico foi aplicado um questionário aos proprietários ou responsáveis pelos animais, contendo informações ligadas a neosporose, tanto para ovinos quanto para os cães. Dos 1497 soros ovinos testados obteve-se uma ocorrência de 8,0% (LI 95%= 6,7%; LS 95%= 9,2%) e dos 42 cães 4,8% (LI 95%= 0%; LS 95%= 7,2%). Foram observadas diferenças estatísticas significativas na associação entre o resultado da sorologia dos ovinos para *N. caninum* e as variáveis: abastecimento de água ($P=0,0004$; $OR=2,15$), presença de outros canídeos selvagens ou domésticos ($P=0,0013$; $OR=2,38$) e presença ou ausência de problemas reprodutivos ($P=0,0031$; $OR=1,75$). A ingestão de água de represa, a presença de canídeos selvagens ou de propriedades vizinhas e presença de problemas reprodutivos apresentaram associação positiva com a ocorrência de neosporose em ovinos.

Palavras-chave: Neosporose, sorologia, ovelhas, canídeos.

MACHADO, G. P. Antibodies research for *Neospora caninum* in sheep and dogs from farms from Ibitinga, Itápolis, Borborema, Tabatinga cities, Sao Paulo, Brazil. Dissertation (Master's degree) – School of Veterinary Medicine and Animal Science – FMVZ, Campus Botucatu, Sao Paulo State University – UNESP, 2010.

ABSTRACT

The neosporosis is a parasitic disease caused by protozoan *Neospora caninum* that is considered a cause of reproductive problems and neurological disorders in animals. Domestic and wild canids are definitive hosts, and sheep, among the intermediate hosts, constitute one of the susceptible species may occur reproductive problems. The presence of dogs in the farms is a risk factor for infection in sheep, indicating an association between infection in both species. This study aimed to verify the serum-occurrence of antibodies in sheep and dogs naturally infected by *N. caninum*. We collected 1497 blood samples from sheep and 42 samples from dogs that lived with the sheep from 16 farms located in the microregion of Araraquara. For the detection of *N. caninum* antibodies was performed the technique of reaction of indirection immunofluorescence (IFAT ≥ 25). Epidemiological study was applied as a questionnaire for sheep and dogs with information related to neosporosis. Of 1497 sheep sera tested, the occurrence obtained was 8.0% (LL 95% = 6.7%; UL 95% = 9.2%) and of 42 dogs, 4.8% (LL 95% = 0%; UL 95% = 7.2%). Were statistically significant differences in the association between seropositivity for *N. caninum* in sheep and the variables: water supply ($P=0.0004$; $OR=2.15$), presence of other wild or domestic canids ($P=0.0013$; $OR=2.38$) and presence or absence of reproductive problems ($P=0.0031$; $OR=1.75$). Ingestion of water from dams, the presence of wild dogs or wild canids of neighboring properties and the presence of reproductive problems were positively associated with the occurrence of neosporosis in sheep.

Keywords: Neosporosis, serology, sheep, canids.

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1 Introdução.....	1
1.2 Etiologia.....	2
1.3 Ciclo Biológico.....	3
1.4 Epidemiologia.....	6
1.5 Patogenia.....	13
1.6 Sinais Clínicos.....	15
1.7 Diagnóstico.....	16
1.8 Impactos Econômicos da Neosporose.....	20
1.9 Potencial Zoonótico.....	20
1.10 Prevenção e Controle.....	21
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivo específico.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 População e amostragem.....	25
3.2 Colheitas das amostras.....	28
3.3 Variáveis estudadas.....	28
3.4 Exame sorológico.....	28
3.5 Análise estatística.....	31
4. RESULTADOS	33
4.1 Sorologia.....	33
4.2 Análise descritiva das propriedades.....	33
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÕES	52

7. REFERÊNCIAS	54
8. ANEXOS	70
8.1 Questionário epidemiológico	70
8.2 Normas para publicação.....	73
8.3 Artigo para publicação	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do parasita <i>N. caninum</i>	5
Figura 2. <i>Canis latrans</i> e o mapa da distribuição geográfica dos coites na América do norte e Central.	7
Figura 3. Distribuição geográfica dos municípios de Ibitinga, Itápolis, Borborema e Tabatinga, São Paulo, Brasil.....	28
Figura 4. Técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI.....	30
Figura 5. Canídeos brasileiros.....	47

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Frequência de anticorpos anti-*N. caninum* em ovinos no Brasil..... 8
- Tabela 2.** Frequência de anticorpos anti-*N. caninum* em cães no Brasil. 12
- Tabela 3.** Número de propriedades rurais de acordo com os municípios, número total de animais dos rebanhos ovinos e número de ovinos e cães amostrados..... 26
- Tabela 4.** Total de ovelhas e cães soropositivos e soronegativos para anticorpos contra *N. caninum* pela RIFI nas 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010..... 35
- Tabela 5.** Ocorrência de anticorpos contra *N. caninum* pela RIFI nas ovelhas e cães das 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010. 36
- Tabela 6.** Distribuição das ocorrências de títulos de anticorpos obtidos pela RIFI nas ovelhas das 16 propriedades pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010. 37
- Tabela 7.** Distribuição das ocorrências de títulos de anticorpos obtidos pela RIFI nos cães das 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010. 37
- Tabela 8.** Associação entre a variável tamanho da propriedade com a soropositividade dos ovinos obtidos pela RIFI nas 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010..... 38
- Tabela 9.** Associação entre a variável atividade principal da propriedade com a soropositividade dos ovinos obtidos pela RIFI nas 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010..... 38

Tabela 10. Associação entre a variável abastecimento de água das ovelhas com a soropositividade dos ovinos obtidos pela RIFI nas 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara São Paulo, Brasil, 2010. 39

Tabela 11. Associação entre a variável presença de outros canídeos domésticos ou selvagens com a soropositividade dos ovinos obtidos pela RIFI nas 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010. 39

Tabela 12. Associação entre a variável tipo de criação de aves domésticas (*Gallus gallus domesticus*) com a soropositividade dos ovinos obtidos pela RIFI nas 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010. 40

Tabela 13. Associação entre a variável presença de roedores com a soropositividade dos ovinos obtidos pela RIFI nas 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010. 40

Tabela 14. Associação entre a variável abate de animais na propriedade com a soropositividade dos ovinos obtidos pela RIFI nas 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010. 41

Tabela 15. Associação entre a variável acesso dos cães a carne crua e vísceras dos animais abatidos ou de outros animais com a soropositividade dos ovinos obtidos pela RIFI nas 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010. 41

Tabela 16. Associação entre a variável tipo de criação dos cães com a soropositividade dos ovinos obtidos pela RIFI nas 16 propriedades pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010. 42

Tabela 17. Associação entre a variável presença ou ausência de problemas reprodutivos com a soropositividade dos ovinos obtidos pela RIFI nas 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010..... 42

Tabela 18. Associação entre a variável tipo de criação com a soropositividade dos cães obtidos pela RIFI nas 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara, Brasil, 2010. 43

Tabela 19. Associação entre a variável acesso dos cães a carne crua dos animais abatidos na propriedade e de outros animais com a soropositividade dos cães obtidos pela RIFI nas 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010. 43

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Introdução

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório causador da neosporose, doença de distribuição mundial, que pode acometer uma gama considerável de espécies de animais domésticos e selvagens (DUBEY, 1999; GONDIM et al., 2004). É uma doença emergente, associada a problemas reprodutivos e distúrbios neurológicos, com caráter progressivo, manifestando-se com maior severidade em animais jovens, reconhecida mundialmente como importante causadora de abortamentos em rebanhos bovinos (ANDERSON et al., 2000).

A neosporose canina vem sendo descrita desde 1984 quando ocorreram os primeiros relatos da doença em cães, cujos sinais eram semelhantes aos de encefalite e miosite. A descrição do cão como hospedeiro definitivo ocorreu em 1998 com a constatação de que nestes animais se desenvolve a fase sexuada do parasito e eliminação de oocistos nas fezes. Este é fator importante na cadeia epidemiológica, pois ressalta a importância dos cães na transmissão horizontal do parasito (DUBEY, 2003).

A ovinocultura no Brasil está em crescente expansão, principalmente nos estados onde não havia tradição neste tipo de atividade econômica. Assim, a cadeia produtiva deve atentar para os problemas sanitários, dentre eles os reprodutivos que tem efeito direto sobre a produtividade dos rebanhos. Entre as enfermidades parasitárias que afetam a reprodução destaca-se a neosporose, responsável por quadros de abortamento, morte embrionária, malformação fetal e nascimento de cordeiros fracos ou persistentemente infectados (ALMEIDA, 2004).

A presença de anticorpos para *N. caninum* em amostras de soro, demonstra exposição ao parasita, que pode ser identificada por testes sorológicos tais como a Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI (DUBEY et al., 1988), Teste de Aglutinação para Anticorpos anti-*N. caninum* – NAT (ROMAND et al., 1998) e Teste Imunoenzimático – ELISA (DUBEY et al., 1997; BJORKMAN et al., 1999). A RIFI foi o primeiro teste sorológico usado para a

demonstração de anticorpos anti-*N. caninum* (DUBEY et al., 1988) e atualmente é muito utilizada para diagnóstico da infecção em ovinos e cães, constituindo padrão ouro comparada a outros testes (ATKINSON et al., 2000).

No Brasil, as pesquisas com *N. caninum* estão em fase de levantamentos sorológicos e a soroprevalência é desconhecida em algumas regiões. A falta de informações sobre a epidemiologia do agente tem limitado substancialmente a proposição de soluções objetivas e práticas para prevenir a infecção. Inúmeras são as causas de problemas reprodutivos em ovinos, devendo sempre ser incluído o diagnóstico diferencial para esta enfermidade. Desta maneira, o estudo epidemiológico da doença é fundamental para verificar a relação hospedeiro, agente e meio ambiente (MUNHÓZ, 2009).

1.2 Etiologia

N. caninum é um protozoário parasita do filo Apicomplexa, classe Sporozoa, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae (DUBEY e LINDSAY, 1996). Duas espécies são descritas no gênero *Neospora*: *N. caninum* (DUBEY et al., 1988) e *N. hughesi* (MARSH et al., 1998). *N. caninum* é morfológicamente similar a outros protozoários do filo Apicomplexa, que provocam doenças sistêmicas em muitos animais, tais como: *Toxoplasma gondii*, *Hammondia heydorni*, *Sarcocystis neurona* e *Sarcocystis canis* (DUBEY et al., 2002).

Três formas infectantes do parasita são descritas: taquizoítos, bradizoítos (contidos em cistos teciduais) e esporozoítos (contidos em oocistos). Os taquizoítos são ovóides, redondos ou em forma de meia lua, com núcleo na posição central ou terminal, medindo de 3-7 μm x 1-5 μm , dependendo do estágio de crescimento e divisão, e do plano de corte dos tecidos (DUBEY e LINDSAY, 1996; DUBEY et al., 2002).

Os bradizoítos são considerados os organismos de multiplicação lenta ou de latência e estão em grande número dentro de cistos teciduais. Os cistos de *N. caninum* geralmente são redondos ou ovais, podendo medir até 107 μm . Os bradizoítos são delgados, medem 6-8 μm x 1-2 μm , possuem núcleo terminal a subterminal, e as mesmas organelas encontradas nos taquizoítos,

mas com menor número de roptrias e mais grânulos de amilopectina (DUBEY e LINDSAY, 1996).

Os oocistos são eliminados nas fezes na forma não esporulada, possuem formato esférico a subesférico, medindo de 10 a 11 μm de diâmetro, contendo um esporonte central e não são infectantes. Cada oocisto contém dois esporocistos, cada qual com quatro esporozoítos (LINDSAY et al., 1999).

1.3 Ciclo Biológico

Em 1998 parte do ciclo biológico de *N. caninum* foi elucidado e demonstrado pela eliminação de oocistos nas fezes por cães que ingeriram cistos contidos em cérebro de camundongo infectado, concluindo-se que o cão era o hospedeiro definitivo (MCALLISTER et al., 1998). Em outro experimento, Lindsay et al. (1999) observaram a eliminação de oocistos por cães cinco dias após a ingestão de cistos teciduais, durante seis dias consecutivos. Neste estudo, os oocistos esporularam no ambiente após 24 horas e um dos cães eliminou oocistos, embora não tenha sido verificada conversão sorológica.

O ciclo biológico de *N. caninum* (Figura 1) ainda não está totalmente elucidado, principalmente no que diz respeito à fase intestinal, que compreende a fase sexuada de evolução. Sabe-se que o período pré-patente é de cinco a oito dias após a ingestão dos cistos teciduais (LINDSAY e DUBEY, 2000). Basso et al. (2001) confirmaram a condição do cão como hospedeiro definitivo ao observarem a eliminação de oocistos por cão naturalmente infectado. Foi observado que o coioote (*Canis latrans*) também pode eliminar oocistos nas fezes e representar um hospedeiro definitivo (GONDIM et al., 2004).

O oocisto esporulado apresenta dois esporocistos com quatro esporozoítos cada e na microscopia óptica é muito semelhante ao de *Toxoplasma gondii*, *Hammondia heydorni* e *Hammondia hammondi* (LINDSAY et al., 1999). A quantidade de oocistos de *N. caninum* eliminados nas fezes pelos cães é pequena em comparação à quantidade eliminada de oocistos de *T. gondii* pelos gatos (DUBEY et al., 2002), embora Gondim et al. (2005) observaram que filhotes eliminam quantidade maior do que os cães adultos. Neste mesmo estudo, foi verificada reexcreção espontânea de oocistos por

cães dois meses após a primeira inoculação, e ainda após um segundo desafio, 18 a 20 meses da primo-infecção. Em contrapartida, cães reinoculados após oito meses não eliminaram oocistos, sugerindo a existência de possível imunidade durante esse período.

No hospedeiro intermediário ocorrem os estágios assexuados: os taquizoítos e bradizoítos (WOUDA et al., 1999). Há relatos de infecções naturais em cães, bovinos, búfalos, ovinos, caprinos, eqüinos, raposas, veados, rinoceronte, lhama, alpaca e ratos, e experimentalmente, foi possível a infecção de gatos, suínos, camundongos, gerbis, coiotes e macacos (ALMEIDA, 2004).

Oocistos liberados no ambiente pelo hospedeiro definitivo se tornam infectantes ao esporular (MCALLISTER et al., 1998). São ingeridos pelo hospedeiro intermediário (bovinos, ovinos, cães, bubalinos, caprinos e outros) e, na luz intestinal, são liberados os esporozoítos. Estes penetram nas células da parede intestinal passando a se chamar de taquizoítos, que se dividem rapidamente por endodiogenia e podem atingir quaisquer células do organismo do hospedeiro, causando severas lesões em vários órgãos. Com a resposta imune do hospedeiro, os taquizoítos diferenciam-se em bradizoítos, forma de multiplicação lenta contidas em cistos teciduais e uma queda da imunidade do hospedeiro poderia provocar reativação dos bradizoítos e rompimento do cisto (WOUDA et al., 1999). Quando ocorrer a ingestão destes cistos pelo cão ou o coioote, os bradizoítos, que são resistentes às soluções pépticas e ácidas responsáveis pela digestão, iniciarão o processo de penetração no epitélio intestinal dando origem às formas resultantes da multiplicação assexuada e sexuada do parasito. Em seguida, ocorre a liberação de oocistos não esporulados no ambiente, reiniciando o ciclo (DUBEY, 1999).

Os taquizoítos localizam-se dentro de um vacúolo parasitóforo no citoplasma da célula hospedeira. Taquizoítos já foram observados em macrófagos, neutrófilos, células do tecido nervoso, hepatócitos, fibroblastos, miócitos, células epiteliais tubulares renais e células endoteliais vasculares (SPEER et al., 1999).

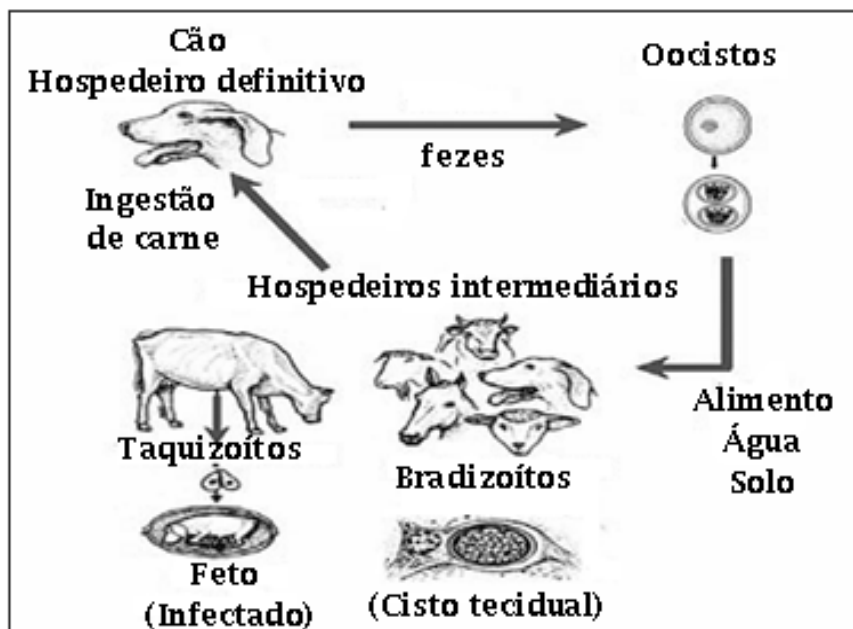


Figura 1. Ciclo de vida do parasita *N. caninum*

Fonte: HEMPHILL, 2006

Os oocistos podem ter formato redondo ou ovalado. A parede cística restringe os bradizoítos que podem estar em número de 20 a 100. Os cistos de *N. caninum* são encontrados em baixo número nos tecidos quando comparado aos de *T. gondii* (LINDSAY et al., 1996).

N. caninum pode ser transmitido de forma horizontal ou vertical. Na transmissão horizontal, a infecção ocorre por ingestão de água ou alimentos contaminados por oocistos esporulados expostos no meio ambiente por meio das fezes dos hospedeiros definitivos. Já a transmissão vertical ocorre quando a mãe infectada transmite a doença para seus descendentes pela via transplacentária (GUIMARÃES JUNIOR, 2002).

A transmissão do parasito por meio de sêmen ou colostro contaminados está sendo investigada. Foi observado DNA do parasito em sêmen de búfalos soropositivos para *N. caninum* (ORTEGA-MORA et al., 2003). Em outro estudo, sêmen bovino contaminado experimentalmente com taquizoítos de *N. caninum* induziu infecção em vacas que foram inseminadas (SERRANO-MARTINEZ et al., 2007). Diante da comprovação de que o parasito pode estar presente no sêmen de bovinos naturalmente infectados, deve-se investigar o potencial do

sêmen na transmissão de *N. caninum*. Recentemente, *N. caninum* foi confirmado em colostro de vacas soropositivas para o parasito, o que também deve ser investigado como uma nova via de transmissão do parasito (MOSKWA et al., 2007).

1.4 Epidemiologia

Na Noruega Bjerkas et al. (1984) diagnosticaram doença semelhante à toxoplasmose em uma ninhada de sete cães da raça Boxer, encontrando cistos teciduais semelhantes a *Toxoplasma gondii*, porém não detectaram anticorpos anti-*T. gondii* no soro desses animais.

A descrição do novo gênero e espécie foi realizada por Dubey et al. (1988) nos Estados Unidos, que isolaram e descreveram o protozoário em filhotes de cães que apresentavam sinais clínicos similares aos descritos por Bjerkas et al. (1984), denominando o agente *N. caninum*. Posteriormente, este agente foi reconhecido como causador de doença em cães e identificado em fetos bovinos abortados, mumificados e em bezerros com paralisia neonatal (MARSH et al., 1995).

McAllister et al. (1998) definiram o cão doméstico (*Canis familiaris*) como hospedeiro definitivo de *N. caninum* e Gondim et al. (2004) evidenciaram que o coioote (*Canis latrans*) (Figura 2) também faz parte do ciclo de vida deste protozoário como hospedeiro definitivo.

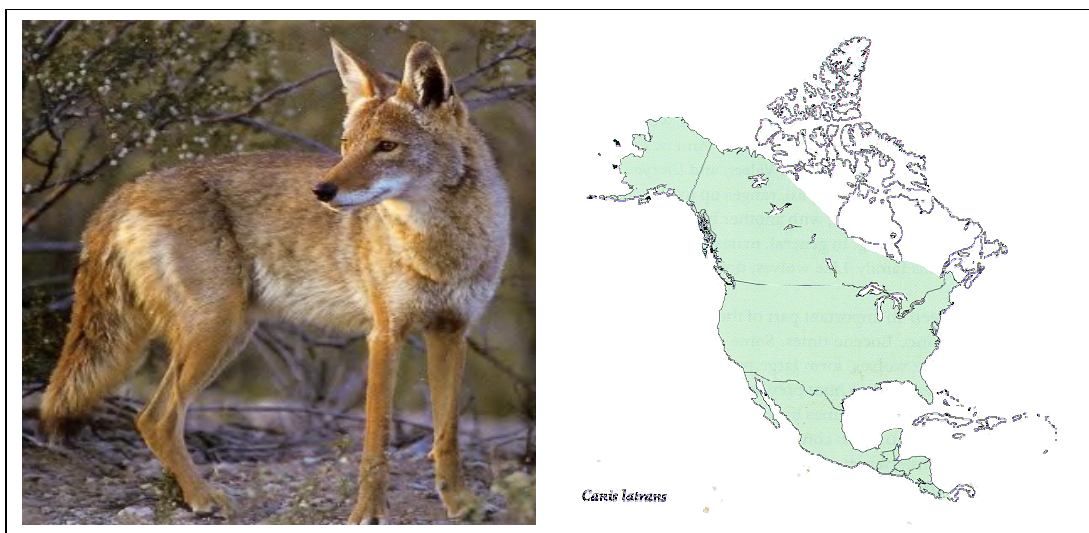


Figura 2. *Canis latrans* e o mapa da distribuição geográfica dos coiotes na América do norte e Central.

Fonte: Adaptado de Wilson (1999).

Estudos sobre a soroprevalência de *N. caninum* na espécie ovina no Brasil e no mundo mostraram menores taxas quando comparados à espécie bovina. A distribuição do parasita é mundial e a infecção já foi relatada nos cinco continentes (DUBEY, 1999).

N. caninum em ovinos foi inicialmente diagnosticado em cordeiro congenitamente infectado na Inglaterra (DUBEY, 1990).

Na Inglaterra e País de Gales, estima-se que a neosporose seja causa de abortamento em bovinos em 12,5% dos casos (DAVISON et al., 1999) e na Califórnia, ela foi apontada como a principal causa de abortamentos em bovinos de leite (ANDERSON et al., 2000). Estudo realizado na Inglaterra e País de Gales em 660 amostras de soros colhidas de ovelhas que haviam abortado foram submetidas à RIFI (ponto de corte 1:50). Destas, apenas três (0,45%) foram positivas para a neosporose (HELMICK et al., 2002).

Kobayashi et al. (2001) relataram a presença de cistos teciduais de *N. caninum* no cérebro de uma ovelha prenhe assintomática e no cérebro de seus dois fetos, confirmada por imunoperoxidase e PCR. Ao exame histopatológico, os cérebros dos fetos mostraram encefalite multifocal. No mesmo ano, no

Japão, o parasita foi isolado do cérebro de uma ovelha prenhe assintomática sem histórico de abortamento (KOYAMA et al., 2001).

Em Guarapuava-PR, foi realizado estudo soro-epidemiológico utilizando a RIFI (ponto de corte de 1:100) em 305 amostras de soro de ovinos, onde 9,5% dos animais foram soropositivos para *N. caninum* (ROMANELLI, 2002).

No estado de São Paulo Figliuolo et al. (2004), examinaram pela RIFI (≥ 50) 597 amostras de soro sanguíneo de ovinos, observando soropositividade de 9,2% para anticorpos contra *N. caninum*.

A ocorrência de anticorpos contra *N. caninum* em ovinos naturalmente infectados na região Norte do estado do Paraná mostrou que dos 381 soros ovinos testados obteve-se positividade em 13,91% dos animais e dos 25 cães testados obteve-se 36% de reagentes (MUNHÓZ, 2009).

A tabela 1 reúne alguns estudos de frequência de anticorpos para *N. caninum* em ovinos de diferentes estados do Brasil.

Tabela 1. Frequência de anticorpos anti-*N. caninum* em ovinos no Brasil.

Estado	Frequência	Autor/Ano
RS	3,20%	VOGEL et al.(2006)
PR	9,50%	ROMANELLI (2002)
PR	13,91%	MUNHÓZ (2009)
SP	9,20%	FIGLIUOLO et al. (2004)
MS	12,0%	GONÇALVES et al. (2004)
BA	7,40%	OTERO et al.(2002)
DF	8,70%	UENO et al. (2005)
RO	29,0%	AGUIAR et al.(2004)

Casos de neosporose em cães têm sido relatados na América do Norte, Europa, África do Sul, Japão, Austrália e Costa Rica (DUBEY e LINDSAY, 1993; MORALES et al., 2001).

Na Inglaterra, 163 soros de cães de diferentes raças foram examinados para a presença de anticorpos anti-*N. caninum*, utilizando a RIFI. Deste total, 27 (16,6%) apresentaram títulos ≥ 50 e 21 (12,9%) tiveram títulos ≥ 200 , e não

houve relação significativa entre as raças (TREES et al., 1993). Ainda na Inglaterra, Lathe (1994), utilizando a mesma técnica (ponto de corte de 1:50) examinou amostras de soro de 104 cães durante os meses de fevereiro e março de 1994, e encontrou 5,8% (6 cães) soropositivos e apenas um animal com sinais de neosporose clínica.

Sawada et al. (1998), no Japão, analisaram 198 cães urbanos, 48 de criação de bovinos de leite e 20 de uma criação de cães pastores, e observaram que 7,1% dos animais foram positivos para *N. caninum* na área urbana e 31,3% positivos em propriedades leiteiras. Na criação de cães pastores 85% foram soropositivos para *N. caninum*.

Wouda et al. (1999) também observaram maior prevalência em cães de propriedades rurais na Holanda, comprovando que o convívio de cães com bovinos aumenta a possibilidade de infecção para *N. caninum* em ambas as espécies.

Foi relatado na Argentina por Basso et al. (2005), um caso de neosporose clínica em filhote de cão da raça Boxer. O animal foi eutanasiado sendo encontrada severa miosite no esôfago e músculos estriados. Taquizoítos e cistos foram observados em cortes do cérebro. A confirmação do caso foi feita por imunistoquímica, Western Blot e inoculação em gerbis (*Meriones unguiculatus*), que 49 dias após a infecção já apresentavam títulos de 100 a 400. O DNA do parasito foi identificado no pulmão, no cérebro e músculo estriado do cão e no cérebro de um dos gerbis inoculados.

Na República Tcheca foi realizado um estudo sobre a dinâmica de anticorpos para *N. caninum* em cães durante período de três anos (1999 a 2001). Os autores verificaram que a população de cães está exposta ao agente, pois 4,9% dos animais foram soropositivos na RIFI. Foram avaliados neste estudo cães do exército, polícia, particulares e de abrigos, que apresentavam prevalência de 4,7%, 0%, 2,6% e 19,2%, respectivamente. Com isso observa-se que a neosporose canina deve ser incluída como diagnóstico diferencial em clínicas veterinárias para cães com desordens neurológicas, já que o parasito encontra-se presente no meio em que os cães habitam (VÁCLAVEK et al., 2007).

No Brasil, Gondim et al. (2001) isolaram *N. caninum* do cérebro de cão da raça Collie, fêmea com 7 anos de idade, atendido em clínica particular no estado da Bahia, com problema de incoordenação e paresia de membros. A sorologia realizada através da RIFI apresentou um título de 1600. O animal foi submetido a eutanásia e fragmentos do cérebro foram homogeneizados e inoculados em nove gerbis, os quais foram eutanasiados três a quatro meses após a infecção, e apresentaram cistos teciduais no cérebro. A confirmação para *N. caninum* foi obtida por IHC e PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase).

Mineo et al. (2001) investigaram em Uberlândia - MG a ocorrência de anticorpos para *N. caninum* em soro de 163 cães, os quais apresentaram desordens do tipo neuromuscular, respiratória e/ou gastrointestinal, através das técnicas da RIFI e IP (imunoprecipitação). Foram utilizados títulos de 25 e 50 para RIFI e obteve-se índices de 2,5% (4 cães) e 4,3% (7 cães), respectivamente, totalizando 11 animais positivos (6,7%). Com relação à IP, dois antígenos fortemente dominantes (proteínas 29 e 35 kDa) foram reconhecidos nos 11 soros positivos pela RIFI.

Gennari et al. (2002) analisaram sorologicamente 611 cães capturados nas ruas da cidade de São Paulo e 500 cães domiciliados, observaram pela técnica de NAT uma prevalência de 25% e 10% respectivamente, indicando que a chance de cães de rua serem soropositivos para *N. caninum* foi duas vezes e meia maior do que a de cães domiciliados.

Em Guarapuava-PR, foram examinados pela RIFI soros de 24 cães de propriedades rurais criadoras de ovinos, onde 29% dos animais foram soropositivos para neosporose, com ponto de corte de 1:50 (ROMANELLI, 2002).

Em estudo realizado em 157 cães da região urbana do Município de Monte Negro, Rondônia, Cañon-Franco et al. (2003) observaram que *N. caninum* está presente na região, infectando cães com prevalência de 8,3% na RIFI. No mesmo estudo, os autores verificaram que o parasito infecta os animais sem diferença de sexo, idade, tipo de alimentação ou criação.

Gennari (2004) relatou que, as ocorrências de cães soropositivos para *N. caninum* no Brasil, variam muito de região para região e entre os diferentes ambientes em que os cães habitam.

Estudos realizados em Salvador e Lauro de Freitas, Bahia, demonstraram que cães errantes e cães domiciliados não apresentaram diferenças significativas quanto à positividade para *N. caninum*. Também não foram observadas diferenças estatísticas entre as variáveis, raça, faixa etária, distrito de origem dos animais e sexo (JESUS et al., 2006).

Andreotti et al. (2006) avaliaram amostras de soro sanguíneo de gado de corte proveniente de Campo Grande e da região do Pantanal (MS), juntamente com amostras de soro sanguíneo de cães da zona rural. Anticorpos foram detectados por RIFI em cães e ELISA nos bovinos. Em vacas com histórico de abortamento a prevalência foi de 43% e vacas sem histórico apresentavam 7,7% de positividade. Portanto na região de Campo Grande a ocorrência de anticorpos para *N. caninum* foi 5,58 vezes maior em animais com histórico de abortamento. Nos cães a prevalência foi de 27,3%.

A ocorrência do *N. caninum* em cães provenientes do Município de Pelotas - RS, de diferentes ambientes, rurais e urbanos domiciliados foram examinados e amostras de soro de 339 cães foram testadas para a detecção de anticorpos para *N. caninum* mediante a reação de imunofluorescência indireta (RIFI \geq 1: 50). Anticorpos para *N. caninum* foram encontrados em 53 (15,6%) amostras de soro dos cães. Na área urbana a ocorrência foi de 5,5% e na área rural foi de 94,5%. Entre os cães da área rural, 14,1% (18 cães) eram de propriedades de criação de gado de leite e 28,4% (29 cães) de propriedade de corte (CUNHA FILHO, 2007).

A presença de anticorpos anti-*N. caninum* em cães da cidade de Goiânia - GO, capturados pelo Centro de Zoonoses de Goiânia (CCZ-GO), domiciliados e atendidos em hospitais veterinários, apresentou 32,9 % (65/197) de positividade no teste da RIFI, com títulos de 1:50. Entre os 72 animais provenientes do Centro de Zoonoses de Goiânia, 36,1 % (26/72) resultaram positivos e entre os 125 cães domiciliados atendidos por hospitais veterinários, 31,2 % (39/125) foram positivos para *N. caninum* (BOAVENTURA et al., 2008).

A tabela 2 mostra alguns estudos que relatam as freqüências de anticorpos anti-*N. caninum* em cães de diferentes estados do Brasil.

Tabela 2. Freqüência de anticorpos anti-*N. caninum* em cães no Brasil.

Estado	Procedência	Prevalência	Autor/Ano
PR	Rural	21,6%	SOUZA et al. (2002)
	Rural	20,8%	ROMANELLI et al. (2007)
SP	Errantes	25,0%	GENNARI et al. (2002)
	Urbana	13,3%	GENNARI et al. (2002)
BA	Errantes	11,2%	JESUS et al. (2006)
RO	Urbana	8,3%	CAÑON-FRANCO et al. (2003)
	Rural	12,6%	AGUIAR et al. (2006)
MS	Urbana	26,5%	OLIVEIRA et al. (2004)
	Urbana	10,7%	OLIVEIRA et al. (2004)
	Urbana	27,3%	ANDREOTTI et al. (2006)
MG	Peri-urbana	18,9%	FERNANDES et al. (2004)
	Rural	21,7%	FERNANDES et al. (2004)
PA	Urbana	8,4%	AZEVEDO et al. (2005)
GO	CCZ-GO	32,9%	BOA VENTURA et al. 2008
	Domiciliados	36,1%	BOA VENTURA et al. 2008
	Hospitais	31,2%	BOA VENTURA et al. 2008
	Veterinários		

A infecção por *N. caninum* pode ocorrer juntamente com outras doenças causadas por protozoários como é o caso da leishmaniose. Andreotti et al. (2001) observaram que cães urbanos do município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, apresentam-se soropositivos tanto para neosporose como para leishmaniose, não havendo relação entre estas duas enfermidades, uma vez que foram detectados animais soropositivos para apenas um dos agentes, quanto para ambos, sem diferenças estatísticas significativas.

1.5 Patogenia

A patogenia da neosporose depende do equilíbrio entre a capacidade dos taquizoítos em penetrar e se multiplicar nas células e a capacidade do hospedeiro de impedir essa proliferação. A invasão da célula hospedeira compreende dois eventos distintos: adesão à superfície da célula hospedeira e o processo de entrada na célula. O evento inicial no processo de adesão é mediado por contato de baixa afinidade, que subsequente conduz à secreção de micronemas. Em seguida ocorre ligação mais específica com a superfície da célula hospedeira, e a consequente invasão da célula. Para tanto, é necessário que haja a presença de receptores adequados na superfície da célula hospedeira que forneçam o sinal para a entrada do parasita no citoplasma celular (BUXTON et al., 2002).

Os taquizoítos de *N. caninum* interagem com a célula hospedeira por meio de mecanismos altamente conservados em todo o filo Apicomplexa. Mas em contraste com outros gêneros desse filo, que exibem considerável especificidade pela célula hospedeira, tanto *N. caninum* quanto *T. gondii* podem invadir e se proliferar em diferentes tipos de células de mamíferos, sugerindo assim, que eles possam reconhecer um ou vários receptores na superfície da célula hospedeira, para a adesão inicial e subsequente invasão (BUXTON et al., 2002).

O protozoário atinge células alvo pelas vias sanguíneas e linfáticas, reconhecendo a célula pela de invasão ativa por proteínas usadas como receptoras, sendo essa fase extremamente rápida, não exigindo mais que cinco minutos. Dentro das células, os parasitas se localizam em uma estrutura denominada vacúolo parasitóforo, que possui tênue camada membranosa, formada pela própria membrana da célula hospedeira, que separa os taquizoítos do citoplasma celular. O parasita provoca mudanças metabólicas nos hospedeiros, favorecendo ainda mais a invasão (HEMPHILL et al. 1996).

Os taquizoítos se multiplicam no hospedeiro definitivo por endodiogenia, produzindo várias centenas de parasitas em poucos dias após a infecção, provocando grande expansão do vacúolo levando à lise celular. Logo, os taquizoítos estão livres e infectam as células adjacentes iniciando todo o

processo novamente, levando à destruição de grande quantidade celular, e lesões significativas (HEMPHILL e GOTTSTEIN, 2006).

O estágio latente é representado pelos cistos teciduais, que são constituídos de uma grande parede cística que os protege, contendo bradizoítos, caracterizados pela multiplicação lenta (DUBEY e LINDSAY, 1996). Podem sobreviver por mais de quatorze dias a quatro graus Celsius (LINDSAY et al., 1999). Sabe-se que na forma intestinal o período pré-patente é de cinco a oito dias após a ingestão dos cistos teciduais, mas pouco se sabe sobre sua localização no órgão, ou a respeito das estruturas acometidas e, portanto de sua patogenia (LINDSAY e DUBEY, 2000).

Ao invadir as células uterinas, o parasita multiplica-se causando destruição local nos tecidos do feto e da mãe e estes tecidos iniciam uma resposta inflamatória. As lesões se estendem para a região corio-alantóide entre os cotilédones. Ao mesmo tempo em que essas lesões ocorrem, o parasita também entra na corrente sanguínea e invade outros tecidos, com predileção pelo sistema nervoso central, onde se localiza preferencialmente ao redor dos vasos sanguíneos. A destruição de células fetais, associada à inflamação linfóide, também pode ocorrer em outros tecidos, como coração, músculo esquelético, pulmão e fígado (BARR et al., 1994).

N. caninum é capaz de produzir lesões necróticas visíveis em poucos dias, causando morte celular pela multiplicação ativa dos taquizoítos, podendo produzir doenças neuromusculares graves em cães, bovinos e provavelmente em outras espécies, destruindo grande número de células neurais, incluindo nervos craniais e espinhais, afetando assim a condutibilidade dessas células (DUBEY, 1999).

Se o animal estiver com uma boa resposta imune, os taquizoítos se transformam em bradizoítos, formando os cistos teciduais localizados principalmente no sistema nervoso central. Este estágio é mantido na fase crônica da infecção na qual os animais são assintomáticos. Entretanto, no período de gestação o animal pode apresentar redução da imunidade e a infecção pode ser reativada. Os bradizoítos se transformam em taquizoítos e desenvolvem infecção aguda (QUINN et al., 2002).

Há poucos relatos de infecção natural em ovinos. A maior parte dos estudos sobre a neosporose nesta espécie advém de inoculações experimentais, cujas alterações clínicas e histopatológicas assemelham-se as da toxoplasmose ovina e neosporose bovina (BUXTON et al., 2002).

1.6 Sinais Clínicos

Tanto o hospedeiro definitivo quanto o intermediário podem ser portadores assintomáticos das formas latentes da neosporose, podendo ser reativadas ou exacerbadas por imunossupressão natural ou iatrogênica (GIRALDI et al., 2001).

Em inoculação experimental de ovelhas prenhes, Mcallister et al. (1996) observaram a ocorrência de abortamentos, fetos mumificados, natimortos, nascimento de filhotes fracos e nascimento de filhotes clinicamente saudáveis, mas congenitamente infectados, dependendo do período de gestação em que a fêmea foi infectada. Ovelhas inoculadas com 65 dias de gestação abortaram, enquanto as que foram inoculadas com 120 dias de gestação pariram cordeiros vivos. As ovelhas infectadas não apresentaram outros sinais clínicos além dos reprodutivos.

Buxton et al. (1998) demonstraram a ocorrência de morte e reabsorção embrionária, além de outras falhas reprodutivas, de acordo com a idade gestacional em que a ovelha foi infectada. O protozoário parece ter predileção pelo epitélio coriônico fetal e vasos sanguíneos placentários, induzindo vasculite, trombose e necrose de placentomas.

Jolley et al. (1999) verificaram que as ovelhas podem abortar repetidamente por neosporose após uma infecção inicial que se torna crônica, mas parece haver certo grau de imunidade contra novos abortamentos ou transmissão transplacentária.

Já em relação a neosporose em cães, a idade mínima relatada é de dois dias (BARBER e TREES, 1996), e a máxima de 15 anos (DUBEY, 2003). Os cães mais velhos são menos afetados clinicamente, porém quando acometidos apresentam envolvimento multifocal do sistema nervoso central e poliomiosite (GIRALDI et al., 2001).

Deve-se suspeitar de neosporose em qualquer caso clínico de cão com menos de um ano de idade que apresente desde fraqueza progressiva dos membros posteriores até um quadro de paralisia flácida (BARBER e TREES, 1996).

Os cães com neosporose desenvolvem paresia uni ou bilateral, flácida ou espástica, que evolui para paralisia progressiva, de curso agudo ou crônico, e podem sobreviver por vários meses (BARBERS e TREES, 1996), sendo que na maioria dos casos fatais, a infecção ocorre transplacentariamente (DUBEY, 1999). Posteriormente, *N. caninum* passou a ser reconhecido como causador de afecções neuromusculares, miocárdicas, pulmonares e dérmicas (GIRALDI et al., 2001).

Embora os sinais neurológicos da síndrome miosite-polirradiculoneurite variem de acordo com o local parasitado, os mais freqüentes são paresia de membros posteriores acompanhado de ataxia, atrofia de membros pélvicos e alterações proprioceptivas. Também pode ocorrer mialgia, cifoescoliose lombar, hiperextensão rígida de um ou ambos os membros posteriores, paresia uni ou bilateral dos membros anteriores, hemiparesia a quadriparesia, alterações de comportamento, cegueira, tremores cefálicos, convulsões, dificuldade de deglutição, incontinência fecal e urinária, flacidez muscular e paralisia dos maxilares (BARBER e TREES, 1996).

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

1.7 Diagnóstico

Os métodos diretos utilizados no diagnóstico e pesquisa de *N. caninum* são os exames histopatológicos, imunoistoquímica, isolamento *in vitro* e *in vivo* por inoculação do material suspeito em cultivo celular ou em animais de laboratório, detecção do DNA do parasita por PCR e a observação dos cistos nos tecidos a fresco (sem coloração) por microscopia óptica. Já entre os métodos indiretos estão RIFI, ELISA, NAT e Imunoblotting (IB) que podem

detectar anticorpos específicos para *N. caninum* (BJÖRKMAN e UGLLA, 1999, DUBEY, 2003).

Exames histopatológicos e imunoistoquímicos podem ser realizados a partir de amostras de cérebro, medula espinhal, coração, fígado, músculo esquelético, pulmão, rim, placenta, onde serão identificados os taquizoítos ou cistos de *N. caninum*. Microscopicamente as lesões são degenerativas e inflamatórias, com áreas de necrose multifocal com infiltração de células mononucleares (LINDSAY et al., 1993).

Considerando a extensa distribuição de casos de neosporose no mundo, são relatados relativamente poucos casos de isolamento com sucesso. Isto ocorre porque os fetos estão geralmente autolisados e o número de cistos teciduais de *N. caninum* serem relativamente pequeno. Porém, os desenvolvimentos de novos métodos para o aumento da concentração dos parasitos aumentam as chances de obtenção dos isolados (CONRAD et al., 1993).

Os taquizoítos de *N. caninum* podem ser mantidos por tempo indeterminado em cultivo celular e podem ser conservados em nitrogênio líquido, sem perda aparente da sua infectividade em camundongos (Swiss-Webster). Entre as células utilizadas no cultivo estão, monócitos e células endoteliais de artéria cardiopulmonar de bovinos, células *Vero* (rim de macaco) e Marc-145 (fibroblastos de pele humana) (DUBEY et al., 1996).

No isolamento de *N. caninum in vivo* a inoculação de tecidos infectados pode ser realizada em cultura de células ou em camundongos imunossuprimidos (DUBEY et al., 1988). Porém camundongos têm demonstrado resistência à infecção. Em contraste, gerbis são susceptíveis a infecção com *N. caninum* sem que seja necessária a imunossupressão (DUBEY et al., 1996).

No Brasil, Gondim et al. (2001) relataram o isolamento *in vivo* de *N. caninum* a partir de cérebro de cão. Em bovinos o isolamento *in vivo* e *in vitro* foi realizado em amostras de cérebro de fetos abortados de bovinos por Dittrich (2002) e em búfalos por Rodrigues et al. (2004).

As técnicas sorológicas são de grande valia, pois podem ser realizadas no animal vivo, apresentam alta sensibilidade e especificidade, e são indicadas

para avaliar a exposição e o risco de infecção (GONDIM et al., 2001). As condições experimentais *in vitro* são muito variadas e, como consequência, o título de anticorpos para *N. caninum* que determina a infecção em bovinos adultos, ainda não foi padronizado (DUBEY, 2003; GUIMARÃES et al., 2004).

A RIFI foi o primeiro método sorológico a ser utilizado para a pesquisa de anticorpos contra *N. caninum* (DUBEY et al., 1988). Neste método os taquizoítos de *N. caninum* são cultivados em diferentes linhagens de células e após processamento adequado são colocados em lâminas de microscopia, que são incubadas inicialmente com soros diluídos e em uma segunda etapa, com anti-soro espécie-específico, conjugado ao isotiocianato de fluoresceína, para a formação de um complexo imune estável. A detecção da fluorescência dos taquizoítos é feita em microscopia de fluorescência e os soros considerados reagentes (título >25), em uma primeira série de testes (triagem), deverão ser posteriormente diluídos na base dois a partir da diluição 1:25, objetivando-se conhecer a maior diluição que ainda gere sinal de fluorescência (titulação), encontrando como diluição final de 1:400 (BJORKMAN e UGGLA, 1999). Devido à utilização de taquizoítos intactos como antígeno nos testes da RIFI, o teste detecta principalmente anticorpos direcionados para antígenos presentes na superfície celular do parasita. Nas espécies de Apicomplexa, os antígenos de superfície são considerados mais específicos que os componentes intracelulares. Estudos epidemiológicos em diversos hospedeiros demonstram que testes da RIFI para *N. caninum* apresentam baixa ocorrência de reação cruzada com outros coccídeos. Isto é particularmente importante em relação a *T. gondii*. Por essa razão, o teste da RIFI é usado freqüentemente como teste de referência para detecção de anticorpos contra *N. caninum* (DUBEY, 2003) e, portanto, este método foi utilizado no diagnóstico da infecção em várias espécies animais, como: cães, raposas, gatos, bovinos, ovinos, caprinos, búfalos, eqüinos, roedores e primatas (DUBEY e LINDSAY, 1996; BJÖRKMAN e UGGLA, 1999).

O teste NAT foi aprimorado por Romand et al. (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 de diagnóstico 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 foram observadas especificidade e sensibilidade semelhantes às da RIFI (BJORKMAN e UGGLA, 1999).

A sedimentação dos taquizoítos formando ponto no fundo do poço é considerada como resultado negativo, ao passo que sedimentação difusa (em malha) representa resultado positivo. É bastante utilizado para sorodiagnóstico de animais selvagens pelo fato que não necessita de conjugado espécie-específica (CAÑON-FRANCO et al., 2003).

Grande avanço no diagnóstico da neosporose foi a utilização do ensaio imunoenzimático - ELISA (BJÖRKMAN et al., 1994). Enquanto na RIFI são utilizados como antígenos os taquizoítos inteiros, os ELISAs convencionais empregam o antígeno solúvel de taquizoítos (PARÉ et al., 1995; BJÖRKMAN e UGGLA, 1999). Existem outros testes de ELISA, como o competitivo para detectar anticorpos específicos para *Neospora* em bovinos com anticorpos monoclonais (Mab 4A4-2), direcionado ao antígeno de superfície de 65 kDa, e o Elisa ISCOM que foi desenvolvido com taquizoítos incorporados aos imunoestimulantes (BJÖRKMAN et al., 1994).

O teste de ELISA pode ser problemático devido à 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).

As reações cruzadas observadas no ELISA indireto podem ser decorrentes dos antígenos de *N. caninum* utilizados nos testes. O ELISA indireto contém antígenos solúveis, com preponderância de antígenos intracelulares, enquanto a RIFI contém taquizoítos fixados intactos, prevalecendo os 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 explicar a maior especificidade do teste de RIFI para *N. caninum* sobre o ELISA indireto (BJORKMAN e UGGLA, 1999).

A PCR é uma das técnicas mais importantes da biologia molecular, e representa grande avanço no diagnóstico de várias doenças, pela amplificação

de segmentos específicos do DNA. Este método de diagnóstico possibilitou a caracterização molecular do parasita *N. caninum* (DUBEY e LINDSAY, 1996) e levou a descoberta de que os isolados de *N. caninum* de cães e de bovinos pertencem a mesma espécie e são geneticamente idênticos (MARSH et al., 1998). As técnicas de PCR desenvolvidas têm como seqüência alvo a região ITS1 do DNA ribossômico e a seqüência Nc5 do DNA genômico de *N. caninum*. As técnicas de PCR permitem amplificar quantidades muito pequenas de DNA, mesmo em tecidos que estejam autolisados (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2002). A PCR é altamente sensível e específica para o diagnóstico da neosporose (ELLIS, 1998; ELLIS et al., 1999). Esta técnica vem sendo utilizada para detectar o DNA de *N. caninum*, tanto em infecções naturais quanto experimentais (HO et al., 1997).

1.8 Impactos Econômicos da Neosporose

Há poucos estudos que quantifiquem as perdas econômicas da neosporose. Não há estudos relacionados a esse tópico em ovinos.

Os prejuízos gerados com a doença em bovinos decorrem de abortamentos, redução do valor do animal, aumento do intervalo entre partos, infertilidade, aumento do descarte e queda da produção de leite (TREES et al., 1999). As perdas estimadas com abortamentos em bovinos por neosporose na Califórnia são de 35 milhões de dólares por ano (DUBEY, 1999).

Hernandez et al. (2001) verificaram que vacas soropositivas produziram 3 a 4% menos leite que vacas soronegativas. Já Barling et al. (2001) observaram associação entre soropositividade para *N. caninum* em bezerros de corte e redução do ganho de peso e peso vivo ao abate.

1.9 Potencial Zoonótico

Não se conhece ainda o potencial zoonótico deste parasita. Porém, já se reconhece que, quando a população humana entra em contato com o agente, apresenta algum grau de imunocomprometimento (DUBEY e LINDSAY, 1996; MINEO, 2008). Embora nenhum caso de neosporose tenha sido relatado em

humanos, anticorpos anti-*N. caninum* já foram detectados na espécie (MINEO, 2008).

Em experimento realizado com primatas não humanos (*Macaca mulata*), Barr et al. (1994) observaram que o agente inoculado em fêmeas prenhes causa lesões que se assemelham muito às aquelas causadas por toxoplasmose congênita, demonstrando provável potencial zoonótico.

Tranas et al. (1999) observaram 69 soros positivos (6,7%) dentre 1029 soros de doadores de sangue no estado da Califórnia, EUA, pela reação de imunofluorescência indireta à diluição 1:100, mas à diluição 1:200 todos foram negativos. Porém, Robert et al. (1998) não encontraram nenhum soro positivo entre 500 amostras de mulheres grávidas da França pela RIFI à diluição 1:80, assim como Petersen et al. (1999), que investigaram soros de 76 mulheres da Dinamarca com histórico de abortamento pelas técnicas de ELISA, RIFI e Western blot e não encontraram nenhum soro positivo.

Estudos realizados por Lobato et al. (2006) indicaram a exposição ou a infecção por *N. caninum* em humanos, particularmente em pacientes infectados com HIV (38% soropositivos para *N. caninum*) e em pacientes com distúrbios neurológicos (18% soropositivos para *N. caninum*), que poderiam ter infecções oportunistas e simultâneas com *T. gondii*. Além disso, observaram também a importância de métodos sorológicos complementares ou de procedimentos diagnósticos multidisciplinares, tais como PCR e imunistoquímica com o material coletado pela biópsia ou na autópsia, para uma melhor caracterização da infecção humana pelo agente. Estes achados podem trazer interesse novo ao quadro clínico instável de pacientes infectados com HIV e o papel real da infecção de *N. caninum* em pacientes imunocomprometidos.

1.10 Prevenção e Controle

As medidas de prevenção e controle para neosporose muitas vezes podem tornar-se inviáveis economicamente ou pouco práticas. Ainda não há tratamento efetivo contra a neosporose. Estudos utilizando drogas antiprotozoárias em bezerros infectados têm mostrado algum efeito na diminuição da disseminação do parasita no animal. Já em relação à vacinação,

há indícios de que as vacinas inativadas conferem certa imunidade na prevenção da transmissão vertical. Porém, a prevenção do abortamento é discutível e o uso é preconizado apenas para a espécie bovina (DUBEY, 2003).

As medidas de prevenção e controle para a espécie ovina são: uso de receptoras soronegativas na transferência de embrião, uso de maternidades individuais, redução da exposição de cães a fetos abortados e placentas, enviar ao laboratório fetos abortados e placentas para diagnosticar a causa do aborto, reduzir o número de cães coabitando com o rebanho, evitar o acesso de canídeos domésticos ou selvagens a silos e depósitos de ração, e realizar a sorologia do rebanho e dos cães coabitantes (ALMEIDA, 2004).

Os cães não devem ter contato com tecidos infectados de hospedeiros intermediários ou até mesmo com as fezes de outros canídeos. O tratamento de cães com sinais neurológicos é longo, com prognóstico reservado a desfavorável. Os medicamentos utilizados no tratamento da neosporose clínica em cães incluem clindamicina 7,5 a 15 mg/Kg por via oral ou subcutânea a cada 8 horas, durante 4 a 8 semanas, trimetropim-sulfonamida 15 a 20 mg/Kg por via oral a cada 12 horas, durante 4 a 8 semanas, e pirimetamina-sulfonamida 15 a 30 mg/Kg por via oral a cada 12 horas, durante 4 a 8 semanas (GREENE, 2006).

É inviável descartar todos os animais soropositivos de uma propriedade com alta soroprevalência. Por outro lado, o descarte de animais soropositivos com histórico de abortamento baseado no resultado sorológico de apenas um animal da propriedade também não é uma medida racional, já que muitos animais soropositivos podem ter abortado por outras causas. A avaliação geral da propriedade utilizando análise soroepidemiológica e histórico reprodutivo constituem-se na melhor maneira para iniciar um programa de controle e prevenção da doença. Compra de animais com pelo menos dois resultados negativos para *N. caninum* também se constitui em medida preventiva (DUBEY, 2003).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a ocorrência de anticorpos contra *N. caninum* em ovinos e cães naturalmente infectados através da RIFI, em propriedades rurais localizadas na microrregião de Araraquara e pertencentes aos municípios de Ibitinga, Itápolis, Borborema e Tabatinga, São Paulo, Brasil.

2.2 Objetivo específico

Analisar fatores determinantes da presença ou ausência de anticorpos contra *N. caninum* em ovinos e cães, associando o resultado da sorologia as variáveis das propriedades, obtidas através da aplicação de questionário epidemiológica.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 População e amostragem

A microrregião de Araraquara é típica de cerrado e mata atlântica e apresenta clima tropical (IBGE, 2010), caracterizado por temperaturas médias de inverno não inferior a 18°C e no verão, acima de 24°C, porém sem estação invernal definida e forte precipitação anual (INPE, 2010).

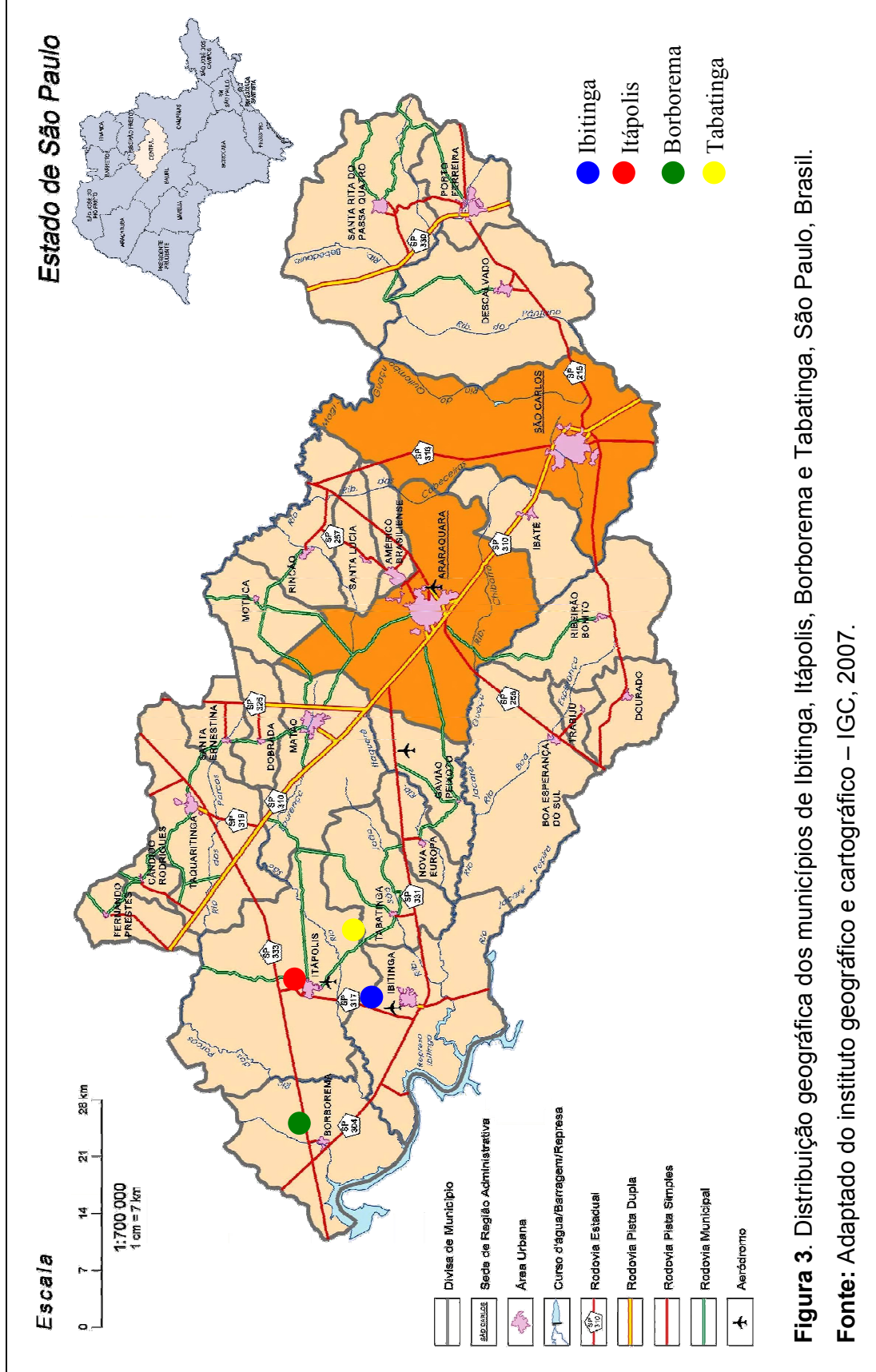
Do total de 4228 ovinos de 16 propriedades rurais, foram colhidas amostras de sangue de 1497 ovelhas e de todos os cães que habitam estas propriedades (Tabela 3), localizadas no estado de São Paulo e pertencentes aos municípios de Ibitinga, Itápolis, Borborema e Tabatinga (Figura 3).

Os critérios para inclusão das propriedades rurais foram pertencer à microrregião de Araraquara (Américo Brasiliense, Araraquara, Boa Esperança do Sul, Borborema, Dobrada, Gavião Peixoto, Ibitinga, Itápolis, Matão, Motuca, Nova Europa, Rincão, Santa Lúcia, Tabatinga e Trabiju) e ter obrigatoriamente cães coabitando com ovinos. Segundo o último censo pecuário (IBGE, 2006) a população ovina na microrregião de Araraquara está distribuída da seguinte forma: Américo Brasiliense (300), Araraquara (997), Boa Esperança do Sul (385), Borborema (742), Dobrada (244), Gavião Peixoto (650), Ibitinga (1253), Itápolis (3066), Matão (273), Motuca (211), Nova Europa (131), Rincão (42), Santa Lúcia (75), Tabatinga (134) e Trabiju (238).

O tamanho da amostragem foi calculado utilizando o programa Bioestat 5.0 com prevalência de 12,6%, erro de 5% e intervalo de confiança de 95%.

Tabela 3. Número de propriedades rurais de acordo com os municípios, número total de animais dos rebanhos ovinos e número de ovinos e cães amostrados

Propriedade	Município	Nº total animais (rebanho ovino)	Nº ovinos amostrados	Nº cães amostrados
1	Ibitinga	100	63	2
2	Ibitinga	330	113	3
3	Ibitinga	600	133	5
4	Ibitinga	81	55	1
5	Ibitinga	100	63	1
6	Itápolis	240	100	2
7	Itápolis	550	131	3
8	Itápolis	220	96	6
9	Itápolis	470	126	5
10	Itápolis	240	100	2
11	Borborema	305	110	4
12	Borborema	445	124	2
13	Borborema	57	43	1
14	Tabatinga	80	55	1
15	Tabatinga	170	85	3
16	Tabatinga	240	100	1
		4228	1497	42



3.2 Colheitas das amostras

As amostras de sangue dos ovinos foram colhidas por venocentese jugular e dos cães por venocentese jugular ou cefálica, utilizando-se agulhas descartáveis 40x12 e 25x7, e tubos de ensaio sem anticoagulante devidamente identificados com o número de cada animal. As amostras foram encaminhadas ao laboratório, onde foram registradas e centrifugadas durante 10 minutos a 3000 rotações por minuto (rpm) para a obtenção do soro, que foi aliquotado em microtubos etiquetados e congelados de -4°C a -8°C até a realização da sorologia.

3.3 Variáveis estudadas

O estudo envolveu a colheita de amostras de sangue de ovinos e cães coabitantes nas 16 propriedades rurais. Durante o experimento foi aplicado um questionário epidemiológico em cada uma das propriedades, sendo entrevistado o proprietário ou responsável pelo manejo dos animais. O questionário abordou aspectos epidemiológicos relativos à atividade principal e tipo de exploração da propriedade, tipo de abastecimento de água, ocorrência de abate de animais na propriedade, número de cães na propriedade, tipo de alimentação dos animais, presença de outros canídeos selvagens ou domésticos, presença de roedores, tipo de criação das aves domésticas (*Gallus gallus domesticus*) e históricos de problemas reprodutivos e neurológicos nos animais (Anexo 1).

3.4 Exame sorológico

Os exames foram realizados no Laboratório do Núcleo de Pesquisa em Zoonoses (NUPEZO) do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu – SP.

A RIFI foi empregada para a pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum*. Esta prova foi escolhida, pois é considerada a metodologia de referência para a pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* (DUBEY et al., 1988).

O princípio da RIFI é a detecção de anticorpos direcionados aos antígenos de superfície celular dos taquizoítos de *N. caninum*. Como esses antígenos são considerados mais específicos do que os componentes intracelulares, os taquizoítos inteiros de *N. caninum* foram fixados nos orifícios de lâminas adequadas para este fim. Os anticorpos contra *N. caninum* presentes no soro, ligam-se aos taquizoítos do parasita. A seguir, utiliza-se anti-soro específico, conjugado ao isotiocianato de fluoresceína, para a formação de um complexo imune estável. Esta reação é detectada pela fluorescência dos taquizoítos.

As lâminas, utilizadas como antígenos, foram produzidas no laboratório do NUPEZO, com a cepa NC-1 de *N. caninum*, mantida *in vitro*, cedida gentilmente pela Professora Dra. Solange Maria Gennari e pela médica veterinária Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena, da Universidade de São Paulo – USP – São Paulo. Para a manutenção da cepa NC-1 de *N. caninum in vitro* foi utilizado cultura em células *Vero*, cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino a 10%. As amostras de soros foram inicialmente triadas, considerando-se como ponto de corte o título 25. Em microplacas, seguindo-se protocolo, foram diluídos 5µL de cada amostra de soro em 120µL solução salina tamponada (SST) pH 7,2; incluindo-se os soros controles positivo e negativo. Após diluição, foi pipetados 10µL de cada amostra de soro nos poços das lâminas, que foram incubadas em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos. A seguir foram lavadas, com SST pH 7,2 em dois banhos de 10 minutos cada. Após secagem, foi adicionado em cada poço da lâmina, o conjugado anti-IgG ovino e canino preparado em solução de azul de Evans, previamente diluído 1:5 em SST pH 7,2 (Figura 4).

Para a titulação das amostras positivas, foram testadas diluições ao dobro, ou seja, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800. Nos casos de ocorrência de reação na última diluição testada, as amostras foram submetidas a novas diluições, para obtenção do título final.

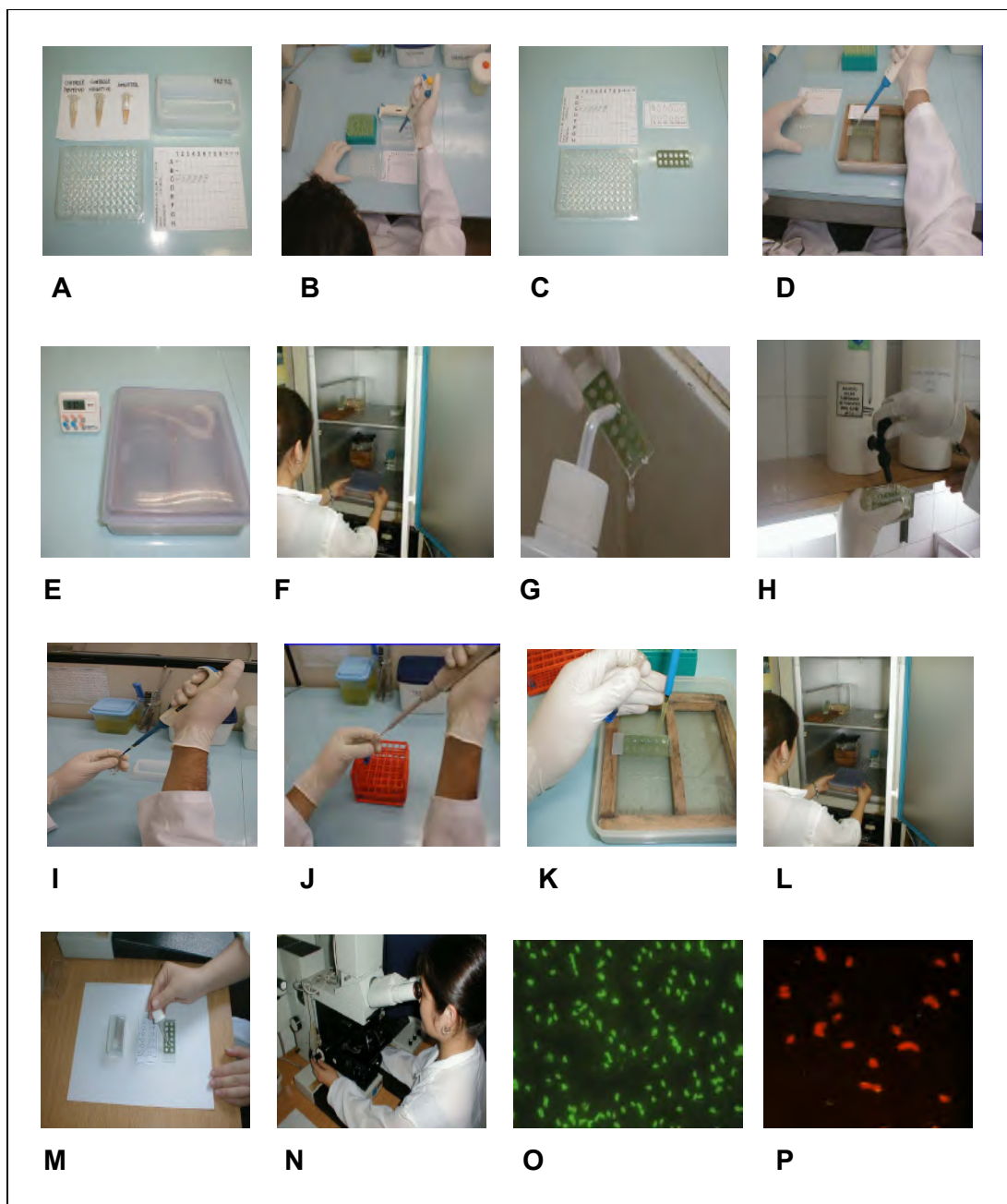


Figura 4. Técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI. **A e B** (Diluição dos soros controles e testes); **C e D** (Sensibilização das lâminas com os soros); **E e F** (Primeira incubação de 30 minutos a 37°C); **G e H** (Primeira lavagem e imersão em PBS 7,2 durante 10 minutos); **I, J e K** (Preparação do conjugado e adição na lâmina); **L** (Segunda incubação de 30 minutos a 37°C); **M** (Adição de glicerina na lâmina para colocação de lamínula); **N** (Leitura da lâmina em microscópio de fluorescência); **O** (RIFI positiva) e **P** (RIFI negativa).

Fonte: Núcleo de pesquisa em zoonoses - NUPEZO - FMVZ - UNESP

3.5 Análise estatística

As variáveis foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado e teste G com nível de significância de 5%. O programa Bioestat 5.0 foi utilizado para cálculo das associações considerando como significativo $P < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Sorologia

Das 1497 amostras de sangue ovino analisadas pela RIFI, 8,0% (120/1497) foram soropositivas com título ≥ 25 (Tabela 4), sendo o título de maior frequência 100 (29,2%), seguido dos títulos 50 (27,5%), 200 (24,5%), 25 (15,8%) e 400 (3,3%) (Tabela 5). Das 42 amostras de sangue canino analisadas pela RIFI, 4,8% (2/42) foram soropositivas (Tabela 4), com título 50 (Tabela 6).

4.2 Análise descritiva das propriedades

O tamanho das 16 propriedades rurais foram bastante heterogêneas, variando de 15 a 200 alqueires. Em 81,25% (13/16) das propriedades a atividade principal era mista (agricultura e pecuária), seguido de agricultura em 12,5% (2/16) e pecuária em 6,25% (1/16) e todas elas dedicavam-se a ovinocultura de corte e ao sistema extensivo.

O número total de ovinos nos rebanhos variou de 57 a 600 animais. A idade variou de 10 meses a 5 anos, sendo 54,7% (819/1497) dos animais cruzados (Santa Inês e Dorper), 28,3% (424/1497) Santa Inês e 17% (254/1497) Dorper. A alimentação em todas as propriedades era pastagem (*Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*), feno e ração comercial. O abastecimento de água dos animais em 14 (87,5%) propriedades era de poço artesiano e 2 (12,5%) represa.

O número total de cães nas propriedades variou de 1 a 6 animais. 56,3% (24/42) dos cães eram machos e 43,7% (18/42) fêmeas. 68,67% (29/42) tinham idade entre 1 a 3 anos, sendo 31,35% (13/42) com idade superior a 3 anos. 50,0% (21/42) era SRD (sem raça definida), 31,25% (13/42) Border Collie e 18,75% (8/42) Pastor Maremano. Em 93,75% (15/16) das propriedades eles eram criados soltos e em 6,25% (1/16) presos. 75,0% (12/16) das propriedades forneciam ração aos cães e 25,0% (4/16) comida caseira, sendo o abastecimento de água em todas as propriedades de poço artesiano.

Todas as propriedades relatam à presença de outros canídeos, tendo em 12,5% (2/16) das propriedades a presença de canídeos selvagens e em 87,5% (14/16) de cães de propriedades vizinhas.

Todas elas tem criação de aves domésticas (*Gallus gallus domesticus*), sendo que em 93,75% (15/16) das propriedades as aves são criadas soltas e em 6,25% (1/16) fechadas em galinheiros.

Foram relatadas a presenças de roedores (*Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* e/ou *Mus musculus*) em 14 (87,5%) das propriedades.

Em todas as propriedades ocorre abate de ovinos, aves e suínos e os cães têm acesso as vísceras e carne crua dos animais abatidos 62,5% (10/16) das propriedades.

Problemas reprodutivos ocorrem em 87,5% (14/16) das propriedades, sendo mais freqüentes: abortamento (47,7%), repetição de cio (40,7%) e natimortos (11,6%). Os abortos ocorreram em 30,4% dos casos no terço inicial, 26,0% no terço final e 21,7% no segundo terço de gestação. Os diagnósticos das falhas reprodutivas não foram concluídos nas em todas as propriedades. Não foram relatados tanto nas ovelhas como nos cães distúrbios neurológicos.

Nenhuma das propriedades realizava período de quarentena e sorologia prévia para doenças infecciosas e parasitárias na compra e antes da introdução de novos animais nos rebanhos.

Tabela 4. Total de ovelhas e cães soropositivos e soronegativos para anticorpos contra *N. caninum* pela RIFI nas 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010.

PR	Ovinos			Cães		
	N	SP (%)	SN (%)	N	SP (%)	SN (%)
1	63	0 (0,0)	0 (0,0)	2	0 (0)	2 (100,0)
2	113	18 (15,9)	95 (84,1)	3	0 (0)	3 (100,0)
3	133	0 (0,0)	133 (100,0)	5	0 (0)	5 (100,0)
4	55	13 (23,6)	42 (76,4)	1	1 (100,0)	0 (0,0)
5	63	8 (12,7)	55 (87,3)	1	0 (0)	1 (100,0)
6	100	21 (21,0)	79 (79,0)	2	0 (0)	2 (100,0)
7	131	11 (8,4)	120 (91,6)	3	0 (0)	3 (100,0)
8	96	24 (25,0)	72 (75,0)	6	0 (0)	6 (100,0)
9	126	0 (0,0)	126 (100,0)	5	0 (0)	5 (100,0)
10	100	18 (18,0)	82 (82,0)	2	0 (0)	2 (100,0)
11	110	0 (0,0)	110 (100,0)	4	0 (0)	4 (100,0)
12	124	0 (0,0)	124 (100,0)	2	0 (0)	2 (100,0)
13	43	0 (0,0)	43 (100,0)	1	0 (0)	1 (100,0)
14	55	0 (0,0)	55 (100,0)	1	0 (0)	1 (100,0)
15	85	7 (8,2)	78 (91,8)	3	1 (33,3)	2 (66,7)
16	100	0 (0,0)	100 (100,0)	1	0 (0)	1 (100,0)
Total	1497	120	1377	42	2	40

Legenda: PR: Propriedades rurais, N: Amostras analisadas, SP: Soropositivos e SR: Soronegativos.

Tabela 5. Ocorrência de anticorpos contra *N. caninum* pela RIFI nas ovelhas e cães das 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010.

Propriedades Rurais	Ovinos		Cães	
	Nº Amostras Analisadas	Sororreagentes %	Nº Amostras Analisadas	Sororreagentes %
1	63	0 (0,0)	2	0 (0)
2	113	18 (1,2)	3	0 (0)
3	133	0 (0,0)	5	0 (0)
4	55	13 (0,9)	1	1 (2,4)
5	63	8 (0,5)	1	0 (0)
6	100	21 (1,4)	2	0 (0)
7	131	11 (0,7)	3	0 (0)
8	96	24 (1,6)	6	0 (0)
9	126	0 (0,0)	5	0 (0)
10	100	18 (1,2)	2	0 (0)
11	110	0 (0,0)	4	0 (0)
12	124	0 (0,0)	2	0 (0)
13	43	0 (0,0)	1	0 (0)
14	55	0 (0,0)	1	0 (0)
15	85	7 (0,5)	3	1 (2,4)
16	100	0 (0,0)	1	0 (0)
Total	1497	120 (8,0%)	42	2 (4,8%)

Tabela 6. Distribuição das ocorrências de títulos de anticorpos obtidos pela RIFI nas ovelhas das 16 propriedades pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010.

Título	Nº Amostras Positivas	Ocorrência %
25	19	15,8
50	33	27,5
100	35	29,2
200	29	24,2
400	4	3,3
800	0	0,0
Total	120	100,0

Tabela 7. Distribuição das ocorrências de títulos de anticorpos obtidos pela RIFI nos cães das 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010.

Título	Nº Amostras Positivas	Ocorrência %
25	0	0
50	2	100,0
100	0	0
200	0	0
400	0	0
Total	2	100,0

Tabela 8. Associação entre a variável tamanho da propriedade com a soropositividade dos ovinos obtidos pela RIFI nas 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010.

Tamanho da Propriedade	Soropositivos	Soronegativos	<i>P</i>
(até 50 alq.)	74 (5,1%)	768 (18,4%)	
(51 a 100 alq.)	39 (2,9%)	531 (23,2%)	0,4164
(> 100 alq.)	7 (0,5%)	78 (50,3%)	

Tabela 9. Associação entre a variável atividade principal da propriedade com a soropositividade dos ovinos obtidos pela RIFI nas 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010.

Atividade Principal	Soropositivos	Soronegativos	<i>P</i>
Pecuária	8 (0,5%)	55 (3,6%)	
Agricultura	45 (3,0%)	151 (10,1%)	0,1614
Mista	67 (4,5%)	1171 (78,2%)	

Tabela 10. Associação entre a variável abastecimento de água das ovelhas com a soropositividade dos ovinos obtidos pela RIFI nas 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara São Paulo, Brasil, 2010.

Abastecimento de água	Soropositivos	Soronegativos	P	OR	IC (95%) OR
Represa	32 (13,8 %)	199 (86,2 %)	0,0004	2,1	1,39≤OR≤3,3
Poço Artesiano	88 (6,9%)	1178 (93,1 %)		5	1

Tabela 11. Associação entre a variável presença de outros canídeos domésticos ou selvagens com a soropositividade dos ovinos obtidos pela RIFI nas 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010.

Presença de outros canídeos	Soropositivos	Soronegativos	P	OR	IC (95%) OR
Selvagens	18 (15,9%)	95 (84,1%)	0,0013	2,38	1,38≤OR≤4,09
Domésticos	102 (7,3%)	1282 (92,6%)			

Tabela 12. Associação entre a variável tipo de criação de aves domésticas (*Gallus gallus domesticus*) com a soropositividade dos ovinos obtidos pela RIFI nas 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010.

Tipo de criação	Soropositivos	Soronegativos	P
Soltas	109 (7,3%)	1257 (83,2%)	0,8665
Fechadas	11 (0,7%)	120 (8,0%)	

Tabela 13. Associação entre a variável presença de roedores com a soropositividade dos ovinos obtidos pela RIFI nas 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010.

Presença de roedores	Soropositivos	Soronegativos	P
Sim	113 (7,5%)	1292 (86,3%)	0,8819
Não	7 (0,4%)	85 (5,7%)	

Tabela 14. Associação entre a variável abate de animais na propriedade com a soropositividade dos ovinos obtidos pela RIFI nas 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010.

Abate de animais na propriedade	Soropositivos	Soronegativos	P
Sim	94 (6,6%)	1124 (86,7%)	0,3989
Não	26 (1,4%)	253 (5,3%)	

Tabela 15. Associação entre a variável acesso dos cães a carne crua e vísceras dos animais abatidos ou de outros animais com a soropositividade dos ovinos obtidos pela RIFI nas 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010.

Cães acesso carne crua ou vísceras	Soropositivos	Soronegativos	P
Sim	78 (7,8%)	903 (89,1%)	0,8984
Não	42 (0,9%)	474 (2,8%)	

Tabela 16. Associação entre a variável tipo de criação dos cães com a soropositividade dos ovinos obtidos pela RIFI nas 16 propriedades pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010.

Tipo de criação dos cães	Soropositivos	Soronegativos	P
Soltos	112 (7,5%)	1322 (88,3%)	0,1620
Fechados	8 (0,5%)	55 (3,7%)	

Tabela 17. Associação entre a variável presença ou ausência de problemas reprodutivos com a soropositividade dos ovinos obtidos pela RIFI nas 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010.

Problemas reprodutivos	Soropositivos	Soronegativos	P	OR	IC (95%) OR
Sim	57 (10,8%)	469 (89,2%)	0,0031	1,75	1,20 ≤ OR ≤ 2,54
Não	63 (6,5%)	908 (93,5%)			

Tabela 18. Associação entre a variável tipo de criação com a soropositividade dos cães obtidos pela RIFI nas 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara, Brasil, 2010.

Tipos de criação dos cães	Soropositivos	Soronegativos	<i>P</i>
Soltos	2 (4,8%)	38 (90,40%)	0,6547
Fechados	0 (0%)	2 (4,8%)	

Tabela 19. Associação entre a variável acesso dos cães a carne crua dos animais abatidos na propriedade e de outros animais com a soropositividade dos cães obtidos pela RIFI nas 16 propriedades rurais pertencentes à microrregião de Araraquara, São Paulo, Brasil, 2010.

Acesso dos cães a carne crua ou vísceras	Soropositivos	Soronegativos	<i>P</i>
Sim	1 (2,4%)	38 (90,4%)	0,6184
Não	1 (2,4%)	2 (4,7%)	

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Este foi o primeiro estudo epidemiológico envolvendo a espécie ovina e canina em propriedades rurais da microrregião de Araraquara, apresentando os ovinos ocorrência de (8,0%) e cães (4,8%) (Tabela 4). Esta microrregião apresenta condições climáticas adequadas para manutenção de oocistos de *N. caninum* no meio ambiente, de acordo com Sanderson et al. (2000), que afirmam que fatores climáticos, como umidade e temperatura, influenciam a esporulação.

No Brasil os estudos sorológicos da infecção por *N. caninum* em ovinos e cães têm demonstrado índices de soropositividade variáveis. Romanelli et al. (2002) e Munhoz (2009) no Paraná, Otero et al. (2002) na Bahia, Figliuolo et al. (2004) em São Paulo, Aguiar et al. (2004) em Rondônia e Vogel et al. (2006) no Rio Grande do Sul, encontraram 13,91%, 9,5%, 7,4%, 9,2%, 29% e 3,2% de ovinos soropositivos respectivamente.

Souza et al. (2002) e Romanelli et al. (2007) no Paraná, Gennari et al. (2002) em São Paulo, Jesus et al. (2006) na Bahia, Cañon-franco et al. (2003) e Aguiar et al. (2006) em Rondônia, Oliveira et al. (2004) e Andreotti et al. (2006) no Mato Grosso do Sul, Fernandes et al. (2004) em Minas Gerais, Azevedo et al. (2005) no Pará, Boa ventura et al. (2008) em Goiás, encontraram 13,3%, 11,2%, 8,3%, 12,6%, 26,5%, 27,3%, 18,9%, 8,4%, 32,9% de cães soropositivos respectivamente.

Ressalta-se que a comparação entre trabalhos que utilizam diferentes testes sorológicos com variados pontos de corte deve ser utilizada com cautela, uma vez que ocorrem diferenças na sensibilidade e especificidade entre os testes empregados (BJÖRKMAN et al., 1999). No presente estudo encontrou-se 50% (8/16) das propriedades com ovinos sororreagentes ao *N. caninum* (Tabela 4). Figliuolo et al. (2004), em 30 propriedades no estado de São Paulo, observaram que 86,6% apresentavam ovinos positivos a RIFI e Munhoz (2009) no estado do Paraná, encontrou em 81,82% (9/11) das propriedades ovinos soropositivos. A comparação com os resultados obtidos com outros trabalhos é limitada, pois as propriedades diferem quanto ao número de animais, tamanho,

manejo e tecnificação, sendo que algumas propriedades desenvolvem agricultura familiar, com animais criados na sua maioria para consumo próprio.

Duas (12,5%) das 16 (100%) propriedades estudadas apresentaram cães sororreagentes ao *N. caninum*. Das 8 propriedades que apresentaram ovinos positivos, apenas duas (25%) tinham cães positivos (Tabela 4), o que sugere a transmissão vertical do parasita aos ovinos (BUXTON et al., 1997); apesar de cães errantes de outras propriedades vizinhas e mesmo da zona urbana serem encontrados no meio dos rebanhos.

Os títulos mais freqüentes nos ovinos foram 50 (27,5%), 100 (29,2%) e 200 (24,2%) (Tabela 6) semelhantes aos encontros por Figliuolo et al. (2004) e Munhóz (2009), enquanto que para os cães obteve-se o título 50 em ambos.

A associação entre tamanho da propriedade rural e atividade principal com os resultados obtidos nos ovinos, não mostrou diferença estatística significativa ($P=0,4164$) (Tabela 8) e ($P=0,1614$) (Tabela 9), o que vem ao encontro ao obtido por Barling et al. (2001) e Munhóz (2009). Todas as propriedades adotavam sistema de produção extensivo, no entanto, nas propriedades com sistema semi-intensivo ou intensivo acredita-se que a ocorrência da doença seja menor, devido às melhores condições sanitárias, menor aglomeração de animais, separação do rebanho por idade, sexo e finalidade de produção, além de mão-de-obra mais qualificada (BARLING et al, 2001).

Foram observadas diferenças significativas quanto aos resultados e associação entre o abastecimento de água ($P=0,0004$; $OR=2,15$) (Tabela 9), provavelmente pelo fato das represas serem mais exposta as fezes dos cães, hospedeiros definitivos na neosporose (GREENE, 2006).

A associação entre a presença de outros canídeos domésticos ou selvagens com os resultados, não revelou diferença estatística ($P=0,0013$; $OR=2,38$) (Tabela 10), discordando dos resultados de Ueno (2005) e Munhóz (2009).



Chrysocyon brachyurus
(Lobo-guará)



Cerdocyon thous
(Cachorro-do-mato)



Pseudalopex vetulus
(Raposinha)



Pseudalopex gymnocercus
(Raposinha-do-campo)



Atelocynus microtis
(Cachorro-do-mato-de-orelhas-curtas)



Speothos venaticus
(Cachorro-do-mato-vinagre)

Figura 5. Canídeos brasileiros.

Fonte: Adaptado de JÚNIOR et al. (2003).

No Brasil há seis espécies de canídeos selvagens (Figura 5), sendo uma delas da subfamília Symcyoninae, a *Speothos venaticus* (Cachorro-do-mato-vinagre), e as demais da subfamília Caninae: *Chrysocyon brachyurus* (Lobo-guará), *Cerdocyon thous* (Cachorro-do-mato), *Lycalopex vetulus* (Raposinha), *Pseudalopex gymnocercus* (Raposinha-do-campo) e *Atelocynus microtis* (Cachorro-do-mato-de-orelha-curta) (JÚNIOR et al., 2003).

A distribuição geográfica no Brasil dos canídeos selvagens: *Chrysocyon brachyurus* (Região centro-sul e nordeste), *Cerdocyon thous* (ocorrem em todas as regiões, exceto nas áreas baixas da bacia amazônica), *Atelocynus microtis* (Região sul da bacia amazônica), *Pseudalopex gymnocercus* (Região sul), *Pseudalopex vetulus* (Região central e sudeste) e *Speothos venaticus* (Região norte, central, sul e sudeste) (REIS et al., 2006).

No Brasil, poucos estudos sorológicos foram realizados em canídeos selvagens. Dentre as espécies brasileiras testadas para *N. caninum*, encontraram-se resultados positivos para lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (VITALIANO et al., 2004), raposinha-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*) e cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) (CÂNONFRANCO et al., 2004). A presença de canídeos selvagens em propriedades rurais tem aumentado significativamente, o que dificulta o controle e potencializa a transmissão da doença para os rebanhos, principalmente quando tem acesso a ração e fonte de água dos animais (ROMANELLI et al., 2007).

Nas 16 propriedades estudadas foram encontradas criações de aves domésticas (*Gallus gallus domesticus*), sendo que em 93,75% (15/16) elas eram mantidas soltas e 6,25% (1/16) fechadas em galinheiros. A associação entre o tipo de criação das aves e a soropositividade das ovelhas não revelou diferença estatística ($P=0,8665$) (Tabela 11). Até 2007, somente mamíferos haviam sido identificados como hospedeiros naturais de *N. caninum*, entretanto o parasito foi detectado em galinhas, o que confere uma distribuição ainda mais ampla do agente, fato de grande importância epidemiológica (COSTA et al., 2008). Foi demonstrada a excreção de oocistos por cães que consumiram ovos de galinha embrionados infectados experimentalmente com *N. caninum*, sugerindo que as galinhas participem na transmissão do parasito (FURUTA et

al., 2007). Da mesma forma é possível que outras espécies de aves possam se infectar com o parasito, participando na disseminação da doença.

Em 87,5% (14/16) das propriedades encontrou-se roedores (*Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* e/ou *Mus musculus*), entretanto, não houve associação entre a presença destes e os resultados obtidos ($P=0,8819$) (Tabela 12). A infecção natural por *N. caninum* em ratos e camundongos, animais de distribuição cosmopolita, considerados sinantrópicos foi assinalada por (HUANG et al., 2004; FERROGLIO et al., 2007; JENKINS et al., 2007). Desconhece-se a eficiência da transmissão do parasito de roedores naturais infectados para outras espécies animais, porém sabe-se que o carnivorismo contribui na disseminação do parasito.

A associação entre o abate de animais na propriedade e acesso de cães a carne crua e vísceras destes animais não apresentou diferença significativa ($P=0,3989$) (Tabela 13) e ($P=0,8984$) (Tabela 14), no entanto, carne crua ou vísceras são vias de transmissão importantes para a infecção canina e manutenção do ciclo epidemiológico da doença (GONDIM et al., 2004).

Não houve diferença estatística entre a variável tipo de criação dos cães com a soropositividade dos ovinos ($P=0,6130$) (Tabela 16), o que está de acordo com os resultados encontrados por Ueno (2005) e Munhóz (2009). Por outro lado, houve associação da presença ou ausência de problemas reprodutivos com a soropositividade dos ovinos ($P=0,0031$; $OR=0,25$) (Tabela 16), também de acordo com Barling et al. (2001), no Texas.

Diferenças estatísticas não foram encontradas na associação entre soropositividade dos cães e as variáveis: tipo de criação ($P=0,6547$) (Tabela 17) e acesso a carne crua ou vísceras ($P=0,6184$) (Tabela 18), sendo que o tipo de criação e alimentação dos cães interferem na ocorrência da doença (GREENE, 2006).

Em 12 (75,0%) das propriedades o proprietário e os tratadores de animais não conheciam a neosporose e seus sinais clínicos, o que mostra o despreparo destes para a criação de ovinos.

Os sinais clínicos apresentados pelos animais com neosporose são semelhantes para diversas doenças infecciosas e parasitárias, devendo

sempre considerá-la como diagnóstico diferencial para problemas reprodutivos nos rebanhos ovinos (GREENE, 2006).

A falta de informações sobre a epidemiologia do agente tem limitado substancialmente a proposição de soluções objetivas e práticas para prevenir a infecção, sendo que as medidas profiláticas principais consistem na diminuição da exposição dos animais as possíveis fontes de infecção.

Existe uma demanda crescente para que seja elaborada uma vacina a fim de prevenir abortamentos em ovinos e/ou impedir a excreção de oocistos pelos hospedeiros definitivos.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos indicam a ocorrência de anticorpos contra *N. caninum* em 50% (8/16) dos rebanhos, 8% (120/1497) dos ovinos e 4,8% (2/42) dos cães nas propriedades rurais da microrregião de Araraquara – SP e a ingestão de água de represas, presença de canídeos selvagens ou domésticos e a presença de problemas reprodutivos apresentaram associação positiva com a ocorrência da infecção por *N. caninum* em ovinos.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

AGUIAR, D. M.; CHIEBAO, D. P.; RODRIGUES, A. A. R.; CAVALCANTE, G. T.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em ovinos do município de Monte Negro, RO, Amazônia Ocidental brasileira. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, p. 616-618, 2004.

AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; RODRIGUES, A. A. R.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; CAMARGO, E. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 71-77, 2006.

ALMEIDA, M. A. O. Epidemiologia da *Neospora caninum*. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**. v.13, supl. 1, p.37-40, 2004.

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

ANDREOTTI, R. Neosporose: um possível problema reprodutivo para o rebanho bovino -- Campo Grande : Embrapa Gado de Corte, 14p. -- (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1517-3747; 104), 2006.

ANDREOTTI, R.; OLIVEIRA, J. M.; SILVA, E. A.; OSHIRO, L. M.; MATOS, M. F. C. Occurrence of *Neospora caninum* in dogs and its correlation with visceral leishmaniasis in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.135, p.375-379, 2001.

ATKINSON, R.; HARPER, P. A. W.; REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. **Parasitology Today**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 110-113, 2000.

AZEVEDO S. S.; BATISTA C. S. A.; VASCONCELLOS S. A.; AGUIAR D. M.; RAGOZO A. M. A.; RODRIGUES A. A. R.; ALVES C. J.; GENNARI, S. M. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 79, p. 51-56, 2005.

BARBER, J. S.; GASSER R. B.; ELLIS J.; REICHEL M. P.; MCMILLAN D.; TREES, A. J. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. **The Journal of Parasitology**, v. 83, p. 1056-1058, 1998.

BARBER, J. S.; TREES, A. J. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. **Veterinary Record**, v.139, p. 439-443, 1996.

BARLING, K. S.; McNEILL, J. W.; PASCHAL, J. C.; McCOLLUM III, F. T.; CRAIG, T. M.; ADAMS, L. G.; THOMPSON, J. A. Ranch - management factors associated with antibody seropositivity for *Neospora caninum* in consignments of beef calves in Texas, USA. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 52, n. 1, p. 53-61, 2001.

BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; SVERLOW, K. W.; TARANTAL, A. F.; HENDRICKX, A. G. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. **Laboratory Investigation** v.71, p. 236-242, 1994.

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

BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M. C.; HILL, D. E.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; DUBEY, J. P. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. **The Journal of Parasitology**, v. 87, n. 3, p. 612-618, 2001.

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

BJÖRKMAN, C.; LUNDÉN, A.; UGGLA, A. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in Swedish dogs. **Acta. Vet. Scand.**, v. 35, n. 4, p. 445-447, 1994.

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

BOAVENTURA, C. M.; BASTOS, S. A.; MELO, D. P. G.; SILVA, A. C. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães de Goiânia, Goiás. In: **I Fórum brasileiro de estudos sobre *Neospora caninum***, 2008, São Paulo. Anais... São Paulo: C B P V, 2008. p. 52-53.

BRAUTIGAM, F. E.; HEITALA, S. W.; GLASS, R. Resultados de levantamento sorológico ara espécie *Neospora* em bovinos de corte e leite. In: **Congresso Panamericano de Ciências Veterinária**, 15., 1996, Campo Grande. Anais... Campo Grande: PANVET, 1996. p.284.

Buxton D., Maley S.W., Thomson K.M., Trees A.J. & Innes E.A. 1997. Experimental infection of non-pregnant and pregnant sheep with *Neospora caninum*. **J. Comp. Pathol.** 117(1):1-16.

BUXTON, D.; MALEY, S. W.; WRIGHT, S. et al. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v.118, p.267-279, 1998.

BUXTON, D.; MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends Parasitology**. 18: 546-552, 2002.

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

CAÑÓN-FRANCO, W. A., BERGAMASCHI, D. P., LABRUNA, M. B., CAMARGO, L. M. A., SILVA, J. C. R., PINTER, A., GENNARI, S. M. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dogs in the urban area of Monte Negro, Rondônia, Brazil. **Veterinary Research Communications**, v.28, p.113-118, 2004.

COLLANTES-FERNANDEZ E.; ZABALLOS, A.; ÁLVARES-GARCÍA, G.; ORTEGAMORA, L. M. Quantitative Detection of *Neospora caninum* in Bovine Aborted Fetuses and Experimentally Infected Mice by Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.4, p.1194-1198, 2002.

CONRAD, P. A.; BARR, B. C.; SVERLOW, K. W.; ANDERSON, M.; DAFT, B.; KINDE, H.; DUBEY, J. P.; MUNSON, L.; ARDANS, A. In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp. From aborted bovine fetuses. **Parasitology**, v. 106, pt. 3, p.239-249, 1993.

COSTA, K. S.; SANTOS, S. L.; UZEDA, R. S.; PINHEIRO, A. M.; ALMEIDA, M. A.; ARAUJO, F. R.; MCALLISTER, M. M.; GONDIM, L. F. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, 38: 157-159, 2008.

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

DAVISON, H. C.; OTTER, A.; TREES, A. J. Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally

calving cattle and aborting cattle. **International Journal for Parasitology**, v.29, n. 8, p. 1189-1194, 1999.

DITTRICH, R. L. Diagnóstico sorológico, isolamento, cultivo e caracterização molecular de *Neospora caninum* em bovinos leiteiros e eqüinos no Estado do Paraná, Brasil. 2002. 184p. **Tese (Doutorado)** – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR.

DUBEY, J. P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 84, n. 3-4, p. 349-367, 1999.

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

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

DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; ADAMS, D. S.; McALLISTER, M. M.; ANDERSONSPRECHER, R.; BASZLER, T. V.; KWOK, O. C. H.; LALLY, N. C.; BJORKMAN, C.; UGGLA, A. Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and different enzyme-linked immunosorbent assays. **The Journal of Parasitology**, v. 83, n. 6, p. 1063-1069, 1997.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis, **Veterinary Parasitology**, v. 67, n. 1-2, p. 1-59, 1996.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis. **Parasitology Today**, Amsterdam, v.9, n.12, p.452-458, 1993.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; HILL, D.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; KWOK, O. C. H.; SILVA, J. C. R.; OLIVEIRACAMARGO, M. C.; GENNARI, S. M. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Sarcocystis neurona* in sera of domestic cats from Brazil. **Journal Parasitology**, v.88, n.6, p.1251-1252, 2002.

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

ELLIS, J. T.; McMILLAN, D.; RYCE, C.; PAYNE, S.; ATKINSON, R.; HARPER, P. A. W. Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA. **International Journal Parasitology**, v. 29, p. 1589-1596, 1999.

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

FERROGLIO, E.; PASINO, M.; ROMANO, A.; GRANDE, D.; PREGEL, P.; TRISCIUOGLIO, A. Evidence of *Neospora caninum* DNA in wild rodents. **Veterinary Parasitology**, 148: 346-349, 2007.

FIGLIUOLO, L. P. C.; KASAI, N.; RAGOZO, A. M. A.; PAULA, V. S. O.; DIAS, R. A.; SOUZA, S. L. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 123, n. 3-4, p. 161-166, 2004.

FURUTA, P. I.; MINEO, T. W.; CARRASCO, A. O.; GODOY, G. S.; PINTO, A. A.; MACHADO, R. Z. *Neospora caninum* infection in birds: experimental

infections in chicken and embryonated eggs. **Parasitology**, 134: 1931-1939, 2007.

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**, v.13, p.23-28, 2004.

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

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

GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M. M.; GAO, L. Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 134, n. 1-2, p. 33-39, 2005.

GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 159-161, 2004.

GONDIM, L. F. P. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends in Parasitology**, 22: 247-252, 2006.

GONDIM, L. F. P.; PINHEIRO, A.M.; SANTOS, P.O.M.; JESUS, E.E.V.; RIBEIRO, M.B.; FERNADES, H.S.; ALMEIDA, M.A.O.; FREIRE, S.M.; MEYER, R.; MCALLISTER, M.M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 101, n. 1, p. 1-7, 2001.

GREENE, C. E. Neosporosis (*Neospora caninum* infection). **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. Elsevier, 2006; 768-775.

GUIMARÃES JUNIOR.; J.S.; SOUSA, S.L.P.; BERGAMASHI, D.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 124, p. 1-8, 2004.

GUIMARÃES JUNIOR, J. S. *Neospora caninum* em bovinos de exploração leiteira: soroprevalência, fatores de risco e comparação de técnicas sorológicas. 2002. 119 p. **Tese (Doutorado em Veterinária e Zootecnia)** - Universidade de São Paulo, São Paulo.

HELMICK, B.; OTTER, A.; MCGARRY, J.; BUXTON, D. Serological investigation of aborted sheep and pigs for infection by *Neospora caninum*. **Research in Veterinary Science**, v. 73, n. 2, p. 187-189, 2002.

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B.; KAUFMANN, H. Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 112, n. 2, p. 183-197, 1996.

HEMPHILL, A; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum* and neosporosis – recent achievements in host and parasite cell biology and treatment. **Acta Parasitologica**. Warszawa, Poland. v51, p.15-25, 2006.

HERNANDEZ, J., RISCO, C., DONOVAN, A. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.219, p.632-635, 2001.

HO, M. S. Y.; BARR, B. C.; ROWE, J. D. Detection of *Neospora* sp. From infected bovine tissues by PCR and hybridization. **Journal Parasitology**, v. 83, p. 508-511, 1997.

HUANG, C. C.; YANG, C. H.; WATANABE, Y.; LIAO, Y. K.; OOI, H. K. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). **Veterinary Research**, 35: 283-290, 2004.

IBGE. Dados gerais dos municípios de Ibitinga, Itápolis, Borborema e Tabatinga, São Paulo. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br.htm>> Acesso em: 20 de agosto de 2010.

INPE. Dados meteorológicos dos municípios de Ibitinga, Itápolis, Borborema e Tabatinga, São Paulo. Disponível em: <http://www.inpe.br.htm>> Acesso em: 20 de agosto de 2010.

JENKINS, M. C.; PARKER, C.; HILL, D.; PINCKNEY, R. D.; DYER, R.; DUBEY, J. P. *Neospora caninum* detected in feral rodents. **Veterinary Parasitology**, 143: 161-165, 2007.

JOLLEY, W. R.; McALLISTER, M. M.; McGUIRE, A. M.; WILLS, R. A. Repetitive abortion in *Neospora*-infected ewes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.82, n.3, p.251-257, 1999.

JÚNIOR, V. A.; PESSUTTI, C.; CHIEREGATTO, C. A S. **Guia de identificação dos canídeos silvestres brasileiros**. JoyJoy Studio, 2003, 35 p.

KOBAYASHI, Y.; YAMADA, M.; OMATA, Y.; KOYAMA, T.; SAITO, A.; MATSUDA, T.; OKUYAMA, K.; FUJIMOTO, S.; FURUOKA, H.; MATSUI, T. Naturally-occurring *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses. **The Journal of Parasitology**, v. 87, n. 2, p. 434-436, 2001.

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

LATHE, C. L. *Neospora caninum* in British dogs. **Veterinary Record**, London, v.134, n.20, p.532, 1994.

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

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; COLE, R. A.; NUEHRING, L. P.; BLAGBURN, B. L. *Neospora*-induced protozoal abortion in cattle. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Princeton, v.15, n.6, p.882-889, 1993.

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

LINDSAY, D. S.; STEINBERG, H.; DUBIELZIG, R. R.; SEMRAD, S. D.; KONKLE, D. M.; MILLER, P. E.; BLAGBURN, B. L. Central nervous system neosporosis in a foal. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.8, n.4, p.507-510, 1996.

LINDSAY, D. S.; UPTON, S. J.; DUBEY, J. P. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1521-1523, 1999.

LOBATO, J.; DEISE, A. O. S.; MINEO, W. P. T.; AMARAL, J. D. H. F.; GESMAR, R. S. S.; COSTA-CRUZ, J. M.; FERREIRA, M. S.; BORGES, S. A.; MINEO, R. J. Detection of Immunoglobulin G Antibodies to *Neospora caninum* in Humans: High Seropositivity Rates in Patients Who Are Infected by Human Immunodeficiency Virus or Have Neurological Disorders. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n.1, p. 84-89, 2006.

MARSH, A.E.; BARR, B.C.; PACKHAM, A.E.; CONRAD, P.A. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **Journal Parasitology**, v. 84, n. 5, p. 983-991, 1998.

MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; MCGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, 1998.

MCALLISTER, M. M.; MCGUIRE, A. M.; JOLLEY, W. R.; LINDSAY, D. S.; TREES, A. J.; STOBART, R. H. Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. **Veterinary Pathology**, v. 33, n. 6, p. 647-655, 1996.

MINEO, T. W. P.; SILVA, D. A. O.; COSTA, G. H. N.; VON ANCKEN, A. C. B.; KASPER, L. H.; SOUZA, M. A.; CABRAL, D. D.; COSTA, A. J.; MINEO, J. R. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.98, n.4, p.239-245, jul. 2001.

MORALES, E.; TRIGO, F. J.; PUENTE, E.; SANTACRUZ, M. Neosporosis in Mexican Dairy herds: Lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. **J. Com. Pathol**, v.125, p. 58-63, 2001.

MOSKWA, B.; PASTUSIAK, K.; BIEN, J.; CABAJ, W.: The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. **Parasitology Research**, 100:633-636, 2007.

MUNHÓS, K. F. **Soro-ocorrência de anticorpos contra *Neospora caninum* em ovinos de propriedades rurais localizadas no norte do Paraná, Brasil.** 2009. p.12-25. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2009.

OLIVEIRA, M. J.; MATOS, M. F. C.; OSHIRO, L. M.; ANDREOTTI, R. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs in the urban area of

Campo Grande, MS, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, p.155-158, 2004.

ORTEGA-MORA, L. M.; FERRE, I.; DEL-POZO, I.; CAETANO-DA-SILVA, A.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; UGARTEGARAGALZA, C.; ADURIZ, G. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Veterinary Parasitology**, 117: 301-308, 2003.

OTERO, A. R. S.; JESUS, E. E. V.; SILVA, V. M. G. DA; GONDIM, L. F. P.; ALMEIDA, M. A. O. Evidência sorológica da infecção de ovinos por *Neospora caninum* no Estado da Bahia, Brasil. In: **Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, 12., 2002, Rio de Janeiro.

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

PETERSEN, E.; LEBECH, M.; JESEN, L; LIND, P.; RASK, M.; BAGGER, P.; BJORKMAN, C.; UGGLA, A. *Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans. **Emerging Infections Diseases**, v.5, n.2, p. 278-280. 1999.

QUINN, H. E.; ELLIS, J. T.; SMITH, N. C. *Neospora caninum*: a cause immune-mediated failure of pregnancy? **International Journal of Parasitology**. 2001; 18(9):391-4. Review.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P.; Canídeos. **Mamíferos do Brasil**. 1. ed. Londrina, 2006, 437p.

RODRIGUES, A. A. R; GENNARI, S. M; AGUIAR, D. M; SREEKUMAR, C; HILL, D. E; MISKA, K. B; VIANNA, M. C. B; DUBEY, J. P. Shedding of

Neospora caninum oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.124, p.139–150, 2004.

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

ROMANELLI, P. R. Avaliação soropidemiológica de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em ovinos do município de Guarapuava-Paraná. 2002. p.53. **Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal)**, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2002.

ROMANELLI, P. R.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O.; MARANA, E. R. M.; OGAWA, L.; DE PAULA, V. S. O.; GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 82, p. 202-207, 2007.

SANDERSON, M. W.; GAY, J. M.; BASZLER, T. V. *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. **Veterinary Parasitology**, v. 90, n. 1-2, p. 15-24, 2000.

SAWADA, M.; PARK, C.H.; KONDO, H.; MORITA, T.; SHIMADA, A.; YAMANE, I.; UMEMURA, T. Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60, n. 07, p. 853-854, 1998.

SERRANO-MARTINEZ, E.; FERRE, I.; OSORO, K.; ADURIZ, G.; MOTA, R. A.; MARTINEZ, A.; DEL-POZO, I.; HIDALGO, C. O.; ORTEGA-MORA, L. M. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. **Theriogenology**, 67:729-737, 2007.

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

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

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

TREES, A. J.; DAVISON, H. C.; INNES, E. A.; WASTLING, J. M. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International Journal Parasitology**, v.29, p.1195- 200, 1999.

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

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

UENO, T. E. H. **Prevalência das infecções por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em matrizes e reprodutores ovinos de rebanhos comerciais do Distrito Federal, Brasil.** 2005. p.107. Dissertação (Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

VÁCLAVEK, P.; SEDLAK, K.; HURKOVA, L.; VODRAZKA, P.; SEBESTA, R.; KOUDELA B. Serological survey of *Neospora caninum* in dogs in the Czech Republic and a long-term study of dynamics of antibodies. **Veterinary Parasitology**, v.143, p.35–41, 2007.

VITALIANO, S. N.; SILVA, D. A. O.; MINEO, T. W. P.; FERREIRA, R. A.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from southeastern and midwestern regions of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 253 – 260, 2004.

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

WILSON, D. E.; RUFF, S. *Canis latrans*. **The Smithsonian Book of North American Mammals**. 1. ed. Hardcover, 1999, 650-652.

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

ANEXOS

8. ANEXOS**8.1 Questionário epidemiológico**

FICHA EPIDEMIOLÓGICA

N ^o

Município:	Tamanho da Propriedade:	Data: / /
Localização:		
Entrevistado:	Função:	Telefone:

1. Atividade principal:

()Pecuária ()Agricultura ()Mista

2. Abastecimento de água dos ovinos:

()Rede pública ()Poço convencional ()Mina
 ()Represa ()Açude pluvial ()Córrego

3. Abastecimento de água dos cães:

()Rede pública ()Poço convencional ()Mina
 ()Represa ()Açude pluvial ()Córrego

4. Ocorrem abate de animais na propriedade:

()Sim ()Não

5. Quais as espécies abatidas na propriedade:

()Bovina ()Ovina ()Suína
 ()Aves ()Outras _____

6. Os cães têm acesso a carne crua ou vísceras dos animais abatidos:

()Sim ()Não

7. Qual o tipo de alimentação dos cães:

- Ração Comida caseira Carne crua
 Vísceras Outros _____

8. Número de cães:

- Macho Fêmea

9. Presença de ouros canídeos:

- Sim _____ Não Não sabe

10. Presença de roedores:

- Sim Não Não sabe

11. Tipo de criação de aves domésticas (*Gallus gallus domesticus*)

- Soltas Presas

12. Os cães são criados:

- Soltos continuamente Soltos parcialmente Presos

13. Os cães têm acesso a:

- Curral Pastagens Depósito de ração
 Feno Silagem Água dos ovinos

14. Raça de ovinos predominantes:

- Santa Inês Dorper Ilê de France
 Mestiço _____ Outro _____

15. Tipo de exploração:

- Intensiva Semi-intensivo Extensivo Misto (Corte e Lã)

16. Alimentação dos ovinos (Volumoso):

- Pastagem Forrageira Feno

17. Alimentação dos ovinos (Concentrado):

- Ração comercial Ração produzida na propriedade

18. Suplementação mineral dos ovinos:

- Sal comum Sal comum e mineral Nenhum

19. Número de ovinos:

- Matrizes Reprodutores

20. Problemas Reprodutivos:

- Abortamento Repetição de cio Natimortos Ausência de cio
 Outro _____ Não sabe Nenhum

21. No caso de abortamento qual a fase de gestação que ocorre:

- Terço inicial Terço médio Terço final Não sabe

22. O abortamento foi diagnosticado:

- Sim Não Qual _____

23. Problemas neurológicos em cordeiros:

- Membros flexionados Membros hiperflexionados Ataxia
 Assimetria ocular Nenhum Outro _____

24. Os cães tem acesso a:

- Placenta Feto abortado

25. Problemas neurológicos em cães:

- Paresia dos membros Rigidez dos membros Ataxia
 Outro _____ Nenhum

26. Os cães são vacinados:

- Sim Qual _____ Frequência _____ Não

8.2 Normas para publicação

Veterinary Parasitology

Types of contributions

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Rapid Communications
4. Short Communications
5. Letters to the Editor
6. Book Reviews

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited.

Rapid Communications should contain information of high 'news'/scientific value worthy of very rapid publication. Rapid Communications should be submitted to the journal as such (i.e. clearly labelled as a RC) and should, in general, not exceed 2000 words in length. Upon receipt, they will be subject to rapid assessment and if accepted, published with priority.

Short Communications should consist of original observations or new methods within the scope of the journal. Reports of observations previously published from different geographical areas may be accepted only if considered sufficiently unusual or noteworthy. The Communications should be concise with the minimum of references, and cover no more than four pages of the journal; they need not be formally structured as are full papers, but should give sufficient methods and data necessary for their comprehension.

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old and were written in English.

Book reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to the Book Review Editor:

Dr. F.H.M. Borgsteede
Animal Sciences Group, Wageningen UR
Division Infectious Diseases
Laboratory of Parasitic Diseases
P.O. Box 65
8200 AB Lelystad
The Netherlands

Submission of manuscripts

Submission to Veterinary Parasitology now proceeds online via Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/vetpar>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.

Authors are invited to suggest the names of up to 5 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission. Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Role of the funding source

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Ethics

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL: http://www.cioms.ch/frame_1985_texts_of_guidelines.htm. Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of Veterinary Parasitology.

Preparation of manuscripts

1. Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

Language Editing: Elsevier's Authors Home provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance before they submit their article or before it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. Authors should also be aware that The Lucidus Consultancy edit@lucidusconsultancy.com offers a bespoke service to putative contributors to Veterinary Parasitology who need to arrange language improvement for their manuscripts. For more information about language editing services, please email authorsupport@elsevier.com.

Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or

in any advertising. For more information please refer to our terms & conditions <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

2. Manuscripts should have numbered lines, with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

3. Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and not too long)

Name(s) of author(s)

Complete postal address(es) of affiliations

Full telephone, Fax No. and e-mail address of the corresponding author

Present address(es) of author(s) if applicable

Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent

Abstract

Keywords (indexing terms), normally 3-6 items. Please refer to last index (Vol. 100/3-4).

Introduction

Material studied, area descriptions, methods, techniques

Results

Discussion

Conclusion

Acknowledgments and any additional information concerning research grants, etc.

References

Tables

Figure captions

Tables (separate file(s))

Figures (separate file(s)).

4. Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.

5. SI units should be used.
6. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

Abstracts

The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.
2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.

4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. Any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.

5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.

6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.

7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.

8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.

9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.

Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.

10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published free of charge online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in

one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed – if necessary – by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12–16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on author's names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates – publications of the same author with one co-author – publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.
5. Use the following system for arranging your references:
 - a. For periodicals
Lanusse, C.E., Prichard, R.K., 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 49, 123–158.
 - b. For edited symposia, special issues, etc., published in a periodical

Weatherley, A.J., Hong, C., Harris, T.J., Smith, D.G., Hammet, N.C., 1993. Persistent efficacy of doramectin against experimental nematode infections in calves. In: Vercruysse, J. (Ed.), Doramectin – a novel avermectin. *Vet. Parasitol.* 49, 45–50.

c. For books

Blahe, T. (Ed.), 1989. *Applied Veterinary Epidemiology*. Elsevier, Amsterdam, 344 pp.

d. For multi-author books

Wilson, M.B., Nakane, P.K., 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp, W., Holubar, K., Wick, G. (Eds.), *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*. North Holland, Amsterdam, pp. 215–224.

6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references in accordance with BIOSIS Serial Sources, published annually by BIOSIS. The correct abbreviation for this journal is *Vet. Parasitol.*

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.

11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.

2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.
4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by \exp .
5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} , not as Ca^{++} .
6. Isotope numbers should precede the symbols e.g. ^{18}O .
7. The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Footnotes

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information into the normal text.
2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature.
2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the official recommendations of the IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature should be followed.

5. For the denomination of parasitic diseases or infections, authors are requested to follow the Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases (SNOAPAD) published in 1988 in *Veterinary Parasitology* (Kassai, T. et al., 1988. *Vet. Parasitol.* 29, 299–326).

Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830, fax +44(0)1865 853333, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage <http://www.elsevier.com/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting

- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>).

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible,

then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Author Services

Questions arising after acceptance of the manuscript, especially those relating to proofs, should be directed to Elsevier Ireland, Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland, Tel.: (+353) 61 709600, Fax: (+353) 61 709111/113, authorsupport@elsevier.com.

Authors can also keep a track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's homepage <http://www.elsevier.com/locate/vetpar> For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

8.3 Artigo para publicação

SEROPREVALENCE AND RISK FACTORS ASSOCIATED WITH NEOSPOROSIS IN SHEEP AND DOGS FROM FARMS

Gustavo Puglia Machado^{a*}, Mariana Kikuti^a, Hélio Langoni^a, Antonio Carlos Paes^a

^aDepartment of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, 18618-000 Botucatu, SP, Brazil

*Corresponding author at: Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubião Júnior s/n, 18618-000 Botucatu, SP, Brazil. Tel.:+55 14 38116270; fax: +55 14 38116075. E-mail address: machadogp@yahoo.com.br

ABSTRACT

This study aimed to establish the seroprevalence and risk factors associated with neosporosis in sheep and dogs from rural properties. 1497 blood samples were collected from sheep and 42 from dogs that cohabited with sheep from 16 farms located in the central region of São Paulo State, Brazil. For the detection of *N. caninum* antibodies it was performed the indirect fluorescent antibody test (IFAT ≥ 25). For the epidemiological study it was applied a questionnaire for the owners or responsible from the sheep and dogs regarding informations related to neosporosis. The seroprevalence obtained out of the 1497 sheep sera tested was 8.0% (LB95%=6.7%; UB95%=9.2%) and out of the 42 dogs 4.8% (LB95%=0%; UB95%=7.2%). Variables statistically related to seropositivity for *N. caninum* in sheep were: artesian well as water supply ($P=0.0004$; $OR=2.15$), presence of other domestic canids ($P=0.0013$; $OR=2.38$) and absence of reproductive problems ($P=0.0031$; $OR=1.75$).

Keywords: Neosporosis, serology, sheep, canids

1. Introduction

Neospora caninum is an obligate intracellular protozoan that causes neosporosis, a worldwide distribution disease, which affects a considerable range of species of domestic and wild animals (Dubey, 1999; Gondim et al., 2004). It is considered an emerging disease associated with reproductive problems and neurological disorders, with a progressive character, manifesting itself more severely in young animals, and recognized as an important cause of abortion in cattle (Anderson et al., 2000).

Canine neosporosis has been described since 1984 with the first reports of dogs diagnosed with neosporosis presenting clinical signs similar to encephalitis and myositis. The description of dog as definitive host occurred in 1998 with evidences that these animals are able to develop the sexual cycle and eliminate parasite oocysts in feces, comprehending an important factor in the epidemiological chain since it emphasizes the importance of these animals in horizontal transmission of the parasite (Dubey, 2003).

The sheep industry is in growing expansion in Brazil, especially in regions with no traditional culture in this type of economic activity. Thus, the production chain must be alert to general health problems, including the reproductive problems that has a direct effect on production and productivity of herds. Among the parasitic diseases that affects reproduction, neosporosis stands out for being responsible for abortions, embryonic death, fetal malformation and birth of weak or persistently infected lambs (Almeida, 2004).

The presence of antibodies to *N. caninum* in serum samples demonstrates exposure to the parasite, which can be identified by serological tests such as the indirect fluorescent antibody test (IFAT) (Dubey et al., 1988), *Neospora* Agglutination Test (NAT) (Romand et al., 1998) and immunoenzymatic test (ELISA) (Bjorkman et al. 1999; Dubey et al., 1997). The IFAT was the first method described and is now widely used for diagnosis of infection in sheep and dogs, considered the gold standard test when compared to others (Atkinson al., 2000).

In Brazil, *N. caninum* in sheep researches are restricted to serological surveys and the occurrence is unknown in some regions. The lack of information on epidemiology of neosporosis has substantially limited the proposition practical and objective solutions to prevent it. Causes of reproductive problems in sheep may be several and differential diagnosis for neosporosis must always be included. Thus, an epidemiological study of the disease is essential to verify the relationship of host, agent and environment (Munhóz, 2009).

The aim of this study was to evaluate risk factors for the occurrence of antibodies against *N. caninum* in naturally infected dogs and sheep from farms in the central region of São Paulo state, in the counties of Ibitinga, Itápolis, Borborema and Tabatinga.

2. Materials and methods

2.1 Study Population and sampling

This region is characterized by having tropical climate and savanna and rainforest biomes (Ibge, 2010) with average temperatures below 18°C on winter and above 24° C on summer, and by having no defined winter season and high annual rainfall (Inpe, 2010).

Out of a total of 4228 sheep from 16 farms, blood samples were taken from 1497 sheep and all the dogs that inhabit these properties, located in São Paulo state and belonging to the counties and number of properties: Ibitinga (5), Itápolis (5), Borborema (3) and Tabatinga (3). The criteria for inclusion of the farms were: belonging to the central region of São Paulo state and having dogs cohabiting with sheep.

Blood samples were collected from sheep by jugular venocentese and from dogs by jugular or cephalic venocentese, using disposable needles of 25x7cm and 40x12cm, and test tubes without anticoagulant, identified with the number of each animal. Serum samples were obtained from 5 to 10 mL of blood collected from each animal and centrifuged at 3590 g for 10 minutes. Samples were stored at -20°C until they were tested by IFAT.

2.2 Variables studied

The study involved the collection of blood samples from sheep and dogs cohabiting in 16 farms. During the experiment an epidemiological questionnaire was

applied in each property by interviewing the owner or person responsible for animal management. The questionnaire addressed epidemiological aspects related to main activity and type of farm ownership, type of water supply, the occurrence of slaughtering of animals on the property, number of dogs on property, type of food animals were given, presence of other wild or domestic canids, presence of rodents such as farming of domestic poultry (*Gallus domesticus*) and history of neurological and reproductive problems in animals.

2.3 Indirect fluorescent antibody test (IFAT)

The IFAT tests were performed at the Laboratory for Diagnosis of Zoonosis at the School of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ), in Sao Paulo State University (UNESP)/Botucatu, Brazil.

The IFAT was used for the detection of antibodies against *N. caninum*. The antigens used were produced in the laboratory of FMVZ, with the NC-1 strain of *N. caninum*, maintained *in vitro*. To maintain the NC-1 strain of *N. caninum*, tachyzoites were grown *in vitro* in *Vero* cells culture in RPMI 1640 media supplemented with 5% of antibiotic-antimycotic solution (Invitrogen, Cat. n. 15240-096). Serum samples were initially screened, considering a cutoff dilution of 1:25. In microplates, 5 μ L of each serum sample were diluted in 120 μ L phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2, including the positive and negative control sera. After dilution, 10 μ L of each serum sample was pipetted in wells of the slides, which were incubated in a moist chamber at 37 °C for 30 minutes. They were then washed with pH 7.2 PBS in two baths of 10 minutes each. After drying, conjugated anti- IgG canine and ovine was added to each well of the plate, previously prepared in a 1:5 diluted solution of Evans blue in pH 7.2 PBS.

For titration of positive samples two-fold dilutions were used (1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 and 1:800). In case of reaction in the last dilution tested, the samples were subjected to further dilutions to obtain the final titer.

2.4 Statistical analysis

The variables were analyzed by Chi-square and G-test with a significance level of 5%. The Bioestat 5.0 was used to calculate the associations were significant $P < 0.05$.

3. Results

3.1 Serology

Out of the 1497 sheep blood samples analyzed by IFAT, 120 (8.0%) were positive with a titer ≥ 25 (Table 1), being the titer of higher frequency 100 (29.2%), followed by titles 50 (27.5 %), 200 (24.5%), 25 (15.8%) and 400 (3.3%). Out of the 42 canine blood samples analyzed by IFAT, 2 (4.8%) were seropositive, with titer 50 (Table 1).

3.2 Questionnaire

The sizes of 16 (100%) farms were quite heterogeneous, ranging from 15 to 200 bushels. In 13 (81.25%) farms the main activity was mixed (agriculture and livestock), followed by 2 farms which had as main activity agriculture (12.5%) and 1 which had

livestock (6.25%). All of them were dedicated mainly to sheep meat production and an extensive production system.

The total number of sheep in the flocks ranged from 57 to 600 animals. Ages ranged from 10 months to 5 years and regarding breed, 819 (54.7%) were crossbreeds (Santa Inês and Dorper), 424 (28.3%), Santa Inês and 254 (17%) Dorper. Feeding of animals in all properties consisted of pasture (*Brachiaria decumbens* and *Brachiaria humidicola*), hay and concentrate. The water supply of the animals was an artesian well in 14 (87.5%) properties and dam in 2 (12.5%).

The total number of dogs on the farms ranged from 1 to 6 animals. 24 (56.3%) dogs were male and 18 (43.7%) females. 29 (68.67%) were aged 1-3 years and 13 (31.35%) over 3 years. 21 (50.0%) were mixed breed, 13 (31.25%) Border Collie and 8 (18.75%) Maremano Pastor. In 15 (93.75%) properties the dogs were raised free and in 1 (6.25%) chained. 12 (75.0%) properties provided industrial dog food for and 4 (25.0%) homemade food. Water supply in all properties was by artesian well.

All properties have reported the presence of other dogs, 2 (12.5%) reported the presence of wild canids and 14 (87.5%) of dogs from neighboring properties.

All of them reported farming domestic poultry (*Gallus domesticus*), and in 15 (93.75%) of them the poultry were free-ranging farming and in 1 (6.25%) intensive farming. Presence of rodents (*Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* or *Mus musculus*) was reported in 14 (87.5%) properties.

All the properties reported slaughtering sheep, poultry and pigs. Dogs have access to the raw meat and offal of slaughtered animals in 10 (62.5%) properties.

Reproductive problems occurred in 14 (87.5%) properties, more frequently reported: abortion (47.7%), rut repetition (40.7%) and stillbirths (11.6%). The abortions occurred on the first third of gestation in 30.4% of cases, 26.0% on the final third and 21.7% on the second third of gestation. Not all properties had a complete diagnoses of the reproductive failures. Neurological disorders was not reported in both sheep and dogs.

None of the properties performed quarantine and prior serology to infectious and parasitic diseases in the purchase and before the introduction of new animals in the flock.

In 12 (75.0%) properties owner and attendants did not know neosporosis and its clinical signs in animals, and toxoplasmosis in 14 (87.5%) clinical signs of disease and transmission routes were known.

4. Discussion

This was the first epidemiological study involving dogs and sheep from farms in central region of São Paulo state, showing sheep (8.0%) and dogs (4.8%) seroprevalence (Table 1). This region has climatic conditions suitable for maintenance of oocysts of *N. caninum* in the environment, according to Sanderson et al. (2000), who argue that climatic factors such as humidity and temperature influence sporulation.

The principle of IFAT is detection of antibodies directed to cell surface antigens of tachyzoites of *N. caninum*, which are considered more specific than the intracellular components. The whole tachyzoites were fixed in the blades. Antibodies against *N. caninum* in serum bind to tachyzoites of the parasite. Then, it uses anti-species-specific conjugated with fluorescein isothiocyanate to form a stable immune complex detected by fluorescence of the tachyzoites. This test is considered the reference method for the detection of antibodies against *N. caninum* (Dittrich, 2002).

In Brazil, serologic studies of infection by *N. caninum* in sheep and dogs have shown variable rates of seropositivity. Romanelli et al. (2002) and Munhóz (2009) in Paraná State, Otero et al. (2002) in Bahia State, Figliuolo et al. (2004) in Sao Paulo State, Aguiar et al. (2004) in Rondônia State and Vogel et al. (2006) in Rio Grande do Sul State, found 13.91%, 9.5%, 7.4%, 9.2%, 29% and 3.2% of seropositive sheep respectively.

Souza et al. (2002) and Romanelli et al. (2007) in Paraná State, Gennari et al. (2002) in Sao Paulo State, Jesus et al. (2006) in Bahia State, Cañon-Franco et al. (2003) and Aguiar et al. (2006) in Rondonia State, Oliveira et al. (2004) and Andreotti et al. (2006) in Mato Grosso do Sul State, Fernandes et al. (2004) in Minas Gerais State, Azevedo et al. (2005) in Para State, Boa Ventura et al. (2008) in Goiás State, found 21.6% 20.8% 13.3% 11.2% 8.3% 12.6% 26.5% 27.3% 18.9 %, 8.4% and 32.9% of seropositive dogs respectively.

It is noteworthy that the comparison between studies using different serological tests with different cutoffs should be used with caution, since there are differences in sensitivity and specificity between the tests used (Bjorkman et al., 1999). In this study, we found 8 (50%) farms with seropositive sheep to *N. caninum* (Table 1). Figliuolo et al. (2004), in 30 properties in the state of São Paulo, found that 86.6% sheep were positive by IFAT and Múnhoz (2009) in Paraná state, found in 9 (81.82%) and 11 farms sheep seropositive. The comparison with results from other studies is limited because the properties differ in number of animals, size, management and technical standards.

Two (12.5%) of 16 studied properties had seropositive dogs to *N. caninum*. Out of the eight farms with positive sheep, only two (25%) dogs were positive (Table 1), suggesting vertical transmission of the parasite to sheep (Buxton et al., 1997), although stray dogs of nearby properties and even from urban area were found among the flocks.

The titers most frequent in sheep were 50 (27.5%), 100 (29.2%) and 200 (24.2%) similar to those found by Figliuolo et al. (2004) and Munhóz (2009), while for the dogs the title was 50 for both.

The association between farm size and main activity with the results obtained in sheep, showed no statistically significant difference ($P=0.4164$ and $P=0.1614$) (Table 2), which is in agrrement with the results obtained by Barling et al. (2001) and Munhóz (2009). All properties were adopting extensive production system, however, it is believed that the occurrence of disease is lower in properties with semi-intensive or intensive system due to better sanitation, less crowding of animals, separation from flock by age, sex and purpose of production, and more qualified manpower (Barling et al, 2001).

Significant differences were observed regarding the results and the association between water supply ($P=0.0004$, $OR=2.15$) (Table 2), probably due to more exposure of the dams to dog feces, definitive hosts in neosporosis (Greene, 2006).

The association between the presence of other domestic or wild dogs with the results showed no statistical difference ($P=0.0013$, $OR=2.38$) (Table 2), disagreeing with the findings of Ueno (2005) and Munhóz (2009). In Brazil there are six species of wild canids, one of the subfamily Symocyoninae, the *Speothos venaticus*, and the rest of the subfamily Caninae: *Chrysocyon brachyurus*, *Cerdocyon thous*, *Lycalopex vetulus*, *Pseudalopex gymnocercus* and *Atelocynus microtis* (Júnior et al., 2003).

In Brazil, few serological studies were performed in wild canids. Among the Brazilian species tested for *N. caninum*, positive results were found in *Chrysocyon brachyurus* (Vitaliano et al., 2004), *Lycalopex gymnocercus* and *Cerdocyon thous* (Cânon-Franco et al. 2004). The presence of wild dogs on farms has increased significantly, making it difficult to control and enhances the transmission of the disease

in flock, especially when the access to food and water sources of the animals is possible (Romanelli et al., 2007).

In all of the 16 farms studied the farming of domestic poultry was reported (*Gallus domesticus*), and in 15 (93.75%) they were in free-ranging system and in one (6.25%) in intensive system. The association between the type farming system of the poultry and seropositivity of the sheep showed no statistical difference ($P=0.8665$) (Table 2). Until 2007, only mammals had been identified as natural hosts of *N. caninum*, but the parasite was also reported in chickens, which gives an even broader distribution of the agent, a fact of great epidemiological importance (Costa et al., 2008). Oocysts excreted by dogs who consumed chicken embryo eggs experimentally infected with *N. caninum* was demonstrated, suggesting that chickens may be involved in the transmission of the parasite (Furuta et al., 2007). Likewise, it is possible that other species of birds can be infected by the parasite, participating in the spread of disease.

In 14 (87.5%) properties rodents were found (*Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* or *Mus musculus*), however, there was no association between the presence of these and the serology results ($P=0.8819$) (Table 2). Natural infection by *N. caninum* in mice and rats, cosmopolitan considered synanthropic animals, was reported (Huang et al. 2004; Ferroglio et al., 2007, Jenkins et al., 2007). It is unknown the efficiency of transmission of the parasite from infected rodents to other natural species, but the carnivorousness does contribute to the spread of the parasite.

The association between the slaughter of animals on the property and access of dogs to raw meat and offal from these animals showed no significant difference ($P=0.3989$ and $P=0.8984$) (Table 2), however, raw meat and viscera are important routes of transmission for canine infection and maintenance of the epidemiological cycle of the disease (Gondim et al., 2004).

There was no statistical difference between chained or free dog raising and seropositivity in sheep ($P=0.6130$) (Table 2), which is consistent with the results obtained by Ueno (2005) and Munhóz (2009). Moreover, there was an association of seropositivity with the presence or absence of reproductive problems in sheep ($P=0.0031$, $OR=0.25$) (Table 2), also agreeing with Barling et al. (2001), Texas.

Statistical differences were not found in the association between seropositivity of dogs and the variables: type of raising ($P=0.6547$) and access to raw meat or offal ($P=0.6184$) (Table 3), disagreeing that type of farming and feeding of dogs interfere in the occurrence of the disease (Greene, 2006).

In 12 (75.0%) of the properties the owner and animal handlers were not familiar with neosporosis and their clinical signs, which shows the lack of preparation for sheep farming.

5. Conclusion

The results indicate seroprevalence of antibodies against *N. caninum* in 50% (8/16) of the flocks, 8% (120/1497) of sheep, and 4.8% (2/42) of dogs of the farms. The intake of water from dams, the presence of wild or domestic canids, and the presence of reproductive problems demonstrated positive association with the occurrence of infection by *N. caninum* in sheep.

6. References

Aguiar, D.M., Chiebao, D.P., Rodrigues, A.A.R., Cavalcante, G.T., Labruna, M.B., Gennari, S.M. 2004. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em ovinos do

- município de Monte Negro, RO, Amazônia Ocidental brasileira. Arquivos do Instituto Biológico 71, 616-618.
- Aguiar, D.M., Cavalcante, G.T., Rodrigues, A.A.R., Labruna, M.B., Camargo, L.M.A., Camargo, E.P., Gennari, S.M. 2006. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. *Veterinary Parasitology* 142, 71-77.
- Almeida, M.A.O. 2004. Epidemiologia da *Neospora caninum*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 13, 37-40.
- Anderson, M.L., Andrianarivo, A.G., Conrad, P.A. 2000. Neosporosis in cattle. *Animal Reproduction Science* 60-61, 417-431.
- Andreotti, R. 2006. Neosporose: um possível problema reprodutivo para o rebanho bovino -- Campo Grande : Embrapa Gado de Corte, 14p. -- (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1517-3747; 104).
- Atkinson, R., Harper, P.A.W., Reichel, M.P., Ellis, J.T. 2000. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. *Parasitology Today*, Oxford, 16 (3), 110-113.
- Azevedo, S.S., Batista, C.S.A., Vasconcellos, S.A., Aguiar, D.M.; Ragozo, A.M.A., Rodrigues, A.A.R., Alves, C.J., Gennari, S.M. 2005. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. *Research in Veterinary Science* 79, 51-56.
- Barling, K.S., McNeill, J.W., Paschal, J.C., Mcollum, F.T., CRAIG, T.M., ADAMS, L. G., Thompson, J.A. 2001. Ranch - management factors associated with antibody seropositivity for *Neospora caninum* in consignments of beef calves in Texas, USA. *Preventive Veterinary Medicine*, 52 (1), 53-61.
- Björkman, C., Uggl, A. 1999. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *International Journal Parasitology* 29, 1497-1507.
- Buxton D., Maley S.W., Thomson K.M., Trees A.J., Innes, E.A. 1997. Experimental infection of non-pregnant and pregnant sheep with *Neospora caninum*. *J. Comp. Pathol.* 117 (1):1-16.
- Boaventura, C.M., Bastos, S.A., Melo, D.P.G., Silva, A.C. 2008. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães de Goiânia, Goiás. In: I Fórum brasileiro de estudos sobre *Neospora caninum*, 2008, São Paulo. Anais... São Paulo: C B P V, 52-53.
- Cañon-Franco, W.A., Bergamaschi, D.P., Labruna, M.B., Camargo, L.M.A., Souza, S.L.P.; Silva, J.C.R., Pinter, A., Dubey, J.P., Gennari, S.M. 2003. Prevalence of antibodies anti-*Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brazil. *Veterinary Parasitology* 115, 71-74.
- Cañon-Franco, W.A., Bergamaschi, D.P., Labruna, M.B., Camargo, L.M.A., Silva, J.C. R., PINTER, A., GENNARI, S.M. 2004. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dogs in the urban area of Monte Negro, Rondônia, Brazil. *Veterinary Research Communications* 28, 113-118.
- Costa, K.S., Santos, S.L., Uzeda, R.S., Pinheiro, A.M., Almeida, M.A., Araujo, F.R., Mcallister, M.M., Gondim, L.F. 2008. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology* 38, 157-159.
- Dittrich, R.L. Diagnóstico sorológico, isolamento, cultivo e caracterização molecular de *Neospora caninum* em bovinos leiteiros e eqüinos no Estado do Paraná, Brasil. 2002. 184p. Tese (Doutorado) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR.

- Dubey, J.P. 1999. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Veterinary Parasitology* 84 (3-4), 349-367.
- Dubey, J.P. 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean Journal of Parasitology* 41, 1-16.
- Dubey, J.P., Carpenter, J.L., Speer, C.A., Topper, M.J., Uggla, A. 1988. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association* 192 (9), 1269-1285.
- Dubey, J.P., Jenkins, M.C., Adams, D.S., Mcallister, M.M., Andersonsprecher, R., Baszler, T.V., Kwok, O.C.H., Lally, N.C., Bjorkman, C., Uggla, A. 1997. Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and different enzyme-linked immunosorbent assays. *The Journal of Parasitology* 83 (6), 1063-1069.
- Fernandes, B.C.T.M., Gennari, S.M., Souza, S.L.P., Carvalho, J.M., Oliveira, W.G., Cury, M.C. 2004. Prevalence of anti-*N. caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city Uberlândia, Minas Gerais – Brazil. *Veterinary Parasitology* v. 123, p. 33-40.
- Ferroglio, E., Pasino, M., Romano, A., Grande, D., Pregel, P., Trisciuglio, A. 2007. Evidence of *Neospora caninum* DNA in wild rodents. *Veterinary Parasitology* 148, 346-349.
- Figliuolo, L.P.C., Kasai, N., Ragozo, A.M.A., Paula, V.S.O., Dias, R.A., Souza, S.L.P., Gennari, S.M. 2004. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 123 (3-4), 161-166.
- Furuta, P.I., Mineo, T.W., Carrasco, A.O., Godoy, G.S., Pinto, A.A., Machado, R.Z. 2007. *Neospora caninum* infection in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. *Parasitology* 134, 1931-1939.
- Gennari, S.M., Yai, L.E.O., D'auria, S.N.R., Cardoso, S.M.S., Kwok, O.C.H., Jenkins, M.C., Dubey, J.P. 2002. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology* 106 (2), 177-179.
- Gondim, L.F.P., Mcallister, M.M., Pitt, W.C., Zemlicka, D.E. 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology* 34 (2), 159-161.
- Greene, C.E. Neosporosis (*Neospora caninum* infection). *Infectious diseases of the dog and cat*. 3. ed. Elsevier, 2006; 768-775.
- Huang, C.C., Yang, C.H., Watanabe, Y., Liao, Y.K., Ooi, H.K. 2004. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). *Veterinary Research* 35, 283-290.
- Ibge. Dados gerais dos municípios de Ibitinga, Itápolis, Borborema e Tabatinga, São Paulo. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br.htm>> Acesso em: 20 de agosto de 2010.
- Inpe. Dados meteorológicos dos municípios de Ibitinga, Itápolis, Borborema e Tabatinga, São Paulo. Disponível em: <http://www.inpe.br.htm>> Acesso em: 20 de agosto de 2010.
- Jenkins, M.C., Parker, C., Hill, D., Pinckney, R.D., Dyer, R., Dubey, J.P. 2007. *Neospora caninum* detected in feral rodents. *Veterinary Parasitology* 143, 161-165.
- Júnior, V.A., Pessutti, C., Chierogatto, C.A.S. Guia de identificação dos canídeos silvestres brasileiros. JoyJoy Studio, 2003, 35 p.
- Jesus, E.E.V., Santos, P.O.M., Barbosa, M.V.F., Pinheiro, A.M., Gondim, L.F.P., Guimarães, J.E., Almeida, M.A.O. 2006. Prevalência de anticorpos anti-*N. caninum*

- em cães nos municípios de Salvador a Lauro de Freitas, Estado da Bahia – Brasil. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Sciences* 43 (1), 5 -10.
- Munhóz, K.F. Soro-ocorrência de anticorpos contra *Neospora caninum* em ovinos de propriedades rurais localizadas no norte do Paraná, Brasil. 2009. p.12-25. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2009.
- Oliveira, M.J., Matos, M.F.C., Oshiro, L.M., Andreotti, R. 2004. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs in the urban area of Campo Grande, MS, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 13, 155-158.
- Otero, A.R.S., Jessus, E.E.V., Silva, V.M.G., Gondim, L.F.P., Almeida, M.A.O. Evidência sorológica da infecção de ovinos por *Neospora caninum* no Estado da Bahia, Brasil. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 12, 2002, Rio de Janeiro.
- Reis, N.R., Peracchi, A.L., Pedro, W.A., Lima, I.P., Canídeos. Mamíferos do Brasil. 1. ed. Londrina, 2006, 437p.
- Romand, S., Thulliez, P., Dubey, J.P. 1998. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitology Research* 84 (1), p. 50-53.
- Romanelli, P.R. Avaliação soroepidemiológica de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em ovinos do município de Guarapuava-Paraná. 2002. p.53. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2002.
- Romanelli, P.R., Freire, R.L., Vidotto, O., Marana, E.R.M., Ogawa, L., Paula, V.S.O., Garcia, J.L., Navarro, I.T. 2007. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. *Research in Veterinary Science* 82, 202-207.
- Sanderson, M.W., Gay, J.M., Baszler, T.V. 2000. *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. *Veterinary Parasitology* 90 (1-2), 15-24.
- Souza, S.L.P., Guimarães Junior, J.S., Ferreira, F., Dubey, J.P., Gennari, S.M. 2005. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Paraná, Brazil. *Journal of Parasitology* 88, 408-409.
- Vogel, F.S.F., Arenhart, S., Bauermann, F.V. 2006. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e bubalinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Ciência Rural* 36 (6), 1948-1951.
- Vitaliano, S.N., Silva, D.A.O., Mineo, T.W.P., Ferreira, R.A., Bevilacqua, E. Mineo, J.R. 2004. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from southeastern and midwestern regions of Brazil. *Veterinary Parasitology* 122 (4), 253 – 260.

Table 1

Seroprevalence of antibody against *N. caninum* obtained by IFAT in sheep and dogs from farms from central region of São Paulo state, 2010.

Farms	Municipalities	n	Positive sheep	n	Positive dogs
1	Ibitinga	63	0	2	0
2	Ibitinga	113	18 (1.2%)	3	0
3	Ibitinga	133	0	5	0
4	Ibitinga	55	13 (0.9%)	1	1 (2.4%)
5	Ibitinga	63	8 (0.5%)	1	0
6	Itápolis	100	21 (1.4%)	2	0
7	Itápolis	131	11 (0.7%)	3	0
8	Itápolis	96	24 (1.6%)	6	0
9	Itápolis	126	0	5	0
10	Itápolis	100	18 (1.2%)	2	0
11	Borborema	110	0	4	0
12	Borborema	124	0	2	0
13	Borborema	43	0	1	0
14	Tabatinga	55	0	1	0
15	Tabatinga	85	7 (0.5%)	3	1 (2.4%)
16	Tabatinga	100	0	1	0
Total		1497	120 (8.0%)	42	2 (4.8%)

Table 2
Association between variables with the seroprevalence of sheep obtained by IFAT in 16 farms from to the central region of São Paulo state, 2010.

Variables	+	-	P	OR	IC (95%) OR
Farm size (bushel)					
(1-50)	74	768	0.4164	-	-
(51-100)	39	531			
(>100)	7	78			
Main activity					
Livestock	8	55	0.1614	-	-
Agriculture	45	151			
Mixed	67	1171			
Water supply					
Dam	32	199	0.0004	2.15	1.39≤OR≤3.31
Artesian well	88	1178			
Presence of other canids					
Wild	18	95	0.0013	2.38	1.38≤OR≤4.09
Domestic	102	1282			
Slaughtering animals on the property					
Yes	94	1124	0.3989	-	-
No	26	253			
Dogs with access to raw meat or offal					
Yes	78	903	0.8984	-	-
No	42	474			
Type of creating dogs					
Loose	112	1322	0.1620	-	-
Closed	8	55			
Reproductive problems					
Yes	57	469	0.0031	1.75	1.20≤OR≤2.54
No	63	908			

+, positive; -, negative; OR: Odds ratio; %, relative to the total of 1497 evaluated sheep.

Table 3

Association between variables with the seroprevalence of dogs obtained by IFAT in 16 farms from to the central region of São Paulo state, 2010.

Variables	+	-	<i>P</i>	<i>OR</i>	IC (95%) <i>OR</i>
Type of creating					
Loose	2	38	0.6547	-	-
Closed	0	2			
Access to raw meat or offal					
Yes	1	38	0.6184	-	-
No	1	2			

+, positive; -, negative; *OR*: *Odds ratio*; relative to the total of 42 evaluated dogs.