

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**INVESTIGAÇÃO SOROLÓGICA DE ANTICORPOS ANTI-
Neospora caninum E FATORES DE RISCO EM BOVÍDEOS DO
SÍTIO HISTÓRICO E PATRIMÔNIO CULTURAL KALUNGA**

Ana Carolina Ferreira Verissimo
Orientadora: Prof. Dr Valéria de Sá Jayme

GOIÂNIA

2018

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

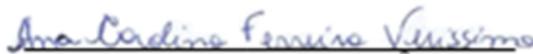
Nome completo do autor: Ana Carolina Ferreira Verissimo

Título do trabalho: **Investigação sorológica de anticorpos *Anti-Neospora caninum* e fatores de risco em bovídeos do Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga**

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura da autora²

Ciente e de acordo:


Assinatura da orientadora²

Data: 06 /03 /2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

ANA CAROLINA FERREIRA VERISSIMO

**INVESTIGAÇÃO SOROLÓGICA DE ANTICORPOS ANTI-*Neospora*
caninum E FATORES DE RISCO EM BOVÍDEOS DO SÍTIO
HISTÓRICO E PATRIMÔNIO CULTURAL KALUNGA**

Dissertação apresentada para a
obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal junto à Escola de
Veterinária e Zootecnia da
Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração: Sanidade
Animal, Tecnologia e Segurança de
alimentos

Orientadora: Prof. Dr. Valéria de Sá
Jayme-EVZ/UFG

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Maria Clorinda Soares
Fioravanti-EVZ/UFG

Prof^ª. Dr Maria Ivete de Moura -
ECAB/PUC Goiás

GOIÂNIA

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Ferreira Verissimo, Ana Carolina
INVESTIGAÇÃO SOROLÓGICA DE ANTICORPOS ANTI-Neospora
caninum E FATORES DE RISCO EM BOVÍDEOS DO SÍTIO
HISTÓRICO E PATRIMÔNIO CULTURAL KALUNGA [manuscrito] / Ana
Carolina Ferreira Verissimo. - 2018.
XI, 61 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme; co-orientadora
Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti; co-orientador Maria Ivete de
Moura.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola
de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Goiânia, 2018.

Bibliografia. Anexos.

Inclui mapas, fotografias, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de
figuras, lista de tabelas.

1. BOVINOS. 2. OOCISTOS. 3. PROTOZOOÁRIOS. 4.
SOROPREVALÊNCIA. I. de Sá Jayme, Valéria, orient. II. Título.

CDU 639.09

1 ATA NÚMERO 488 DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE
2 PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
3 DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. Às 09h00min do dia 14/02/2018, reuniu-se na sala
4 de defesas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, a Comissão Julgadora infra
5 nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Dissertação de Mestrado apresentado (a) pelo
6 (a) Pós-Graduando (a) **Ana Carolina Ferreira Veríssimo**, intitulada: “*Investigação*
7 *soroepidemiológica de anticorpos anti-Neospora caninum e fatores de risco associados em*
8 *bovídeos do sítio histórico e patrimônio cultural Kalunga*”, apresentado para obtenção do Título
9 de Mestre em Ciência Animal, junto à Área de Concentração: **Saúde Animal, Tecnologia e**
10 **Segurança de alimentos**, desta Universidade. O Presidente da Comissão Julgadora, **Profa. Dra.**
11 **Valéria de Sá Jayme**, iniciando os trabalhos, concedeu a palavra ao (a) candidato (a) **Ana**
12 **Carolina Ferreira Veríssimo** para exposição em **quarenta** minutos do seu trabalho. A seguir, o
13 senhor Presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais
14 passaram a arguir o (a) candidato (a), durante o prazo máximo de **vinte** minutos, assegurando-se ao
15 mesmo igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição, que se
16 desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento,
17 considerando o (a) candidato (a) **Aprovado (a) ou Reprovado (a):**

18 Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme (Orientador (a))

19 Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado

20 Profa. Dra. Vanessa Silvestre Ferreira de Oliveira

21 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o(a) candidato(a) **Ana Carolina**
22 **Ferreira Veríssimo**, habilitada [(Habilitado(a) ou não Habilitado(a))
23 pelo(s) motivo(s) abaixo exposto(s):

24 O trabalho, em suas diversas fases (experimental, redação,
25 apresentação e defesa) atendeu aos critérios necessários.
26 _____
27 _____
28 _____
29 _____
30 _____

34

35 A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da dissertação:

36

Título mantido

37

38

39

40

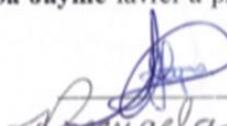
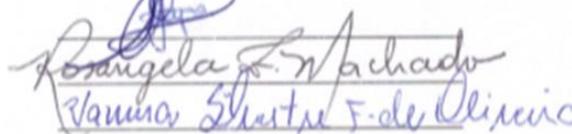
41

42 Nada mais havendo a tratar, eu **Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme** lavrei a presente ata que, após
43 lida e achada conforme foi por todos assinada.

44 Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme

45 Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado

46 Profa. Dra. Vanessa Silvestre Ferreira de Oliveira

Dedico essa conquista aos meus pais e a todos que me ajudaram ininterruptamente nesse período.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e meus mentores espirituais que me deram forças para enfrentar esse novo desafio guiando meus passos durante esta jornada.

Agradeço aos meus pais e a minha família que sempre me incentivaram a estudar e me apoiaram em todas as minhas escolhas. Muito obrigada, papai e mamãe. Sem vocês não haveria conquistas nem realizações. Tudo o que sou hoje é mérito de vocês também.

Agradeço muito ao meu comitê de orientação que foi muito presente em todo meu mestrado me ensinando o significado da palavra equipe. Obrigada pelos ensinamentos diários que me fizeram amadurecer profissional e pessoalmente.

Muito obrigada professora Valéria de Sá Jayme por me aceitar como orientanda e acreditar na minha capacidade como profissional e pesquisadora.

Muito obrigada Maria Ivete de Moura por ser alguém tão presente em minha vida e por sempre me direcionar para o caminho certo, fazendo com que minha insegurança e medo não se tornassem um obstáculo nesta etapa.

Agradeço também a equipe da Professora Maria Clorinda Soares Fioravanti composta pelos seguintes membros: Juliana Moraes Dias, Thais Miranda Silva Freitas, Rayanne Henrique, Sáudio Vieira Peixoto, Joyce Rodrigues Lobo, Luanna Kim Pires Guimarães, Gustavo Costa Lage, Rodolfo Peixoto, Fabrício Camargo, Luana Ribeiro, Ítalo Henrique Iara, Manoella Sena Araújo, Sandes Oliveira, Mariana Dallagnol, Maria Clara Bastos, Nathasha Freitas Marcelino, Marynis Santos, Paula Damasceno Gomes, Giovanna Rocha, Camila Nunes Figas.

Muito obrigada ao meu namorado Ricardo de Castro Santos Paim que me ajudou e me incentivou muito durante este período sempre com muita paciência e doçura.

Agradeço ao Reinaldo Pereira da Silva e Valtuir da Silva Cardoso, que nos transportaram em segurança e nos auxiliaram nas atividades à campo.

Agradeço à toda comunidade Kalunga que nos acolheu e se pôs à disposição para nos ajudar na aproximação com os produtores e nas colheitas de sangue dos animais. Essa convivência engrandecedora proporcionou frutos científicos e pessoais.

À Universidade Federal de Goiás que forneceu o combustível possibilitando as nossas viagens. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pelos docentes e por toda a estrutura disponível aos seus discentes.

Agradeço a Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro, sempre apoiando o avanço da pesquisa no Brasil.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (Fapeg) pela Chamada Pública n.º 07/2012 – PRONEX/FAPEG/CNPq – Programa de Apoio a Núcleos de Excelência, fonte de financiamento para a execução deste trabalho.

Aos pesquisadores do Laboratório de Processamento de Imagens e GeoProcessamento (LAPIG), em especial o Prof. Laerte Guimarães Ferreira pela disponibilidade em esclarecer questões relacionadas aos aspectos geográficos deste trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
1.INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Morfologia e ciclo biológico do <i>Neospora caninum</i>	3
2.1.1 Aspectos epidemiológicos gerais e fatores de riscos associados ao <i>Neospora caninum</i>	6
2.1.2 Controle, prevenção e impactos sanitários e econômicos	8
2.1.3 Métodos de diagnóstico.....	11
2.1.3.1 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática(ELISA).....	11
2.1.3.2. Teste de aglutinação direta de <i>Neospora</i> (NAT).....	12
2.1.3.3 Reação em cadeia de polimerase(PCR).....	13
2.1.3.4. Imunofluorescência Indireta (IFI)	13
2.1.3.5. Detecção de <i>N.caninum</i> por diferentes técnicas	13
2.1.4. Desafios associados ao diagnóstico da neosporose em bovinos	14
3. JUSTIFICATIVA.....	16
4. OBJETIVOS	17
4.1. Objetivo geral.....	17
4.2. Objetivos específicos.....	17
CAPÍTULO 2- FATORES DE RISCO PARA A OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>Neospora caninum</i> EM BOVINOS DO SÍTIO HISTÓRICO E PATRIMÔNIO CULTURAL KALUNGA	18
1.INTRODUÇÃO	18
2.1. Área geográfica do estudo e amostragem dos animais.....	20
2.2. Metodologia	21
2.3. Análise estatística.....	24
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4. CONCLUSÃO	38
CAPÍTULO 3-CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXO A- Modelo de questionário socioeconômico.....	48
ANEXO B- Modelo padrão das recomendações sanitárias entregues aos proprietários do Sítio Histórico Patrimônio Cultural Kalunga.....	49
ANEXO C- Termo de compromisso do produtor	50

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1- (A) Esfregaço de fígado de rato infectado experimentalmente com *N.caninum* corado por Giemsa: (a) taquizoíto, (b) taquizoíto antes da divisão, (c) três taquizoítos se dividindo e comparação com o tamanho em relação à célula sanguínea (seta). (B) Corte histológico de medula espinhal de bezerro infectado com cisto dentro de um neurônio. Observa-se a espessura da parede do cisto (setas opostas), os bradizoítos (triângulo aberto), núcleo de célula hospedeira(seta).(C) oocistos esporulados.(D) oocisto esporulado(seta) com dois esporocistos internos, não corado..... 4
- FIGURA 2 -Ciclo biológico completo do *N. caninum* apresentando a replicação sexual no hospedeiro definitivo (canídeos) e replicação assexuada no hospedeiro intermediário (p.e. bovinos). A transmissão horizontal ocorre pela ingestão de tecidos contaminados com cistos pelo hospedeiro definitivo ou por água ou pastagem contaminados por oocistos pelo hospedeiro intermediário. A transmissão vertical ocorre pela transmissão via placenta através da fêmea bovina gestante para a prole. 6
- FIGURA 3- Frequência de causas não determinadas, não infecciosas, infecções por protozoários, bactérias, fungos e associações entre agentes diagnosticados em fetos bovinos abortados no período de 2003-2011..... 15
- FIGURA 4-Representação cartográfica do Sítio e Patrimônio Cultural Kalunga localizado na microrregião da Chapada dos Veadeiros, Goiás..... 20
- FIGURA 5- (A)Bovino devidamente contido com o auxílio de dois laçadores da comunidade Kalunga, para a realização da coleta de sangue por punção da veia jugular utilizando tubo *vacutainer* sem anticoagulante pela médica veterinária. (B)Aplicação do questionário ao proprietário, para obtenção de informações zoonosológicas e socioeconômicas. 22
- FIGURA 6- (A)Ficha de controle contendo informações referentes ao procedimento do teste de ELISA. (B) Identificação das amostras, contendo a numeração dos animais e sua respectiva região. (C) Abaixo encontra-se a placa referente à ficha controle. Esta foi impregnada de antígeno, com 96 cavidades e

utilizada para detecção de anticorpos anti-*N.caninum* de soro bovino. Após a execução de todos as etapas as amostras positivas formaram imunocomplexos, os quais foram evidenciados por sua coloração subsequente. 23

FIGURA 7-Prevalência de anticorpos anti- *Neospora caninum* em rebanhos do Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga, no período de 2014 a 2016 26

FIGURA 8-Curral em uma propriedade do Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga. 28

LISTAS DE TABELAS

TABELA 1-Prevalência de anti- <i>Neospora caninum</i> em bovídeos por região do Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga	25
TABELA 2-Análise das variáveis obtidas por meio de questionário epidemiológico aplicado aos proprietários do Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga, de 2014 a 2016.....	27
TABELA 3-Prevalência de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> de acordo com a espécie, raça, sexo e idade nos bovídeos de acordo com o sexo, espécie e raça de bovídeos do Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga, de 2014 a 2016	31
TABELA 4-Variáveis obtidas por meio de questionário aplicado aos proprietários rurais do Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga e variáveis edafoclimáticas obtidas por meio do banco de dados do Instituto de Estudos Sócio-Ambientais da Universidade Federal de Goiás, que apresentaram associação quando comparadas à prevalência de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> , por meio da análise univariada ($p < 0,05$), de 2014 a 2016	33
TABELA 5- Fatores de riscos correlacionados com prevalência de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> e em bovídeos do Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga, de 2014 a 2016, considerando sim como referência	34

RESUMO

A prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos dos rebanhos do Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga (SHPKC) e os fatores de risco associados foram avaliados. Foram estudadas 141 propriedades SHPCK e foram coletadas 4.810 amostras de soro bovino e 47 amostras de búfalos Murrah, totalizando 4.857 bovinos, incluindo animais de diferentes raças, diferentes grupos etários e macho e fêmeas. O ensaio de imun absorção enzimática (ELISA) foi utilizado para identificar os animais sororreagentes para anticorpos anti-*N. caninum*. Foi aplicado um questionário para obter informações sobre dados socioeconômicos e zootécnicos dos proprietários e para verificar os fatores de risco associados à ocorrência da neosporose. A prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* nos animais da região SHPCK foi de 8,3%, representado por 405 animais positivos e 75,2% em nível do rebanho. Os seguintes fatores foram associados à ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum*: temperatura anual, temperatura máxima no dia mais quente do mês, temperatura mínima mais fria do mês, vacinação contra a febre aftosa, vacinação contra clostridioses, contato com animais selvagens, alta precipitação e presença de áreas alagadiças.

Palavras-chave: Bovinos, oocistos, protozoários, soroprevalência.

ABSTRACT

The prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle from Kalunga Historical Heritage and Cultural Heritage (SHPKC) herds and associated risk factors were evaluated. A total of 141 SHPCK properties were studied and 4,810 bovine serum samples and 47 Murrah buffalo samples were collected, totaling 4,857 cattle, including animals of different races, different age groups, and male and female. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to identify seroreagent animals for antibodies anti-*N. caninum*. A questionnaire was applied to obtain information on socioeconomic and zootechnical data of the owners and to verify the risk factors associated with the occurrence of neosporosis. The prevalence of anti-*N. caninum* in animals from the SHPCK region was 8.3%, represented by 405 positive animals and 75.2% at the herd level. The following factors were associated with the occurrence of antibodies anti-*N. caninum*: annual temperature, maximum temperature on the hottest day of the month, coldest minimum temperature of the month, vaccination against foot-and-mouth disease, vaccination against clostridiosis, contact with wild animals, high precipitation and presence of wetlands.

Key words: Cattle, oocysts, protozoa, seroprevalence.

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.INTRODUÇÃO

A bovinocultura no Brasil atingiu um lugar de destaque no cenário do agronegócio, alcançando não somente uma importância econômica, mas também social, com consequente geração de empregos, que se estende desde a fazenda até a indústria¹.

Para a formação de um rebanho de alta produtividade, o produtor, além de aplicar melhorias no manejo sanitário e nutricional, deve investir em tecnologias como o melhoramento genético, para otimizar o desempenho produtivo e reprodutivo de seu plantel^{2,3}.

Estimou-se que em 2015 o Produto Interno Bruto (PIB) do Brasil atingiu R\$ 5,9 trilhões, com 21% do PIB brasileiro gerado pelo agronegócio da cadeia produtiva da carne, totalizando R\$ 1,26 trilhões. Devido à representatividade econômica da bovinocultura no país o cuidado com a saúde animal é fundamental para evitar perdas econômicas⁴.

Equilibrar aspectos sanitários e socioeconômicos é um desafio constante em que vários entraves devem ser sanados ao longo do processo produtivo da bovinocultura. Entre estes obstáculos está a aplicação de um programa de monitoramento sanitário, que visa detectar precocemente os patógenos que venham a comprometer a saúde desses animais. De forma complementar, devem ser adotadas medidas preventivas, tais como a vacinação e vermifugação do rebanho, as quais contribuem com a preservação da saúde humana e animal, além de evitar prejuízos econômicos^{2,5}.

Para evitar esses impactos se faz necessário, portanto, estabelecer práticas sanitárias no rebanho com o intuito de promover a higiene dos animais. Entretanto, dentre outros aspectos, há uma resistência por parte do produtor em implantar estas ações em sua propriedade, em razão de diversos fatores como o limitado conhecimento, acesso ou compreensão do produtor sobre a importância de estabelecer medidas preventivas. Outra condição que dificulta a execução dessas ações sanitárias, refere-se ao interesse do produtor, que não observa vantagens econômicas a curto prazo, em aplicá-las em sua propriedade^{2,3}.

Entre as perdas econômicas, as de maior impacto são as de caráter reprodutivo, que podem abranger ou não causas infecciosas como a brucelose, leptospirose, diarreia viral bovina (BVD), rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) e neosporose ⁶.

Devido à sua distribuição mundial e transmissibilidade, os prejuízos causados pelo *N.caninum* à indústria de gado no mundo resultam em perdas econômicas significativas e ineficiência de produção. Assim, o protozoário é considerado como um importante agente patogênico reprodutivo em bovinos, ocasionando o aborto e a mortalidade perinatal. Calcula-se que o custo de um aborto causado por *N.caninum* tem o valor monetário equivalente a produção de uma lactação ⁷. Verificou-se que o impacto econômico ocasionado pela infecção e/ou aborto causado por protozoário *Neopora caninum*, foi estimado em cerca de um bilhão de dólares por ano ⁷.

Em razão dos impactos econômicos causados na bovinocultura, que incluem, aborto, intervalo de parto prolongado, redução da produção de leite e altos custos com a reposição de animais, a neosporose bovina vem sendo considerada como uma importante doença reprodutiva ^{7,8}.

Apesar da infecção afetar a rentabilidade da atividade, já foi apontado que em média a taxa de aborto deve atingir cerca de 5% para os profissionais considerarem a necessidade de investigar a causa da falha reprodutiva, o que compromete o diagnóstico definitivo ⁸. Somado a isso, a percepção do aborto no rebanho pelo proprietário e o intervalo de tempo entre o primeiro aborto até a solicitação do serviço médico veterinário à propriedade, é um fator que pode dificultar a determinação do patógeno. Conjuntamente a isso, a colheita e armazenamento de amostras biológicas de maneira inadequada, a falta de informações para compor o histórico clínico do rebanho, a ocorrência de outras infecções simultâneas no rebanho e a ausência de testes rápidos de diagnósticos prejudicam a detecção do patógeno causador de falhas reprodutivas ⁹.

Considerando o exposto, constituíram-se objeto deste estudo identificar a soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovídeos e avaliar seus fatores de risco do Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga .

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Morfologia e ciclo biológico do *Neospora caninum*

A neosporose é uma doença parasitária ocasionada pelo *N. caninum*, um parasito coccidiano intracelular obrigatório pertencente ao Filo Apicomplexa capaz de infectar animais domésticos e selvagens. O *N. caninum* foi inicialmente reconhecido em 1984 na Noruega em cães que apresentaram sinais clínicos neurológicos¹⁰. Em 1988, realizou-se o isolamento e inoculação do *N. caninum* em cães, sugerindo a transmissão transplacentária¹¹. Somente em 1989 o *N. caninum* foi relacionada com a ocorrência de abortos em fêmeas da raça holandesa, no Novo México¹².

No ano de 1998, McAllister avaliou fezes de cães que consumiram ratos infectados com *N. caninum* e constatou a presença da forma esporulada do parasito, confirmando que o cão era o hospedeiro definitivo da doença¹³. No Brasil, em 1999, foi confirmada a presença de *N. caninum* em bovinos leiteiros, pela detecção de anticorpos anti-*N. caninum* pela técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI)¹⁴. Sugere-se que há outras espécies do gênero *Neospora*, como *N. hughesi*, que foi detectada em cavalos, os quais foram considerados hospedeiros intermediários do parasito e que apresentavam desordens reprodutivas. *N. hughesi* esta parece diferir do *N. caninum*, registrando-se que não foi detectada sua presença em bovinos^{15,16}.

O ciclo biológico do *N. caninum* é heteroxeno, ou seja, envolve mais de um hospedeiro. Os canídeos compõem o ciclo biológico como hospedeiros definitivos e os bovinos, bem como outras espécies herbívoras, atuam como hospedeiros intermediários. O parasito apresenta três estágios: taquizoítos, bradizoítos e oocistos. O primeiro, encontra-se dentro da célula do hospedeiro intermediário, na fase aguda da infecção e diferencia-se em bradizoítos devido à resposta imune contra o protozoário, resultando na formação de cistos de tecido^{16,17}. Os bradizoítos têm um formato arredondado ou ovalado e medem cerca de 107 micrômetros de diâmetro e quatro micrômetros de espessura de parede. Os cistos de tecido podem persistir durante a vida do hospedeiro intermediário sem causar manifestações clínicas significativas¹⁷. São encontrados principalmente no sistema nervoso central e possuem em seu interior bradizoítos (Figura 1). Este corresponde ao estágio de multiplicação lenta e ocorre quando o sistema imune do hospedeiro intermediário não é favorável ao protozoário, o qual conserva-se em estado de latência. Sua conformação é delgada e mede oito micrômetros por dois micrômetros

de largura. Estes podem sobreviver em temperatura em torno de 4° C por até duas semanas, contudo não resistem a temperaturas de congelamento¹⁶.

Os taquizoítos têm conformação de meia lua e medem aproximadamente seis micrômetros de comprimento por dois micrômetros de largura. São encontrados em células neurais, macrófagos, fibroblastos, células do endotélio vascular, miócitos, células do epitélio do túbulo renal e hepatócitos¹⁶. Nesse estágio penetram na célula do hospedeiro por invasão ativa, alojando-se no vacúolo parasitóforo da célula do hospedeiro intermediário. Sua multiplicação é assexuada e a partir de um taquizoíto original formam-se outros dois. E, devido à rápida divisão, a célula sofre lise instalando a infecção no hospedeiro¹⁶.

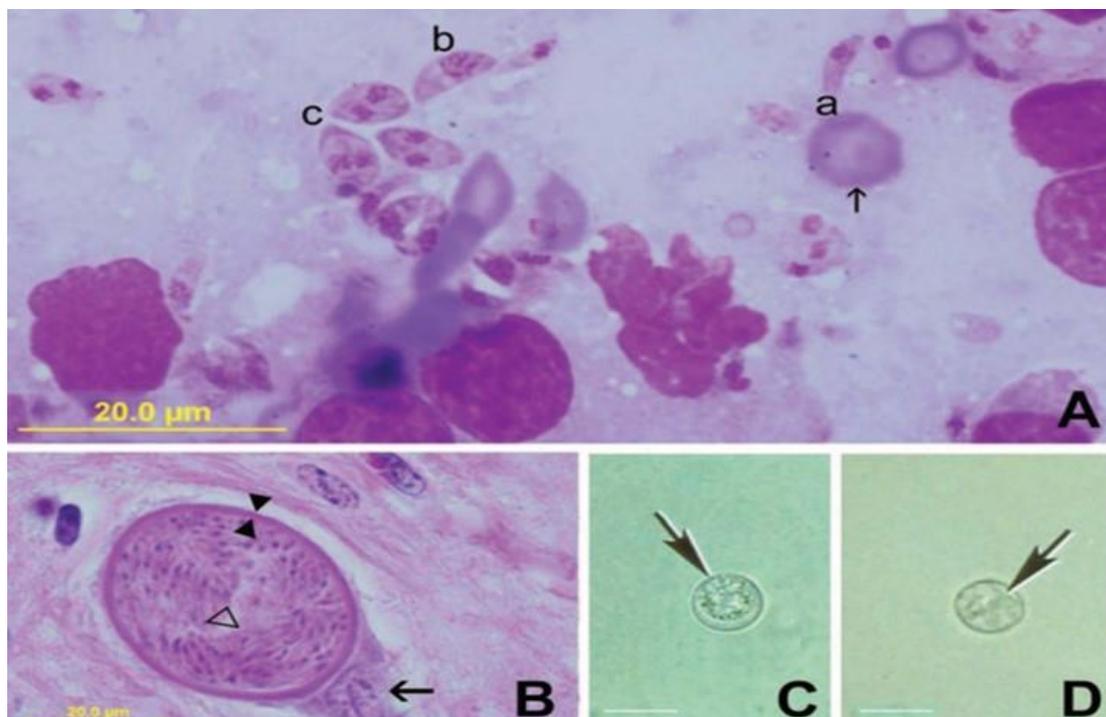


FIGURA 1- (A) Esfregaço de fígado de rato infectado experimentalmente com *N.caninum* corado por Giemsa: (a) taquizoíto, (b) taquizoíto antes da divisão, (c) três taquizoítois se dividindo e comparação com o tamanho em relação à célula sanguínea (seta). (B) Corte histológico de medula espinhal de bezerro infectado com cisto dentro de um neurônio. Observa-se a espessura da parede do cisto (setas opostas), os bradizoítos (triângulo aberto), núcleo de célula hospedeira (seta). (C) oocistos esporulados. (D) oocisto esporulado (seta) com dois esporocistos internos, não corado.

Fonte: Adaptado de Dubey et al¹⁶

Os hospedeiros definitivos relacionados com o agente são o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*)¹¹, coioite (*Canis latrans*)¹⁸, lobo cinzento¹⁹ (*Canis lupus*) e dingo (*Canis lupus dingo*)²⁰, os quais são infectados através da ingestão de tecidos contendo bradizoítos, tais como tecidos fetais ou placentários não autolisados¹⁶. Os hospedeiros definitivos eliminam no ambiente oocistos não esporulados nas fezes, cinco dias após

serem infectados, experimentalmente ou naturalmente^{14,16}. A excreção dos oocistos tem sua quantidade e duração variáveis, as quais podem ser afetadas pela idade do canídeo, se este está ou não imunossuprimido e pelo tipo de tecido ingerido¹⁶. Não se sabe se esta eliminação é contínua ou se o cão volta a excretá-los devido à re-infecção¹⁷. A esporulação desse oocisto ocorre cerca de 24 horas após sua eliminação, o qual pode ser ingerido pelo hospedeiro intermediário, como bovinos, por meio da água e alimentos contaminados com oocistos esporulados, forma infectante no ambiente, caracterizando assim a via horizontal (Figura 2)^{16,17}.

Devido à localização intracelular do *N.caninum*, o organismo é estimulado a desenvolver uma resposta imune envolvendo a participação de células Th1. Estas são responsáveis pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ e IL-12, promovendo a defesa do hospedeiro contra o parasito²⁰⁻²².

Outro mecanismo imunológico ocorre naturalmente durante o período gestacional da fêmea, em que há a liberação de células Th2, as quais são responsáveis por evitar a rejeição do feto e assegurar a manutenção da gestação. Para garantir esse bem-estar fetoplacentário e da fêmea deve haver um equilíbrio da produção de células Th1 e Th2. Esta estabilidade imunológica pode ser comprometida, por exemplo, quando esta gestante é infectada ao ingerir alimentos e água contaminados com oocistos esporulados (transmissão transplacentária exógena), o que pode prejudicar a sobrevivência do feto²².

Essa variação do equilíbrio Th1/Th2 também pode ser ocasionada quando essa gestante sofre uma imunossupressão, decorrente de algum desafio ambiental, sanitário ou nutricional. Esta imunossupressão, em fêmeas bovinas cronicamente infectadas por *N.caninum*, possibilita a reativação de bradizoítos (transmissão transplacentária endógena). Os bradizoítos diferenciam-se em taquizoítos, os quais invadem e se multiplicam rapidamente nas células do hospedeiro promovendo a infecção da placenta e do feto^{22,23}. Esta disseminação parasitária pode desencadear uma produção expressiva de IFN- γ e IL-12, podendo ocasionar o aborto¹⁶.

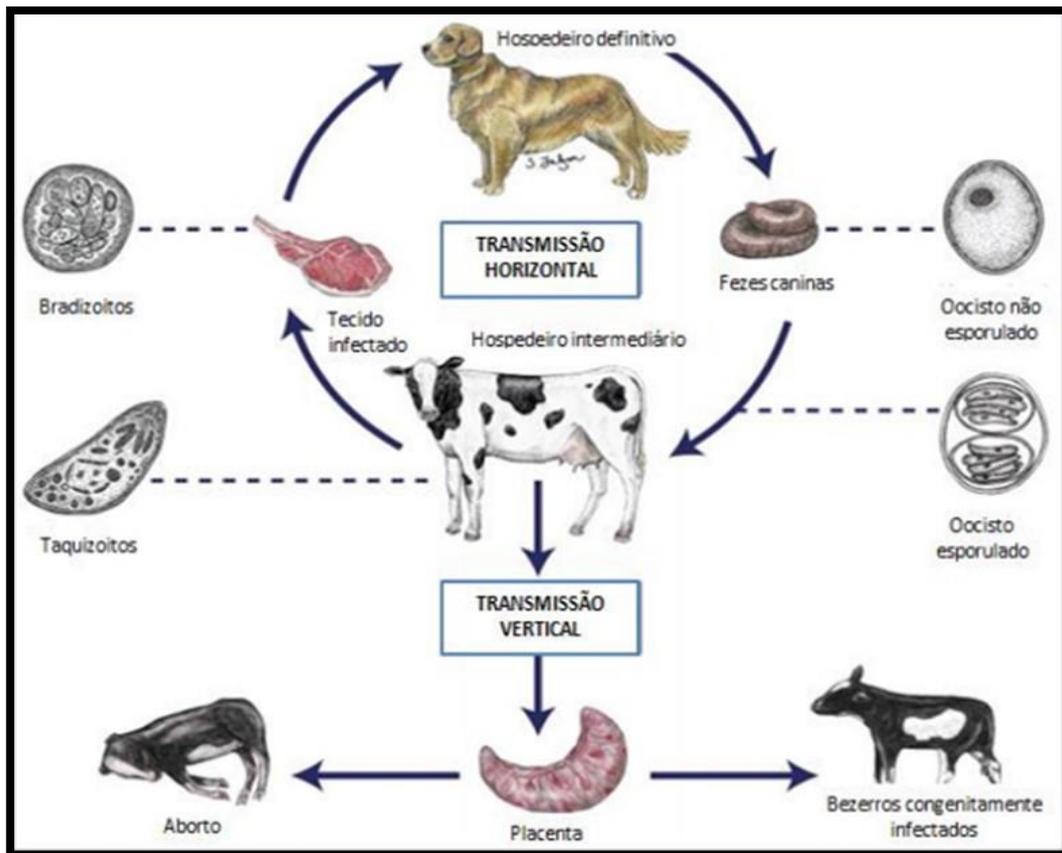


FIGURA 2 -Ciclo biológico completo do *N. caninum* apresentando a replicação sexual no hospedeiro definitivo (canídeos) e replicação assexuada no hospedeiro intermediário (p.e. bovinos). A transmissão horizontal ocorre pela ingestão de tecidos contaminados com cistos pelo hospedeiro definitivo ou por água ou pastagem contaminados por oocistos pelo hospedeiro intermediário. A transmissão vertical ocorre pela transmissão via placenta através da fêmea bovina gestante para a prole.

Fonte: Dubey et al.¹⁸

2.1.1 Aspectos epidemiológicos gerais e fatores de riscos associados ao *Neospora caninum*

A neosporose é uma enfermidade cosmopolita, de frequência variável, entre 14,9% a 34,7% em bovinos no Brasil²⁴. Ocorre maior prevalência em regiões de temperaturas e umidades amenas, as quais favorecem a esporulação e sobrevivência do *N.caninum*¹⁶. A infecção pelo parasito não foi demonstrada em humanos, assim como não se detectou a presença de anticorpos ou DNA, não podendo ainda ser considerada uma zoonose¹⁶. Algumas amostras foram encontradas em bovinos, tais como Nc-Spain 7, Nc-Spain 8, Nc-Illinois, as quais demonstraram diferença em relação a sua patogenicidade²⁵.

Estudos experimentais consideram como um fator de risco ligado à soropositividade de bezerros, a ingestão de colostro contendo taquizoítos¹⁶. Isso ocorre devido à produção de ácido clorídrico e enzimas em animais recém-nascidos, que

conjuntamente com presença de inibidores de pepsina no colostro facilitam a sobrevivência dos taquizoítos possibilitando a infecção da prole. Outros resultados foram demonstrados a partir do aleitamento de bezerros soronegativos com leite de vacas sororreagentes, em que não houve a infecção dos bezerros. Dessa forma, a transmissão lactogênica de *N. caninum* não foi demonstrada naturalmente¹⁷. Detectou-se DNA de *N.caninum* em sêmen de touros infectados naturalmente, contudo a infecção não foi estabelecida em razão da viabilidade e quantidade dos taquizoítos¹⁶. Embora a presença do parasita tenha sido detectada no sêmen não há evidências de sua transmissão venérea em infecções naturais^{9,17}.

Em vacas infectadas pelo agente é possível ocorrer a repetição de cio, natimortos e abortos, sendo este último o sinal clínico mais observado, que ocorre entre o quinto ao sétimo mês de gestação. Os fetos podem morrer no útero ou ser reabsorvidos, mumificados, autolizados, nascer com sinais clínicos ou normais, mas persistentemente infectados^{9,16}. A transmissão transplacentária já foi demonstrada em várias pesquisas, e sua eficiência varia entre 75% e 90%^{16,26}. Em um estudo foi observado que a transferência de embriões pode ser uma alternativa para evitar a transmissão vertical. Esta mesma pesquisa notou-se que vacas soronegativas que receberam embriões doados de vacas soropositivas geraram não infectados por *N.caninum*²⁶. A maioria dos bezerros nascidos de mães infectadas são clinicamente normais, mas estão infectadas permanecendo por toda sua vida e a infecção por *N. caninum* pode ser mantida ao longo de várias gerações por transmissão vertical¹⁷.

A presença de fetos abortados ou restos placentários também representam fontes de infecção do *N. caninum* para hospedeiros definitivos e intermediários. Como consequência, pode ocorrer a transmissão horizontal devido à contaminação da pastagem com as fezes do hospedeiro definitivo. Isso facilita a disseminação do agente, indicando que cães podem ser um fator de risco associado à soropositividade em rebanhos bovinos e, já foi apontado que em fazendas com cães a chance de ter bovinos positivos aumenta em até 66%. Nesse contexto, devido à possibilidade de contato direto de canídeos infectados(selvagens ou domésticos) com o rebanho, é necessário atentar-se as práticas de alimentação e fonte de água destinadas aos bovinos, que podem representar um fator de risco, em razão da disponibilidade de restos placentários aos cães associada ao livre acesso dos mesmos às áreas de alimentação dos bovinos⁹. Ressalta-se que a dispersão dos oocistos pode ser reduzida com a adoção de cuidados mínimos como enterrar ou

incinerar restos placentários de abortos, evitando assim a ingestão pelos hospedeiros definitivos.²⁷

A identificação de vacas soropositivas em fazendas livres de cães sugere a possibilidade do ciclo silvestre. Realizou-se a pesquisa de anticorpos anti-*N.caninum* em espécies de vida selvagem de países europeus verificando sorologia positiva em raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), gato selvagem europeu (*Felis silvestris silvestris*), texugo euro-asiático (*Meles meles*), e em ruminantes selvagens como veados vermelhos (*Cervus elaphus*). Essas descobertas podem ter implicações importantes para os ciclos silvestres e domésticos, uma vez que o primeiro pode afetar a prevalência de infecção em bovinos devido a possibilidade de novos hospedeiros intermediários¹⁷.

2.1.2 Controle, prevenção e impactos sanitários e econômicos

Uma série de elementos, tais como o acesso à assistência médica veterinária adequada, a falta de acesso à informação por parte dos produtores, ou a falta de interesse destes em monitorar a saúde do rebanho e a possibilidade dos animais serem acometidos por enfermidades, aumenta significativamente a chance de infecção por *N.caninum*, acarretando em perdas econômicas⁷. A neosporose é considerada a quinta causa de aborto em bovinos e apresenta um difícil controle²⁸. Para que esse controle seja eficaz, deve-se observar primeiramente os pontos relevantes para instalação e manutenção da enfermidade no rebanho, abrangendo informações relativas a principal via de transmissão, a prevalência de anticorpos anti-*N.caninum* de animais soropositivos na população e fatores de risco associados ao parasito. Desse modo, os programas de controle devem ser estabelecidos de modo que seja calculado e avaliado o custo-benefício destas ações, abrangendo as despesas de testes e medidas de controle comparando-as com as perdas econômicas ocasionados pela infecção por *N. caninum*¹⁶.

Inicialmente deve ser realizar a sorologia dos animais, a fim de detectar a presença de anticorpos específicos anti-*N. caninum*, que de acordo com a técnica adotada pode sugerir a principal via de transmissão direcionando as ações de controle. Em propriedades em que a via transplacentária é a forma principal de transmissão, sugerem-se o descarte as fêmeas soropositivas e realizar a prova sorológica dos animais antes de integrá-los ao rebanho¹⁶. Estas ações permitem a diminuição de perdas reprodutivas e

produtivas, pois a manutenção do agente em rebanhos leiteiros afeta negativamente a produção, reduzindo-a em até um quilo de leite nas fêmeas sororreagentes⁹.

A exclusão de bezerras soropositivas do rebanho também pode ser considerada uma estratégia no controle de neosporose bovina. Na Suíça, a eficácia do controle foi verificada por meio de testes sorológicos em todo o rebanho em que as fêmeas bovinas sororreagentes foram eliminadas, resultando em retornos econômicos satisfatórios¹⁹. Recomenda-se eliminar vacas soropositivas que tiveram dois ou mais abortos para reduzir a taxa de aborto nos rebanhos¹⁷. Verificou-se que a não utilização de fêmeas bovinas soropositivas para fins reprodutivos pode ser uma opção financeiramente viável, em propriedades com prevalência em torno de 50%⁹.

Outra ação eficaz é destinação adequada das carcaças, o que contribui para o controle de inúmeras enfermidades. A correta eliminação da placenta evita que os canídeos se alimentem de tecidos infectados pelo agente e conseqüentemente os hospedeiros definitivos não disseminam oocistos no ambiente, controlando a transmissão horizontal da doença⁹.

Em um estudo realizado na Flórida (EUA), com 700 fêmeas bovinas reagentes ao *N. caninum*, constatou-se a redução de três a quatro por cento de leite por fêmea lactante, ocasionando perda de 128 dólares por animal, considerando 305 dias de lactação²⁹. Estima-se que na indústria australiana a neosporose cause na produção de carne bovina prejuízo de até \$ US139.5 milhões anualmente³⁰. Na Costa Rica, as vacas soronegativas produziram 84,7 litros de leite a mais que as fêmeas soropositivas³¹. Isso demonstra a relevância da implantação de medidas sanitárias através do conhecimento dos fatores de risco associados ao patógeno, já que inúmeros elementos como condições climáticas são capazes de alterar a prevalência da enfermidade em cada região.

Em outra pesquisa também relacionado aos impactos financeiros e aspectos sanitários realizado no ano de 2013, contabilizou-se em aproximadamente US\$ 546,3 milhões de dólares o impacto causado pela infecção de *N. caninum* em rebanhos dos Estados Unidos⁷. Em relação à bovinocultura de corte, outra análise realizada em 2007, também nos Estados Unidos indicou perdas econômicas, decorrentes de abortos ocasionados por *N. caninum*, de US\$ 35.000.000 por ano. Na Nova Zelândia e na Austrália estimou-se que os custos aproximavam-se de US\$ 100 milhões/ano¹⁶. Na Suíça, devido aos prejuízos financeiros, a neosporose bovina é uma doença de notificação obrigatória desde 2001¹⁶.

A relevância desses valores na economia deve-se em razão da bovinocultura brasileira ser uma cadeia geradora de empregos que envolve mais de três milhões de pessoas somente na indústria leiteira. Para muitos desses produtores de leite, a atividade é o sustento da família e condiciona sua moradia no local, já que 74% desses residem na propriedade, mostrando o papel socioeconômico da prática leiteira no Brasil. Desse modo, o homem é mantido no campo, reduzindo o êxodo rural, uma vez que a mão de obra é predominantemente familiar, evidenciando assim a importância desses trabalhadores para o desenvolvimento da atividade leiteira³.

Para a maioria desses, um entrave da atividade está relacionado com os altos custos de produção e baixa produtividade dos animais, que podem estar associados a manejos insatisfatórios realizados na propriedade, afetando negativamente o desempenho produtivo e reprodutivo do animal³.

Em estudo realizado no Mato Grosso do Sul em propriedades dedicadas à pecuária de corte, observou-se que apesar dos produtores rurais conhecerem os programas sanitários estes, não os implantam devido às dificuldades operacionais associadas à sua instalação e a falta de vantagens econômicas, segundo justificativa dos produtores². Dessa forma, faz-se necessário esclarecer aos produtores a importância das ações sanitárias e quais seus impactos na saúde e na economia da atividade.

Assim, a realização de testes sorológicos e descarte dos bovinos infectados têm sido considerados as opções mais eficazes, todavia com alto custo em razão da reposição desses animais³². Apesar de oneroso, o descarte de animais resultaria no esgotamento gradual de indivíduos soropositivos reduzindo a possibilidade de transmissão transplacentária no rebanho²⁷.

Para minimizar a prevalência de *N.caninum* dentro do rebanho, o *status* sorológico dos animais precisa ser monitorado anualmente, avaliando todos os animais, com exceção de bezerros com menos de seis meses de idade para evitar a detecção de anticorpos de colostro, é um método eficaz e rápido de detecção da infecção e estimar o risco de aborto em um rebanho⁹. De forma complementar, recomenda-se a realização de histopatologia e imuno-histoquímica a fim de identificar as lesões e PCR para detecção de DNA do parasita em fetos abortados¹⁷.

Não há uma padronização para a estratégia de controle da infecção por *N.caninum* devido às diferenças regionais que influenciam na epidemiologia da enfermidade em bovinos. Por isso recomenda-se uma investigação sorológica associada aos fatores de risco envolvidos a fim de direcionar e estabelecer um programa de controle.

2.1.3 Métodos de diagnóstico

O aborto em bovinos é uma das principais causas de perda econômica em todo o mundo e seu diagnóstico é complexo e multifatorial. O diagnóstico é essencial para controlar e limitar a propagação do agente, sendo necessária a submissão de amostras biológicas aos testes mais adequados, com o intuito de um diagnóstico rápido e preciso³³. Os métodos diretos de detecção de antígenos e/ou DNA, tais como histopatologia, imunohistoquímica e PCR, são os preconizados na detecção do agente etiológico, pois estes conseguem evidenciar as lesões no tecido, sugerindo o possível causador do aborto³⁴.

Há uma variedade de ensaios disponíveis, tais como os testes de ELISA ou de IFI, os quais possibilitam determinar os títulos de anticorpos maternos em casos de aborto ou para a análise sorológica de *N. caninum* em rebanhos bovinos. As perdas econômicas decorrentes da infecção por *N. caninum* são expressivas, como reportado, e reforçaram a necessidade de desenvolvimento e aplicação de métodos de diagnóstico com maior sensibilidade e especificidade, para auxiliar na elaboração e aplicação de medidas adequadas de prevenção e controle. Uma vez que a infecção de *N. caninum* e / ou o aborto em um rebanho foram confirmados, recomenda-se que a soroprevalência dentro do rebanho seja estimada e que os abortos nos rebanhos sejam analisados^{16,17}.

2.1.3.1 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática(ELISA)

Em 1994, houve a aplicação e padronização do Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), através de proteínas extraídas de taquizoítos e incorporadas a complexos imunoestimulantes (ISCOM), o que possibilitou detectar os anticorpos em cães³⁵. Em 1995, Paré et al. também desenvolveram uma técnica de ELISA, a qual diferiu-se da anterior devido à utilização de múltiplos antígenos para permitir o máximo de sensibilidade do teste³⁶.

Nos anos seguintes várias técnicas de ELISA foram sugeridas, com o intuito de se obter maior sensibilidade e especificidade da técnica, tais como ELISA com proteínas recombinantes, cujo método abrangeu a detecção do agente e sua posterior utilização para

fabricação de vacinas. Seguidamente, vieram o teste ELISA com antígeno bruto (indireto), ELISA com taquizoítos purificados e o ELISA de captura de antígeno, o qual detecta anticorpos específicos no soro de fêmeas bovinas e suas proles, o que pode sugerir a transmissão vertical³⁷.

Em 1997, Björkman et al. demonstraram a aplicabilidade do teste de ELISA indireto na detecção de anticorpos no soro e no leite, permitindo a verificação da presença do *N.caninum* a nível de rebanho³⁸. Para complementar a investigação epidemiológica da enfermidade em rebanhos no ano de 1999, foi desenvolvido o teste de ELISA de avididade de IgG, o qual é capaz de discriminar se a presença de *N.caninum* é aguda ou crônica. Esta técnica auxilia no reconhecimento da principal via de transmissão no plantel, o que se faz necessário devido aos testes sorológicos apenas demonstrarem os anticorpos específicos no soro do animal, indicando a presença por *N.caninum*, mas não discriminando a cronicidade da infecção^{37,42}.

Foi apontado em estudos a confiabilidade dos testes de ELISA comerciais disponíveis para o diagnóstico sorológico de neosporose em bovinos, constatando-se boa concordância entre os testes, sendo indicadas em avaliações sorológicas a nível de rebanho⁴⁴.

Ressalta-se que ao se comparar diferentes técnicas de ELISA, constatou-se que a vantagem do ELISA competitivo é que este possibilita calcular o nível de anticorpos contra um único epítipo, e possui uma especificidade 96%, sendo, portanto, mais específico que os ELISA convencionais^{20,59}. Já o teste de ELISA com proteínas recombinantes permite verificar a titulação de bezerros pré-ingestão de colostro, sugerindo a transmissão do parasita, além de constatar a indução da resposta humoral⁹. Já o ELISA competitivo não são específicos para espécies hospedeiras, sendo útil em investigações epidemiológicas em animais selvagens, os quais estão envolvidos no ciclo do *N. caninum*, ou também auxiliar na descoberta de novos hospedeiros⁴⁰.

2.1.3.2. Teste de aglutinação direta de *Neospora* (NAT)

Em 1998, Romand et al.³⁸ desenvolveram o teste de aglutinação direta de *Neospora* (NAT), o qual detecta e quantifica as imunoglobulinas contra o *N. caninum*. É um teste simples e versátil, o qual detecta os anticorpos IgG e IgM em uma variedade de espécies³⁹. Esta técnica é vantajosa, pois não necessita de anticorpos secundários específicos da espécie para ser realizada, podendo assim ser útil na identificação de novos

hospedeiros do ciclo^{39,40}. Entretanto a técnica apresenta pouca sensibilidade (66%)³⁹ sendo utilizado para *screening* associada a outro método de diagnóstico.

2.1.3.3 Reação em cadeia de polimerase(PCR)

Em 2007, a técnica de PCR viabilizou a investigação de DNA de *N. caninum* em sêmen de bovinos. A PCR é considerada uma técnica altamente específica e sensível para detecção do parasito no feto, entretanto o resultado da PCR pode ser influenciado pelo baixo número de parasitas da amostra. Um estudo demonstrou que a sorologia não foi concordante com os resultados positivos da PCR, em razão dos fetos abortados não apresentarem anticorpos detectáveis nos testes sorológicos. Isso demonstra que pode ocorrer uma variação de soroprevalência de neosporose bovina dependendo da técnica de diagnóstico utilizada⁴⁵.

2.1.3.4. Imunofluorência Indireta (IFI)

Para a realização do teste de IFI, se faz a avaliação microscópica dos anticorpos marcados pelo conjugado. Esta avaliação requer um profissional capacitado e experiente em interpretar visualmente as reações e os resultados, já a interpretação pode ser afetada pela fadiga do leitor, por exemplo^{36,42}. O ensaio detecta os anticorpos específicos para os antígenos presentes na superfície da célula do parasita. Além disso, o teste apresenta pouca reatividade cruzada com outros parasitas coccídios, sendo o mesmo considerado um teste de referência quando comparado a outros ensaios⁴³. Em relação às elevadas especificidade e sensibilidade dessa técnica, alcançando 93% de sensibilidade e 96% de especificidade, é considerada a prova de referência para realizar a sorologia fetal, indicando se este possui anticorpos específicos anti-*Neopora caninum*. O resultado positivo do teste sugere a infecção do feto, pois esse não possui capacidade de produzir resposta ao desafio antes dos cinco meses de idade gestacional e não ocorre transferência transplacentária de anticorpos.

2.1.3.5. Detecção de *N.caninum* por diferentes técnicas

A sorologia fetal indicou ser uma boa ferramenta de diagnóstico para detectar indiretamente a presença do parasita. Em um estudo realizado na Espanha em fetos

bovinos abortados, determinou-se que 38,8% desses foram positivos em pelo menos uma das técnicas utilizadas⁴⁵. A maior porcentagem de fetos foi diagnosticada por histopatologia e imunohistoquímica. A observação mais comum é a encefalite multifocal não supurativa e a miocardite⁴⁶. O diagnóstico de confirmação da presença do *N. caninum* baseia-se na coloração imuno-histoquímica de secções de tecido usando anticorpos específicos para o parasita e demonstrando DNA específico de *N. caninum* por PCR¹⁷. Quando um feto submetido sofre autólise e as lesões não podem ser examinadas, recomenda-se a realização da PCR¹⁷.

De acordo com o estudo de Pereira-Bueno et al.⁴⁵ a maioria dos ensaios apresentou bom desempenho sendo úteis na detecção do agente ou de anticorpos contra o mesmo. Entretanto, os autores recomendam o uso de mais de uma técnica, a fim de evidenciar se o animal foi ou não exposto ao agente, além de obter uma maior sensibilidade de um diagnóstico de aborto associado a *N. caninum*^{17,47}. Destaca-se, que a presença de *N. caninum* em um feto abortado não é necessariamente uma indicação da causa do aborto. Conjuntamente aos exames realizados, para estabelecer o diagnóstico, os dados epidemiológicos do rebanho também precisam ser considerados¹⁷.

2.1.4. Desafios associados ao diagnóstico da neosporose em bovinos

Apesar de haver testes laboratoriais de boa sensibilidade para detecção de patógenos causadores de aborto, apenas 30% das causas são diagnosticadas⁹. Para obter um diagnóstico definitivo, é essencial a colheita adequada de amostras biológicas, juntamente com um histórico clínico detalhado do rebanho³³. Esta constatação é fundamental para elaborar e implantar estratégias de controle sanitário no rebanho. Em razão de inúmeros fatores como a solicitação tardia de assistência técnica, indisponibilidade de informações para compor o histórico clínico, tais como idade fetal, a ocorrência e frequência de abortos na propriedade, o diagnóstico é muitas vezes dificultado. Além disso, é frequente o envio inadequado de amostras de tecido necessárias e informações complementares ao histórico dos casos de abortos^{9,34}.

Os casos de abortos em rebanhos são, em sua maioria, subdiagnosticados e os que ocorrem antes de 3 meses de gestação raramente são atribuídos a *N. caninum*. Essa perda precoce pode não ser percebida pelo proprietário que não busca a causa do aborto e, portanto, não envia o material para análise laboratorial⁴⁸. Desse modo, os efeitos da

presença do *N. caninum* em bovinos durante o primeiro trimestre da gestação ainda não são claramente compreendidos⁴⁹.

A ocorrência de surtos de abortos na propriedade rapidamente observada pelo produtor, geralmente está associada a infecção pela via horizontal, caracterizada pela presença de canídeos, os quais têm áreas comuns com os bovinos¹⁶. Quando o aborto ocorre de forma endêmica, distribuindo-se ao longo do ano o proprietário aceita essa perda considerando-a normal, não percebendo sua representatividade no lucro da atividade. Outra dificuldade encontrada ocorre na colheita e armazenamento de material biológico, os quais se realizados de maneira inadequada podem impossibilitar a visualização das lesões caso a amostra sofra autólise⁹. Estabelecer a relação de causa e efeito entre o aborto bovino e a presença do *N. caninum* é complexo devido à infecção não apresentar sinais clínicos característicos. Destaca-se ainda que detectar o agente no rebanho não significa necessariamente que este seja o causador do aborto, sendo em sua maioria o diagnóstico feito por exclusão de outras doenças^{9,33}.

Em um estudo realizado pelo Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS), 490 fetos bovinos foram analisados. Do total de amostras, apenas 46,32% tiveram diagnóstico estabelecido (Figura 3) e dentre estas 87,66% tiveram causa infecciosa, em sua maioria de origem de protozoários, destacando-se o *N. caninum*⁹.

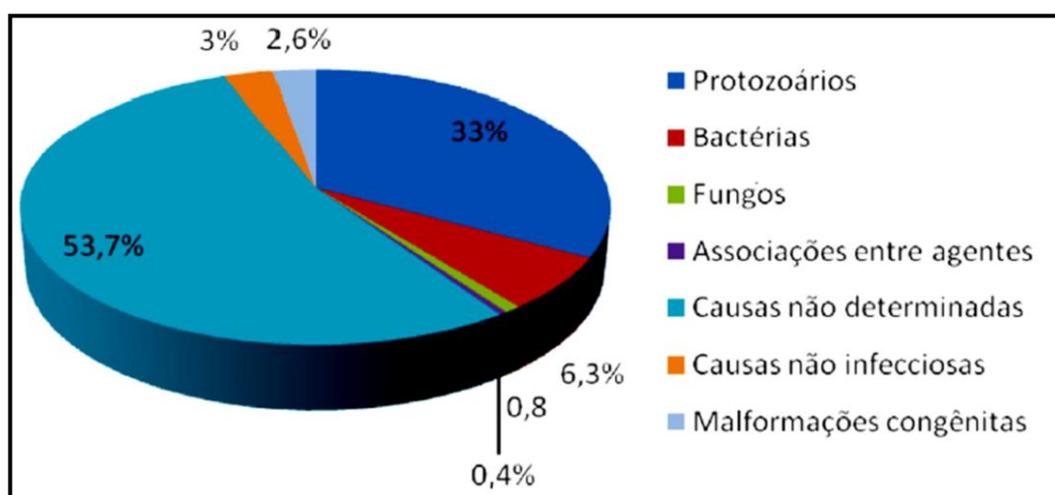


FIGURA 3- Frequência de causas não determinadas, não infecciosas, infecções por protozoários, bactérias, fungos e associações entre agentes diagnosticados em fetos bovinos abortados no período de 2003-2011. Fonte: Antoniassi et al.⁹

Determinou-se que a maioria dos casos ocorreu no segundo trimestre de gestação e em raças voltadas a atividade leiteira. As amostras avaliadas eram provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul, Goiás, Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais, Mato Grosso, São Paulo, Alagoas, Mato Grosso do Sul e Rio de Janeiro.

3. JUSTIFICATIVA

A condução do estudo no Sítio Patrimônio Histórico e Cultural Kalunga baseou-se na condição de escassez de dados sanitários locais, juntamente com a representatividade econômica da bovinocultura para a população. Parte do rebanho regional é composto por raças brasileiras, como a de bovino Curraleiro, conhecida por sua rusticidade, resistência a doenças, boa adaptação ao calor e à seca, além de sua baixa exigência nutricional. Há poucos registros de neosporose clínica, já que a principal manifestação clínica aparente é o aborto, sendo este comum a outras doenças como leptospirose e brucelose. A referida escassez de dados sanitários relativos aos rebanhos da região, justificou a realização do estudo, fazendo-se necessária a condução de testes de diagnóstico com o objetivo de identificar a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos do Sítio Patrimônio Histórico e Cultural Kalunga, bem como a determinação dos principais fatores de risco associados.

Dentre os diversos fatores que contribuem para a probabilidade da infecção ocorrer no rebanho bovino, já foram apontados em outros estudos a presença de cães, o fornecimento de silagem, o tamanho da propriedade e o escore do animal. No entanto, tais elementos podem variar de acordo com as particularidades de cada região e exploração. Ressalta-se ainda, que as condições de umidade e temperatura também devem ser consideradas, já que influenciam na sobrevivência do protozoário *N. caninum*, favorecendo a contaminação ambiental.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Realizar estudo soroepidemiológico da exposição ao *N.caninum* em bovídeos do Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga.

4.2. Objetivos específicos

- Detectar anticorpos anti- *N. caninum* por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA) de bovídeos do Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga.
- Identificar os fatores de risco associados à infecção.
- Propor medidas de controle para a exposição ao *N.caninum*.

CAPÍTULO 2- FATORES DE RISCO PARA A OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum* EM BOVINOS DO SÍTIO HISTÓRICO E PATRIMÔNIO CULTURAL KALUNGA

1.INTRODUÇÃO

A neosporose é uma enfermidade causada pelo protozoário *N. caninum*, que primeiramente foi detectado em cães¹¹, que foram reconhecidos como hospedeiros definitivos, sendo infectados ao se alimentarem com tecidos (restos placentários ou carcaça infectados) com bradizoítos. Atualmente, se considera que os canídeos contribuem com a via horizontal, por eliminar oocistos através das fezes mesmo que em pouca quantidade⁵⁰. Estes oocistos contaminam pastagens e fontes de água, que são ingeridos por hospedeiros intermediários, os quais são infectados pelo parasito, completando a via horizontal. Já a transmissão vertical pode ocorrer quando a fêmea ingere oocistos esporulados no ambiente. Estes contêm bradizoítos em seu interior e transformam-se em taquizoítos replicando-se rapidamente e se proliferam em diversos órgãos do hospedeiro intermediário¹⁷.

Essa fase aguda terminará quando o hospedeiro desenvolver uma resposta imune protetora, causando a transformação de taquizoítos em bradizoítos, os quais se multiplicam de forma mais lenta, alojando-se nos tecidos do animal na forma de cisto, a fim de estabelecer a fase persistente da infecção. Esta recrudescência do cisto pode ser acionada por alterações dos níveis de anticorpos durante o período gestacional, o que pode ocasionar a infecção da prole(via vertical)^{51,52}. Isto pode promover impactos produtivos e reprodutivos tais como o aborto, nascimento de bezerros mais fracos, o que ocasiona perdas econômicas significativas na bovinocultura ^{7,17}.

A pecuária bovina é a principal fonte de sustento e de renda de muitas famílias quilombolas do Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kaluga(SHPCK). A maioria dos produtores exerce esta função há mais de 20 anos e acredita que seus descendentes darão continuidade à criação de bovinos. Dessa forma, evidencia-se a importância da preservação da bovinocultura para esta comunidade, pois esta atividade tem relevância econômica, mas também cultural. Assim faz-se adequada a condução de estudos que enfoquem doenças que afetam a esfera reprodutiva, visando reduzir perdas econômicas. Assim faz-se necessário dimensionar a soroprevalência de *N.caninum* em animais no

SHPCK, identificando os principais fatores de risco relacionados e propor medidas de controle.

2.MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa (CEP/UFG) e registrado com o número 009359/2014 e na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFG) com o protocolo 008/14

2.1. Área geográfica do estudo e amostragem dos animais

O estudo foi realizado no Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga (SHPCK), território que abrange os municípios de Cavalcante, Monte Alegre e Teresina de Goiás, no Estado de Goiás (Figura 4). Nesta área existem quatro núcleos: Vão do Kalunga, Vão de Almas, Vão do Moleque e Ribeirão dos negros(ou Ribeirão dos bois).De acordo com AGRODEFESA no SHPCK o rebanho bovino é de 13.740 cabeças, distribuídas em 433 propriedades.

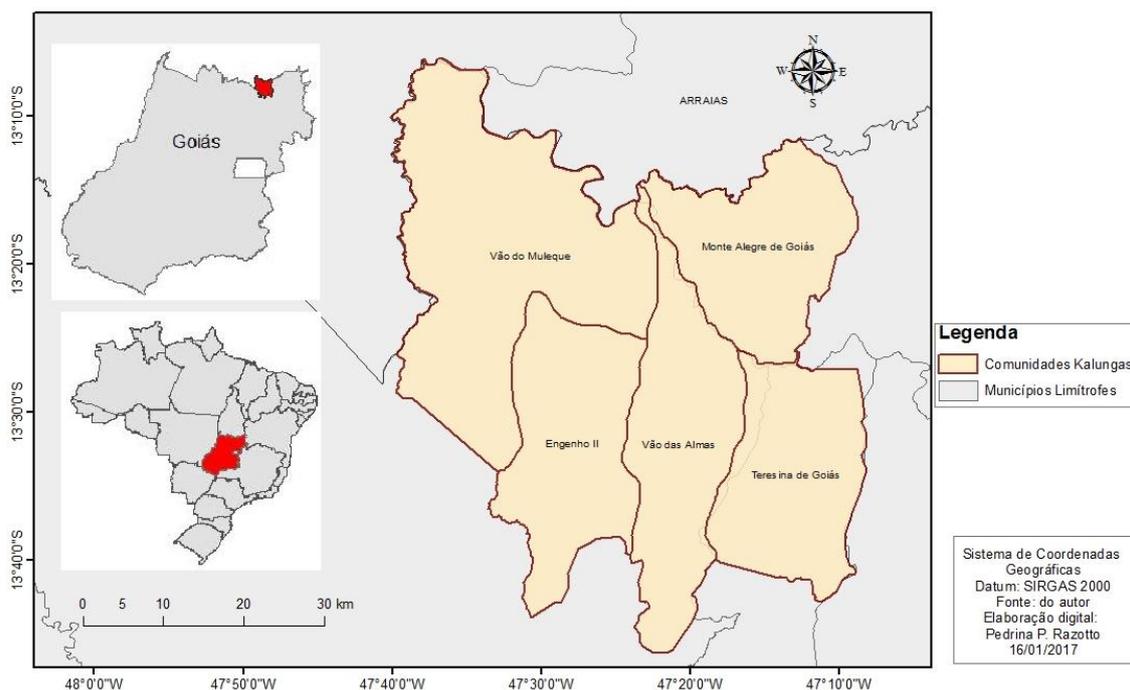


FIGURA 4-Representação cartográfica do Sítio e Patrimônio Cultural Kalunga localizado na microrregião da Chapada dos Veadeiros, Goiás.

Compuseram o estudo 4.857 bovídeos sendo 647 machos e 4.210 fêmeas de diferentes idades. O quantitativo de bovinos foi de 4.810 das seguintes raças: 1.368 mestiços, 151 de raça local brasileira (Curraleiro Pé-Duro e Caracu), 3.291 zebuínos

(predominantemente Nelore), e de 47 búfalos todos da raça Murrah. Considerando que em Goiás a prevalência da infecção por *N. caninum* foi registrada em 29,61% para bovinos de corte⁵³, aplicou-se a fórmula para estimativa da prevalência em amostras aleatórias simples, para determinação da amostragem mínima a ser avaliada.

Desse modo, o tamanho mínimo da amostra para um estudo epidemiológico de prevalência de anticorpos anti- *N. caninum* foi de 321, no entanto foram colhidas e processadas 4.857 amostras.

Utilizou-se o método de amostragem não probabilística por conveniência para a composição do número de animais amostrados, adotando-se como principais critérios de seleção a anuência do proprietário, a possibilidade de acesso à propriedade e a inclusão de todas as áreas do SHPCK com população Kalunga.

2.2. Metodologia

Nos anos de 2014 a 2016 foram realizadas 15 viagens para as diferentes áreas do SHPCK, em que houve a prévia divulgação e esclarecimento do estudo com o objetivo de promover a adesão voluntária dos proprietários. Dessa forma, foi possível determinar os locais e o número de animais existentes na propriedade. As coordenadas (latitude, longitude e altitude geometria) das propriedades incluídas no estudo foram estabelecidas pelo sistema de posicionamento global - GPS (Garmin MIN Oregon® 450).

As equipes foram compostas por pós-doutorandos, pós-graduandos, graduandos, bolsistas do CNPq e dois motoristas da UFG. As viagens para as avaliações dos rebanhos e bovinos e para a colheita de sangue tiveram duração média de 12 dias cada. Os animais foram mantidos em seu ambiente natural sem interferência no manejo, alimentação ou ingestão de água. A equipe de pesquisadores deslocou-se aos locais para colheita de amostras biológicas e aplicação dos questionários propostos neste estudo.

A contenção dos animais foi realizada por meio do auxílio de dois laçadores treinados, garantindo a segurança dos participantes envolvidos e do animal. O sangue total foi colhido por punção da veia jugular (Figura 5A) ou caudal, empregando agulhas descartáveis e tubos tipo *vacutainer*, sem anticoagulante para obtenção de soro sanguíneo, sendo dois tubos para cada animal. Paralelamente à obtenção das amostras biológicas, aplicou-se um questionário estruturado composto por 33 questões, elaborado com base em THRUSFIELD (2004), aos proprietários dos animais das comunidades visitadas para obtenção de variáveis zoonosológicas, socioeconômicas e informações complementares,

tais como o tipo de pastagens e finalidade da atividade nas propriedades amostradas (Figura 5B; Anexo B). Ressalta-se que os proprietários foram incluídos após consulta, anuência e assinatura do termo de compromisso livre e esclarecido (Anexo C).



FIGURA 5- (A) Bovino devidamente contido com o auxílio de dois laçadores da comunidade Kalunga, para a realização da coleta de sangue por punção da veia jugular utilizando tubo *vacutainer* sem anticoagulante pela médica veterinária. (B) Aplicação do questionário ao proprietário, para obtenção de informações zoonosológicas e socioeconômicas.

As variáveis edafoclimáticas dos municípios de Monte Alegre de Goiás (GO), Teresina de Goiás (GO) e Cavalcante (GO) foram concedidas pelo Laboratório de Processamento de Imagens e Geoprocessamento da Universidade Federal de Goiás (LAPIG), o qual contribuiu com informações referentes aos valores médios do índice de vegetação da diferença normalizada (NDVI) e os dados de precipitação e solo. No endereço eletrônico do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) foi possível obter-se dados a respeito da amplitude térmica, umidade e temperatura dos anos de 2014 a 2016. Coletaram-se os valores de altitude de cada ponto registrado no GPS e o valor médio para os municípios analisados através da base de imagens do satélite Shuttle Radar Topographic Mission (SRTM)(125-128).

As amostras de soro foram alíquotadas, congeladas e armazenadas a -20°C no Setor de Patologia da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. Foi utilizada uma alíquota para a detecção de anticorpos anti- *N. caninum*, e empregou-se o teste de ELISA (Idexx Neospora X2® Idexx Laboratories) seguindo as recomendações do fabricante na realização do ensaio imunoenzimático (ELISA). Este

ensaio foi conduzido no Laboratório Multiusuário da Patologia Clínica do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFG (Figura 6).

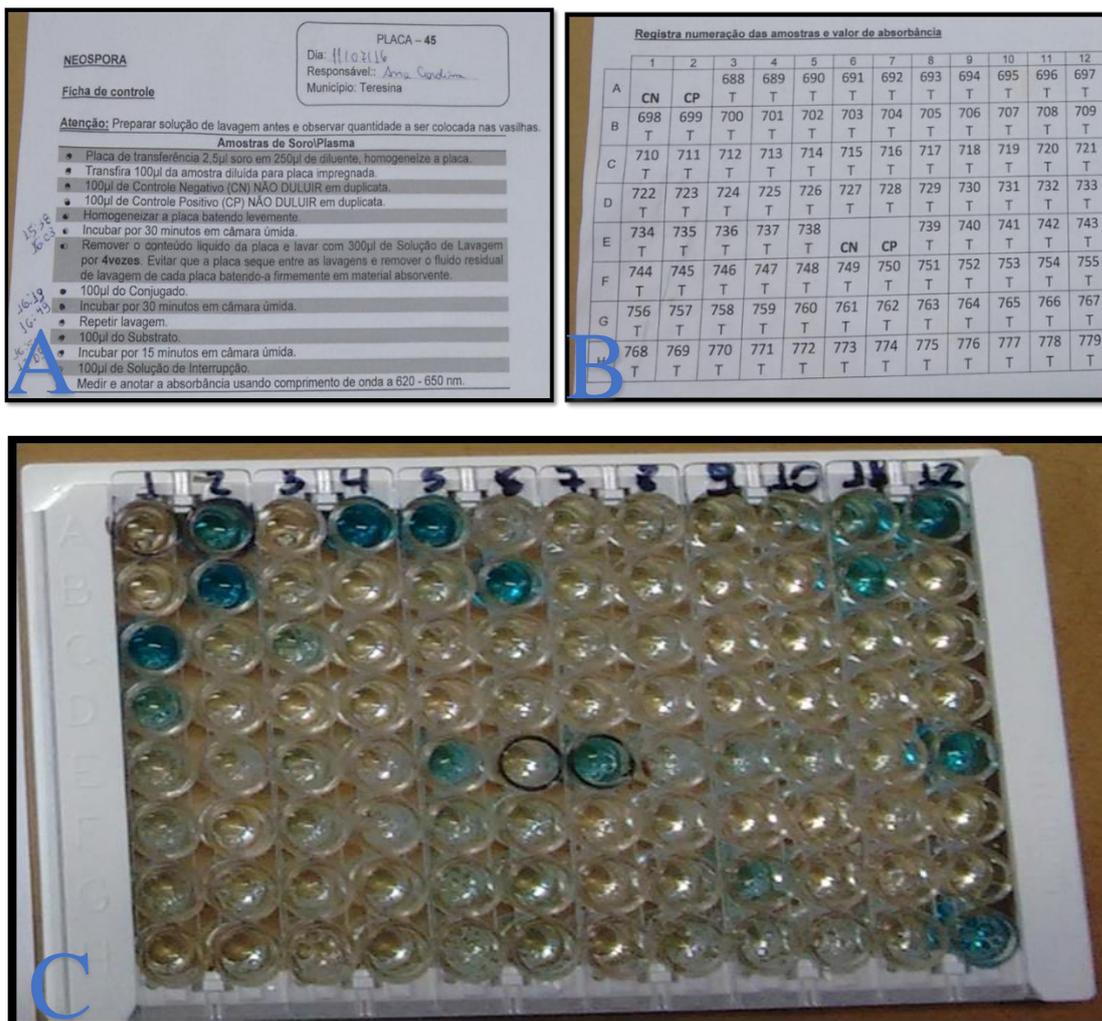


FIGURA 6- (A)Ficha de controle contendo informações referentes ao procedimento do teste de ELISA. (B) Identificação das amostras, contendo a numeração dos animais e sua respectiva região. (C) Abaixo encontra-se a placa referente à ficha controle. Esta foi impregnada de antígeno, com 96 cavidades e utilizada para detecção de anticorpos anti-*N.caninum* de soro bovino. Após a execução de todas as etapas as amostras positivas formaram imunocomplexos, os quais foram evidenciados por sua coloração subsequente.

Após a execução do teste de ELISA, obteve-se o resultado da reação por meio da leitura da densidade óptica em leitora *Thermo Labsystems Multiskan*, com um filtro de 650 nm de absorbância. Realizaram-se leituras dos controles positivo e negativo em duplicata e foi feita uma média entre os resultados como critério de validação do teste das amostras, sendo considerados negativos os resultados $< 0,5$ e dos positivos $\geq 0,5$.

O reagente comercial utiliza o conjugado anti-bovino IgG: HRPO conservado em Proclin(preservativo sigma-(MIT) 2-methy-4-Isothiazolin-3, (CMIT) 5-dora-2-methy- Isothiazolin-3) e peróxido de hidrogênio como substrato enzimático, associado a um cromógeno (3,3', 5,5' tetrametilbenzidina – TMB), que resulta em cor amarela nas amostras positivas e que, após a adição da solução de interrupção, se torna azul para detecção de anticorpos *Anti- N. caninum* pela realização do teste de ELISA (*Neospora* ELISA kit TM, IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, EUA).

2.3. Análise estatística

Os resultados da sorologia foram organizados sistematicamente por município, território/núcleo, propriedades e resultado das análises, soropositivo ou soronegativo. Para o estudo dos fatores de risco, aplicou-se um questionário investigativo padronizado (ANEXO A), constituído por perguntas objetivas ao produtor, referentes às características gerais do manejo produtivo, reprodutivo e sanitário. Na análise univariada foi testada a associação entre a frequência da soropositividade nos rebanhos e as respostas às variáveis obtidas pelo questionário, por método de qui-quadrado de Pearson.

As variáveis que apresentaram $p < 0,05$ foram selecionadas e utilizadas na análise de regressão logística múltipla variada, aplicada ao conjunto de variáveis independentes para determinar os efeitos ambientais envolvidos na ocorrência das infecções. Em sequência, foram calculados a *odds ratio* (OD) e intervalos de confiança de 95% (IC), considerando-se $p < 0,05$. A partir destas, foram confeccionados mapas no QGIS (versão 2.12.2-Lyon) para identificar as áreas com maior prevalência e sua distribuição na região. Para a realização das análises, univariadas e multivariadas, utilizou-se o *software* R versão 3.1.3 e os mapas georreferenciados foram feitos em parceria com o Instituto de Estudos Sócio-Ambientais LAPIG da Universidade Federal de Goiás, por meio do programa Google TM Earth.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Detectou-se prevalência de anticorpos anti- *N. caninum*, verificando-se que 8,3% dos animais foram soropositivos e 75,2 % dos rebanhos tiveram contato com parasito (Tabela 1). A região do Vão de Almas apresentou a menor porcentagem (9,64%) de animais positivos e em Monte Alegre obteve-se maior índice (34,82%).

TABELA 1-Prevalência de anti- *Neospora caninum* em bovídeos por região do Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga

	Região	Bovídeos amostrados	Número e percentual de positivos na região	Percentual de positivos por região em relação a total de animais soropositivos	Percentagem de rebanhos positivos
Infecção por <i>N.caninum</i>	Engenho	1.231	78 - 6,3%	19,3%	70,6% (12/17)
	Vão de Almas	642	39 - 6,1%	9,6%	80% (20/25)
	Vão do Moleque	922	65 - 7,1%	16,1%	66,7% (20/30)
	Teresina de Goiás	878	82 - 9,3%	20,2%	81,8% (27/33)
	Monte Alegre	1.184	141 - 11,9%	34,8%	75% (27/36)
	Total	4.857	405 - 8,3%	100%	75,2% (106/141)

Verificou-se que a prevalência na região avaliada, foi menor do que a observada para o Estado, como demonstrado no estudos de Melo et al.⁵⁴(30,43%-leite,29,6%-corte) Santin(38,24%)⁵⁵ e Freitas (35,07%)⁵¹. De acordo com Freitas⁵¹, a alta prevalência de anticorpos anti- *N. caninum* em animais sororreagentes pode ser devida ao fato destes se apresentarem propensos a outras enfermidades, ficando, portanto, mais susceptíveis com isso à infecção pelo parasito em questão. Tal condição de circulação de outros patógenos nos rebanhos locais já foi demonstrada por Guimarães⁵⁶, Dias⁵⁷ e Peixoto⁵⁸, para leptospirose (44,69%), BVD (29,29%) e IBR (48,7%), e leucose (29,29%), respectivamente. A possibilidade de animais infectados com BVD estarem mais propensas à infecção por *N.caninum*, tem sido demonstrada em razão do vírus replicar em células de defesa (linfócitos e macrófagos) ocasionando a imunossupressão deste⁵³. Apesar da padronização do testes sorológicos para investigar a infecção por *N.caninum*, deve-se considerar a possibilidade de reatividade cruzada com outros coccídios como pode ocorrer nos teste de ELISA com *T. gondii* e *Hammondi heydorni*⁵⁹, que ainda não foram sistematicamente avaliados na região.

Confrontando-se o presente estudo com outros resultados de detecção de anticorpos anti-*N.caninum* realizados no Paraná (87,5)⁶⁰e em Minas Gerais⁶¹ (39,4%) notou-se que a prevalência de anticorpos anti- *N. caninum* obtida no SHPKC foi inferior aos demais estudos, entretanto apresentou-se superior a valores obtidos em Santa Catarina (7,7%)⁶² Considerando as cinco regiões e suas respectivas prevalência de anticorpos anti- *N. caninum*, elaborou-se um mapa mostrando a distribuição dos bovinos soropositivos nos rebanhos do SHPCK(Figura 7).

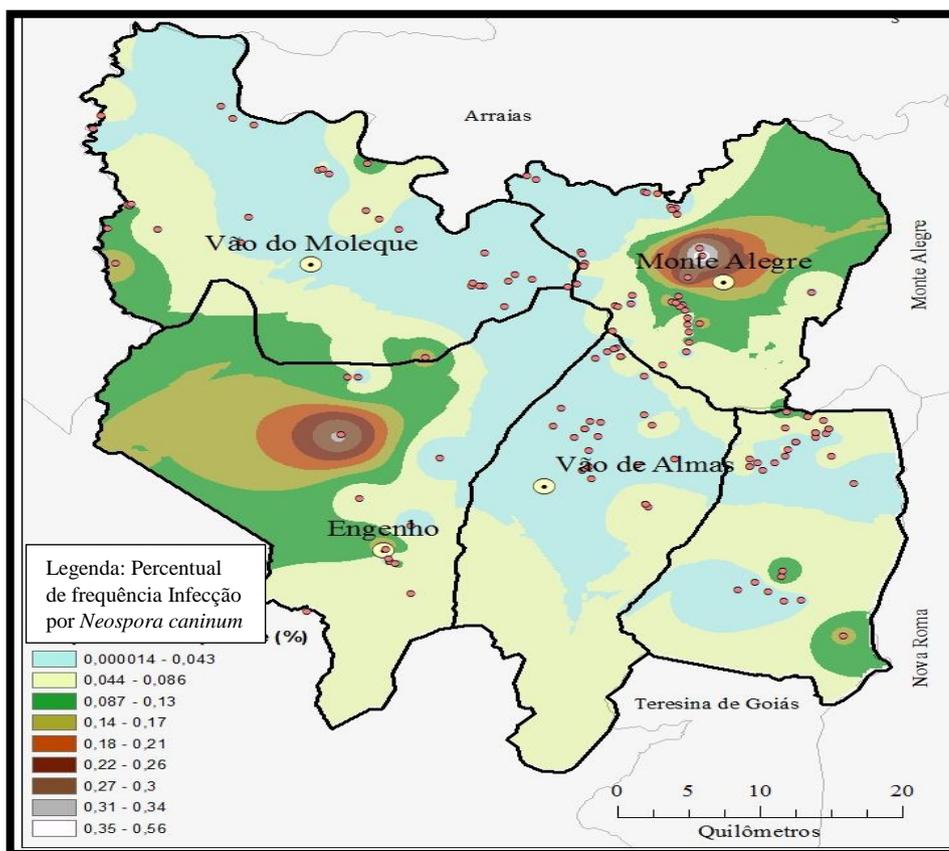


FIGURA 7-Prevalência de anticorpos anti- *Neospora caninum* em rebanhos do Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga, no período de 2014 a 2016

As 141 propriedades incluídas foram caracterizadas como pequenas propriedades, com aproximadamente 50 hectares, exceto na região do Engenho II, onde não existe divisão entre as mesmas e as terras são utilizadas coletivamente. Entrevistaram-se todos os proprietários, cujos animais foram incluídos no estudo, tendo sido obtidas informações relativas a aspectos epidemiológicos, as quais estão dispostas na Tabela 2.

TABELA 2-Análise das variáveis obtidas por meio de questionário epidemiológico aplicado aos proprietários do Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga, de 2014 a 2016

VARIÁVEIS AVALIADAS			Total
	Sim	Não	
Criação de mais de uma raça de bovino	86,5% (122)	12,1% (17)	141
contato com outras espécies:			
equídeos	91,2% (125)	7,3% (10)	137
suínos	15,1% (21)	83,5% (116)	139
felinos	30,9% (41)	68,2% (92)	135
canídeos (silvestres e domésticos)	81,4% (114)	17,2% (24)	140
aves	84,3% (118)	14,3% (20)	140
bubalinos	5,7% (8)	92,9% (130)	140
marsupiais	77,9% (109)	20,7% (29)	140
cervídeos	91,4% (128)	7,1% (10)	140
procionídeos	79,1% (110)	19,4% (27)	139
roedores	76,4% (107)	22,1% (31)	140
artiodáctilo	54,3% (76)	44,3% (62)	140
Vermifugação	68,1% (96)	30,5% (43)	141
Vacinação contra:			
aftosa	97,2% (137)	1,4% (2)	141
brucelose	67,4% (95)	31,2% (44)	141
raiva	97,2% (137)	1,4% (2)	141
clostridioses	39,7% (56)	58,9% (83)	141
leptospirose	7,1% (10)	91,4% (128)	140
botulismo	38,3% (54)	60,3% (85)	141
pneumoenterite	7,8% (11)	90,8% (128)	141
IBR	0% (0)	98,4% (120)	122
BVD	0% (0)	98,54% (135)	137
Tipo de pastagem:			
somente nativa	13,5%		141
nativa e formada	82,9%		141
formada	4,6%		141
Fornecimento de suplementação alimentar	68,1% (96)	30,5% (43)	141
Fornecimento de sal mineral	97,2% (137)	1,4% (2)	141
Presença de áreas alagadiças	52,5% (74)	46,1% (65)	141
Observação de aborto em bovinos	33,3% (47)	65,3% (92)	141
Outros problemas reprodutivos	45,7% (64)	53,6% (75)	140

Em 70,7% (99/141) das propriedades analisadas, exercia-se a exploração bovina com finalidade mista (consumo de leite e carne e venda do excedente). O tipo de exploração a que o animal está submetido deve ser considerado, pois animais destinados à atividade leiteira apresentam altas taxas de transmissão horizontal^{9,63,64}. Em uma visão geral dos dados de soroprevalência em 10 países sugeriu-se que o nível de soropositividade é 50% mais elevado em rebanhos leiteiros do que em bovinos de corte^{7,65,66}. Tal condição pode ter influenciado nos resultados obtidos neste estudo, em razão dos animais do SHPCK, em sua maioria, serem destinados à bovinocultura de corte.

Para 34,7%(49/141) dos proprietários, os bovinos representavam a principal fonte de renda e em 86,5%(122/141) das propriedades era criada mais de uma raça de bovinos. O comércio de animais ocorria dentro e fora da região, seja entre os vizinhos ou trazidos de outras regiões por boiadeiros, o que pode possibilitar a inclusão de animais portadores no rebanho e mesmo a manutenção ou dispersão do parasito na região, uma vez que normalmente não eram submetidos à exames prévios ou quarentena. Dessa maneira, recomenda-se realizar a sorologia de todos os animais, acima de seis meses de idade, com o intuito de reduzir a entrada de bovinos portadores e conseqüentemente problemas sanitários e perdas econômicas. Conjuntamente a esta medida, seriam adequadas a análise histopatológica e imuno-histoquímica dos fetos abortados, identificando possíveis lesões^{9,17}. Entretanto, devido às condições estruturais (Figura 8) e acessibilidade das fazendas e financeiras dos proprietários a realização desses testes raramente é possível.



FIGURA 8-Curral em uma propriedade do Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga.

Os valores de altimetria obtidos por meio de GPS entre as propriedades visitadas variaram de 334 a 1.154 metros de elevação, o que conferiu a percepção de terreno ondulado no SHPCK. Os locais mais baixos situam-se nos Vãos de Almas e do Moleque e os mais altos no Engenho. Segundo Coelho⁶⁷ e Ribeiro⁶⁸ as diferentes altitudes influenciam na temperatura e na precipitação, que chega a 1.300 mm nas áreas de baixa altitude do SHPCK, e estas duas características exercem, como destacado por Dubey et al.¹⁶, influência na sobrevivência do oocisto, o que pode favorecer o nível de contaminação nos rebanhos locais.

Registrou-se que 52,4% dos animais tinham acesso à área alagadiça. Esta condição reveste-se de importância e já foi destacada em estudos anteriores, como o realizado no México, no qual verificou-se a presença de oocistos viáveis de *N. caninum* nos tanques de água que eram oferecidos aos animais. Isso reforça a necessidade de atentar-se às práticas de alimentação e fontes de água disponíveis para os animais, que podem representar um fator de risco, contribuindo com a manutenção da via horizontal. Em relação a esta característica, verificou-se que para a maior parte das propriedades havia cursos de água, que eram usadas tanto pelos animais (domésticos ou selvagens) como pelas pessoas. Foi possível observar a presença de animais silvestres na região deste estudo, apesar de não haver uma discriminação das espécies no questionário aplicado.

Uma questão que deve ser observada em relação a via horizontal é a existência de fômites presentes em todas as propriedades. Em uma pesquisa realizada em Minas Gerais, verificou-se uma possível associação entre a falta de conhecimento sobre medidas sanitárias e o número de bovinos portadores de *N. caninum*. Observou-se nas propriedades analisadas a utilização de pás, tanto para distribuir alimentos aos animais quanto para coletar as fezes dos cães⁵, o que representa um potencial risco de infecção aos bovinos e a manutenção da via horizontal.

No presente estudo não houve associação entre a presença de canídeos na propriedade e o número de bovídeos sororreagentes. No entanto, em diversas pesquisas apontam o cuidado em relação a presença de fetos abortados ou restos placentários na propriedade e acesso de canídeos a estes tecidos, o que pode levar a infecção destes animais e continuidade do ciclo biológico do parasito. Isso pode favorecer a disseminação da forma resistente (oocistos) na pastagem, levando ao aumento da soropositividade em bovinos com a presença de cães em fazendas, sendo estes considerados um fator de risco a infecção²⁷. Verificou-se que em 81,4% (114/141) das propriedades havia a presença de

canídeos (domésticos e selvagens), os quais tinham acesso as áreas comuns aos bovinos, o que pode facilitar o desenvolvimento de um ciclo de vida completo do parasita e sua persistência nos rebanhos²⁴. Vale considerar que a presença de canídeos silvestres, pode contribuir com a manutenção da via horizontal. Destaca-se também que a eliminação de oocisto ocorre em canídeos jovens e que os animais mais velhos dificilmente eliminam oocistos no ambiente.

Nesse contexto, apesar de não ter havido associação significativa, devido à possibilidade de contato direto de canídeos portadores com o rebanho, é necessário adotar ações preventivas em relação ao fornecimento de insumos e água destinadas aos bovinos, a fim de evitar a contaminação destes com oocistos, como citado por Dubey et al.⁹. Medidas como o manejo correto de carcaças ou restos placentários (enterrar ou incinerar), podem dificultar o acesso de hospedeiros definitivos às fontes de infecção.²⁸ porém, tais cuidados não eram rotineiramente adotados pelos criadores locais, pelas próprias condições da exploração.

Em 100% das propriedades estudadas, a reprodução ocorria por meio de monta natural e a ocorrência de aborto foi observada em 33,3%(47/141) das fazendas. Estudos demonstraram que o aborto pode ser influenciado pela amostra do parasito, em que observou-se o impacto causado entre as diferentes amostras do *N.caninum*. Pesquisas indicaram que a Nc Spain 7 ocasionou 100% de abortos, sendo esta a amostra mais agressiva²⁵. Em outro estudo, demonstrou-se que o isolamento em cultura celular alterou algumas características do parasito, entre elas, sua patogenicidade¹⁶. Deve-se considerar o potencial aumento desta patogenicidade em condições naturais, o que ampliaria a ocorrência de distúrbios reprodutivos. Além da ocorrência de abortos, registrou-se que 45,7%(64/141) dos produtores declararam ter outros problemas reprodutivos no rebanho, como retenção de placenta e natimortos.

Em relação à alimentação para os bovinos, 68,1% dos produtores declararam fornecer cana e mandioca como suplementação. Considerando o uso de sal mineral, 97,2% dos produtores informaram fornecer sal branco e/ou sal mineralizado para o rebanho. Em 4,6% das 141 propriedades o tipo de pastagem era formado, somente 13,5% tinham pasto nativo e em 82,9% a pastagem era mista. O sistema produtivo adotado na criação era pasto e entre as pastagens nativas e mistas, a maior parte era composta por cerrado nativo, enquanto as pastagens formadas geralmente eram capim braquiária e andropogon. Não foram encontrados na literatura informações em relação a influência do

tipo de pastagem na infecção. Neste presente estudo não foi possível determinar a proporção de área formada e nativa por propriedade. Ressalta-se também a questão do local de armazenamento dos alimentos fornecidos aos bovinos, como por exemplo silagem, que caso seja realizado de maneira inadequada pode favorecer sua contaminação ou a formação de toxinas, afetando o sistema imune do animal tornando-o propenso a infecção¹⁵. Na maior parte das propriedades a silagem era mantida a céu aberto, o que pode resultar nestas consequências.

Dos bovídeos amostrados 4.210 eram fêmeas, dentre as quais 351 (8,33%) apresentaram diagnóstico sorológico positivo. Dos 647 machos apenas 54 (8,34%) apresentaram-se soropositivos para *N.caninum* (Tabela 3). Apesar do número amostral de fêmeas ter sido expressivo, o percentual de animais positivos foi semelhante.

TABELA 3-Prevalência de anticorpos anti- *Neospora caninum* de acordo com a espécie, raça, sexo e idade nos bovídeos de acordo com o sexo, espécie e raça de bovídeos do Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga, de 2014 a 2016

	Categoria	Quantidade amostras	Animais positivos
Presença de anticorpos anti- <i>N.caninum</i>	Fêmea	4.210	351 (8,33%)
	Macho	647	54 (8,34%)
	Idade 0-24 meses	1.818	137 (7,53%)
	Idade 25-36 meses	640	54 (8,43%)
	Idade >36 meses	2.399	214 (8,92%)
	Mestiça	1.368	103 (7,52%)
	Raças locais	151	13 (8,6%)
	Zebuínas	3.291	276 (8,38%)
	Búfalos	47	13 (27,65%)

Em relação à idade dos animais amostrados, o número de bovinos soropositivos com até 24 meses foi ligeiramente inferior (7,53%) aos animais acima de 36 meses (8,92%). Provavelmente estes resultados estão relacionados à maior probabilidade que os animais mais velhos têm de estarem expostos aos oocistos ao longo de sua vida do que os animais mais jovens, como citado por Silva et al.²⁴. Resultados semelhantes foram obtidos com a espécie bubalina, indicando os búfalos com idade igual ou acima de quatro anos com maior soroprevalência⁶².

Considerando as diferentes espécies, a prevalência de anticorpos anti- *N. caninum* foi maior em búfalos, porém a quantidade de animais testados foi inferior a de bovinos. Entre as diferentes raças de bovinos avaliadas, a prevalência de anticorpos anti- *N. caninum* foi muito próxima, tendo sido detectados os seguintes valores: 7,52% para animais mestiços, 8,6% para as raças locais e 8,38% para zebuínos. Nossos resultados são concordantes com aqueles de outros estudos, na qual verificou-se que a soroprevalência pode diferir de acordo com a raça, tendo sido constatado que animais mestiços apresentaram menor soropositividade à infecção por *N.caninum* que as raças leiteiras europeias⁹.

Outra vantagem observada em relação aos mestiços foi a menor ocorrência do número de abortos, pois já foi apontado que o cruzamento de animais de raças diferentes, pode reduzir o risco de aborto. Supõe-se que nestes cruzamentos ocorra uma maior concentração de glicoproteínas associadas à gestação, o que garante o *status* fetoplacentário¹⁵. Os valores de soropositividade apresentaram-se semelhantes entre raças mestiças e locais. A diferença entre a soroprevalência poderia não estar associada a susceptibilidade da raça em relação à infecção pelo parasito, mas sim o sistema de produção ao que este estava submetido¹⁶.

Foram desenvolvidos estudos em que se analisaram situações em que o búfalo e o bovino habitam a mesma área, tendo sido apontado que os primeiros apresentaram-se 1,5 vezes aproximadamente mais propensos a serem soropositivos a infecção por *N.caninum* do que os bovinos⁶². Em propriedades que estes animais cohabitam, apesar de ambas estarem submetidos as mesmas condições, como verificados nas propriedades avaliadas, os búfalos podem apresentar sinais clínicos mais sutis, aparentando ser mais resistente às consequências reprodutivas da infecção por *N. caninum*, verificado por diferentes autores(Neverauskas et al.³⁰ , Reichel et al.⁶³ e Moore et al⁶⁴), com menores taxas de aborto e maiores taxas de parto e desmame do que os bovinos, como foi verificado pelos autores acima citados. Além de apresentarem menor chance de ocorrência de aborto, este pode passar despercebido. Isto pode ocorrer devido a espécie bubalina ser utilizada em regiões menos desenvolvidas economicamente, portanto esta falha reprodutiva não é minuciosamente examinada⁶³.

Deve-se considerar uma menor taxa de aborto em búfalos, em razão de um manejo deficiente associado ou não a seleção inadequada dos búfalos, que podem apresentar menor taxa de reprodução quando comparados à de bovinos. Acredita-se que devido ao

limitado conhecimento do produtor sobre as diferenças dos parâmetros reprodutivos entre estes animais, há uma dificuldade do proprietário em identificar problemas de caráter reprodutivo, tais como o aborto, o que pode ter ocorrido na região de estudo. Deve ser registrada que apesar da ocorrência da infecção natural do útero de búfalos, entretanto não foi esclarecida a ocorrência de transmissão transplacentária, endógena e exógena, e se esta é tão eficaz como a de bovinos⁶³. Vale ressaltar que o ambiente úmido em que o búfalo habita pode ocasionar em um contato frequente com o oocisto, o que pode ter resultado em uma resistência do animal à ocorrência de aborto.

Dentre o conjunto de variáveis analisadas encontrou-se associação positiva entre a prevalência de anticorpos anti- *N. caninum* nos rebanhos e os demais fatores entre eles: área alagadiça, vacinação contra aftosa, vacinação contra clostridioses, a presença de catitus e precipitação. Estas variáveis que apresentaram significância estatística estão registradas na Tabela 4, com os valores de *p* para análise univariada.

TABELA 4-Variáveis obtidas por meio de questionário aplicado aos proprietários rurais do Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga e variáveis edafoclimáticas obtidas por meio do banco de dados do Instituto de Estudos Sócio-Ambientais da Universidade Federal de Goiás, que apresentaram associação quando comparadas à prevalência de anticorpos anti-*Neopora caninum*, por meio da análise univariada ($p < 2$), de 2014 a 2016

Variável	Valor de p
Área alagadiça	0,0025675
Vacinação contra aftosa	0,0221693
Vacinação contra clostridioses	0,0818308
Presença de catitus	0,0014032
Precipitação	0,001177
Bio1 (temperatura média anual)	0,00128
Bio 5 (temperatura máxima nos meses mais quentes)	0,093596
Bio 6 (temperatura mínima nos meses mais frios)	0,0010701

Todas essas variáveis foram submetidas ao teste de regressão logística e os resultados estão expressos na Tabela 5.

TABELA 5- Fatores de riscos correlacionados com prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovídeos do Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga, de 2014 a 2016, considerando sim como referência

Variável	Categoria	OR (IC 95%)	P (Wald'stest)	P (LR-test)
Presença de catitus	sim x não	1,19 (0,96 - 1,47)	0,007	0,006
Vermifugação	sim x não	0,79 (0,63 - 1)	0,009	0,01
Vacina contra aftosa	sim x não	0,50 (0,21 - 1,2)	0,01	0,022
Vacina contra clostridioses	sim x não	1,26 (1,02 - 1,55)	0,092	0,092
Presença de área alagadiça	sim x não	0,67 (0,54 - 0,83)	0,003	0,003
Precipitação	1271mm-1367,2mm x 1367,3mm-2300 mm	0,45 (0,27 - 0,74)	0,003	0,001
Bio1	22,0 °C – 23,95 °C x 23,95 °C – 26,0 °C	1,36 (1,1 - 1,68)	0,001	0,001
Bio 5	30,2°C-32,24° C x 32,25° C – 34,3°C	1,38 (1,12 - 1,7)	0,012	0,0009
Bio 6	10,7°C- 14,24°C x 14,25°C – 17,8°C	1,51 (1,22 - 1,87)	<0,001	0,001

De acordo com a regressão logística, observou-se que a presença de catitus apresentou relação significativa com a ocorrência de infecção, aumentando a probabilidade em 1,19 vezes de infecção por *N. caninum*. Tal associação pode ser justificada em razão destes participarem do ciclo como hospedeiros intermediários, assim como bovinos e outras espécies selvagens, e estarem assim sujeitos ao mesmo risco de infecção por *N.caninum* ao consumirem alimentos e água contaminados^{5,16}. Eles estão dividindo o mesmo ambiente e tanto os catitus quanto os bovinos estão expostos as mesmas condições. Desse modo, esses animais portadores do *N.caninum* fazer parte da alimentação de alguns canídeos silvestres, mantendo assim a via horizontal. A condição da presença do catitu sinaliza para conservação do ambiente que em condições naturais pode favorecer a manutenção do patógeno e da contaminação ambiental.

O uso de vacinas contra febre aftosa e clostridioses também foi outro fator considerado na regressão logística, sendo o uso de vacinas contra clostridioses um fator que pode aumentar a chance de ocorrência de infecção por *N.caninum* e a imunização contra febre aftosa diminuir a chance de ocorrência da doença. Contudo, das 106

propriedades com animais positivos para infecção, apenas em 43 relatou-se a prática de vacinar os animais contra clostridioses, enquanto 97,16% dos produtores declararam vacinar contra aftosa. É possível que a prática de vacinação para ambas as doenças não tenha nenhuma implicação biológica na maior e menor chance de ocorrência de infecção por *N.caninum*, mesmo considerando OR de 0,5 (0,21-1,2) para prática de vacinação contra aftosa.

Outra relação encontrada neste estudo foi a associação entre o acesso dos animais a áreas alagadiças e a maior probabilidade do risco de infecção pelo protozoário, devido à maior exposição dos animais a patógenos que podem estar presentes na água¹⁶. Esta condição de acesso a áreas alagadiças foi observado nesta pesquisa, principalmente, para os búfalos amostrados e que viviam em áreas bastante úmidas, a fim de proporcionar seu bem estar térmico. Tal condição associada ao clima tropical da região estudada pode favorecer à sobrevivência do oocisto, entretanto já foi apontada a questão da maior resistência de bubalinos devido a exposição frequente, o que pode justificar o menor número de indivíduos sororreagentes. Evidenciou-se em uma pesquisa que organismos semelhantes ao *Toxoplasma gondii* foram encontrados mais frequentemente em animais que habitam próximos a cursos d' água , sugerindo que os estágios infecciosos estavam sendo carregados via hídrica. Da mesma forma, os oocistos de *N. caninum* podem ser levados por estas vias aquáticas até as áreas que os animais habitam³⁰, já que estes animais ficam imersos em água ou lama nos períodos mais quentes do dia⁶⁹.

Verificou-se ainda no presente estudo, que a baixa precipitação pluviométrica pode contribuir para a redução de infecção por *N.caninum* em 0,45 vezes . Em contraste, a maior precipitação tem sido relacionada ao aumento do risco de aborto no segundo período de gestação em vacas infectadas com *N. caninum*^{63,64}. A possível explicação para esta associação positiva se deve ao fator de baixa umidade afetar sua viabilidade.

Características edafoclimáticas como a temperatura também foram objeto deste estudo epidemiológico, no qual constatou-se a associação positiva entre a infecção por *N. caninum* e a temperatura média anual (Bio 1) com OR 1,36 p = 0,001 e maior precipitação(OR=0,45). Já foi apontado em outros estudos que rebanhos bovinos da Austrália, de clima tropical, apresentaram maior soroprevalência, entre 23 e 34%, sugerindo que um clima tropical associado ao ciclo silvestre, pode favorecer a infecção pelo *N. caninum* nesta região. Ressalta-se que o SHPCK apresenta clima tropical com temperatura em torno de 25°C, que pode variar assim como o índice pluviométrico, em

locais de altitude elevada^{65,66}. Dubey et al.¹⁶ verificaram que nos meses de verão a ocorrência de bovinos sororreagentes foi menor, em razão dos oocistos não sobreviverem em ambientes quentes (acima de 39°C) e secos. No caso do SHPCK, as condições de precipitação e temperatura, em torno de 25° C, podem favorecer a infecção pelo parasito, em razão da temperatura média mais elevada e da maior concentração de chuva ocorrerem no verão e na primavera⁷⁰⁻⁷⁴.

Observou-se que nos meses mais quentes houve aumento em 1,38 (Bio 5) vezes a chance de infecção. Esta associação ao agente infeccioso pode favorecer a esporulação dos oocistos no ambiente, a qual é propícia em torno de 37°C¹⁴, pois temperaturas acima deste valor podem comprometer a viabilidade do oocisto no ambiente²³. Em concordância com os resultados obtidos neste estudo, pesquisas levantaram a hipótese que nos meses de verão haveria um menor número de bovinos sororreagentes, conseqüente do período seco e quente, comprometendo a sobrevivência do oocisto, pressupondo-se então que o calor pode ser um fator de proteção ao hospedeiro intermediário.^{15,67}

Corroborando com os dados obtidos na regressão logística, estudos apontaram que o clima pode ser considerado um fator de risco. Verificou-se que há um padrão sazonal altamente significativo em relação a ocorrência de abortos causados por *N.caninum* em condições de temperaturas (em torno de 37° C) e umidade moderadas. Estas condições favorecem a esporulação e sobrevivência de oocistos coccidianos, o que pode aumentar o risco de infecção pós-natal²⁶. A temperatura corporal do animal também se constitui outro fator que pode afetar a multiplicação do *N.caninum*, que não consegue sustentar a multiplicação de taquizoítos em temperaturas acima de 39°C⁶⁷, entretanto tal parâmetro não foi avaliado.

Devido às influências distintas dos fatores de risco na infecção, das diferentes regiões e das condições de manejo a que os animais são submetidos, as estratégias de controle devem ser estabelecidas analisando-se o custo-benefício na fazenda. Devem-se considerar parâmetros como o tipo de exploração, o sistema de manejo, a prevalência no rebanho, a via de transmissão predominante e os efeitos calculados da infecção no desempenho reprodutivo e produtivo.

Considerando este conjunto de características, foram recomendadas: o sacrifício dos animais positivos, observação e exclusão de fêmeas com distúrbios reprodutivos, evitar o contato dos cães com alimentos e fontes de água, e seu acesso a áreas comuns aos bovídeos, além de incinerar restos placentários ou fetos abortos. Tais medidas foram

explicadas aos criadores em visita de retorno após obtenção e análise dos resultados, seguindo um modelo padrão (ANEXO B).

4. CONCLUSÃO

A presença de *N.caninum* está disseminada em bovídeos no Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga está distribuída na região. Constituem-se fatores de risco para a neosporose bovina: alta pluviosidade, presença de áreas alagadiças, vacinação contra aftosa, vacinação contra clostridioses e presença de catitus.

CAPÍTULO 3-CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para obter-se um diagnóstico preciso e correto é necessária a cooperação de todas as partes, incluindo o proprietário e o veterinário, em que o primeiro contribui com as informações básicas, tais como a ocorrência do aborto, o período e a frequência. Tal histórico clínico é de suma importância para o médico veterinário direcionar os testes cabíveis para o rebanho e a propriedade. Outra medida é a coleta de amostras biológicas para identificação do agente, tais como realização de exames histopatológicos de fetos abortados e prova sorológica dos animais, para detectar os animais sororreagentes e prevenir a introdução de novos bovinos com neosporose.

Posteriormente a essas ações o médico veterinário deve orientar o produtor sobre as medidas de controle adequada a cada propriedade, além de conscientizar o produtor sobre a importância dessas práticas na saúde do rebanho através de programas de controle, por exemplo. Para efetivar esse controle os ensaios sorológicos são ferramentas essenciais, os quais devem apresentar boa reprodutibilidade e resultados consistentes, sendo assim periodicamente testados seus métodos de validação.

Com o resultado obtido com esse estudo pôde constatar a importância da infecção por *N.caninum* em bovídeos, a qual nem sempre é considerada como diagnóstico diferencial com outras doenças causadoras de aborto em bovídeos, tais como brucelose, leptospirose, BVD,IBR, campilobacteriose e tricomoniase. Estas enfermidades podem favorecer o estabelecimento de outros patógenos, tais como *N.caninum*. Entretanto em razão dos impactos causados pelo *N.caninum*, a doença vem se tornando valorizada e tem sido apontada no diagnóstico de enfermidades de caráter reprodutivo. Percebeu-se assim, a necessidade de mais estudos sob o ponto de vista epidemiológico, clínico e laboratorial, com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre sua real ocorrência e impactos. Além disso, destaca-se a importância de pesquisas com o intuito de identificar hospedeiros intermediários em potencial, os quais podem apresentar risco de infecção para o hospedeiro definitivo.

Outra abordagem importante seria a condução de mais pesquisas relacionadas à identificação do parasito em diferentes fases, tais como testes sensíveis a anticorpos

contra bradizoítos. Isso possibilitaria, além da detecção do agente, a diferenciação das fases da infecção do indivíduo, ou seja, aguda ou crônica.

Além disso, mais estudos devem ser realizados para estabelecer formas de tratamentos dos animais portadores do parasito, a fim de reduzir o número de casos no plantel. De forma complementar, novas pesquisas devem ser realizadas a fim de desenvolver uma vacina capaz de induz anticorpos vacinais que impeça a transmissão de taquizoítos ao feto, evitando a ocorrência de aborto e a transmissão congênita, para assim obter o controle da enfermidade.

Tais estudos poderiam viabilizar o controle da neosporose bovina em regiões mais isoladas de centros urbanos, tais como o Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga(SHPCK). Os integrantes desta comunidade são descendentes de quilomba e sobrevivem por meio da agricultura e bovinocultura de subsistência. Os animais (galinhas, patos, cães, gatos) têm livre acesso as áreas destinadas ao cultivo de hortaliças e leguminosas podendo contaminar estes alimentos e oferecer risco a população que as consome. Em razão da disponibilidade de alimento para os bovinos da região do SHPCK, estes não possuem contato frequente com o produtor, o que pode dificultar a implantação de ações sanitárias e preventivas nesses rebanhos.

A maioria dos habitantes da região não possui renda mensal e poucos têm alguma assistência governamental, tais como Bolsa Família, Renda Cidadã, etc. Este recurso monetário disponível não é suficiente para promover uma condição sanitária adequada a maioria das famílias desta comunidade. O SHPCK não possui estradas asfaltadas, postos de saúde acessíveis, saneamento básico (água tratada e rede de esgoto) e em suma maioria, a população não parece abranger noções básicas de higiene ficando susceptíveis a infecções veiculadas por água e alimentos. A água utilizada para as atividades de cunho doméstico, consumo e agropecuário são de fontes naturais, como córregos e rios. Esse território possui poucas escolas, as quais promovem a formação do indivíduo até o ensino fundamental. Os jovens alfabetizados compõem o corpo docente da comunidade Kalunga, os quais nem sempre têm formação acadêmica para a atuação. A população com mais de 40 anos não é alfabetizada, sabendo somente escrever o próprio nome.

Diante disso, as pesquisas abrangendo aspectos epidemiológicos, laboratoriais e de controle são fundamentais para estabelecer ações sanitárias aplicáveis em cada sistema produtivo da bovinocultura.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Teixeira JC, Hespanhol AN. A trajetória da pecuária bovina brasileira. CPG. 2014;1(36):26-38.
2. Júnior HRM. Práticas sanitárias e de risco de produtores de bovinos de corte no Pantanal de Mato Grosso do Sul. [Tese]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal; 2014.
3. Almeida TJO, Araújo VV, Feitosa PJS, Silva AFA. Perfil sociocultural de produtores de leite bovino do município de São Bento do Una (PE) e suas complicações. Rev Bras Higien. San Anim. 2015; 9(1):122-135.
4. Perfil da Pecuária no Brasil Relatório Anual 2016. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC).
5. Nicolino RR, Oliveira CSF, Lopes LB, Rodrigues RO, Haddad JPA. Prevalence and risk factors associated with anti-*Neospora caninum* antibodies in dairy herds in the central region of Minas Gerais State, Brazil. Vet Parasitol. 2017;10:71–74.
6. Alfieri AA, Alfieri AF. Doenças infecciosas que impactam a reprodução de bovinos. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte. [Internet] 2017; v.41, n.1, p.133-139.
7. Reichel MP, Ayanegui-Alcérreca MA, Gondim LFP, Ellis JT. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – The billion dollar question. Int J Parasitol. 2013; (43):133–142.
8. Dubey JP, Schares G. Neosporosis in animals—The last five years. Vet.Parasitol. 2011;180(1-2):90–108.
9. Antoniassi NAB, Juffo GD, Santos AS, Pescador CA, Coberllini LG, Driemeier D. Causas de aborto bovino diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS de 2003 a 2011. Pesq.Vet.Bras. 2013; 33(2):155-160.
10. Bjerkås I, Mohn SF, Presthus J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Z Parasitenkd. 1984; 70(2):271–4.

11. Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS, Topper MJ. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. J Am Vet Med Assoc. Livestock and Poultry Sciences Institute, USDA, Beltsville; 1988; 193(10):1259–63.
12. Thilsted JP, Dubey JP. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. J Vet Diagn Invest. 1989;1(3):205–209.
13. McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DC, Jolley WR, Wills RA, McGuire A M. Rapid communication: Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int Journ Parasitol. 1998; 38:1473-1478.
14. Gondim LFP, Sartor IF, Hasegawa M, Yamane I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. Vet.Parasitol.1999;86 :71–75
15. Dubey JP. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. Korean J Parasitol. 2003; 41(1):1-16.
16. Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora ML. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. Am Soc Microbiol. 2007; 20(2): 323–367.
17. Almería S, López-Gatius F. Bovine neosporosis: Clinical and practical aspects. Researc.Vet Scien.2013; 95:303–309.
18. Gondim LFP, McAllister MM, Pitt WC, Zemlick DE. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int J Parasitol. 2004;34:159–161.
19. Dubey JP, Jenkins MC, Rajendran C, Miska K, Ferreira LR, Martins J. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. Vet Parasitol.2011; 181(2-4):382–387.
20. King JS, Slapeta J, Jenkins DJ, Al-Qassab SE, Ellis JT, Windsor PA. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int J Parasitol.2010 40(8):945–50.
21. Almería S, Serrano-Pérez B, Darwich L, Araujo RN, Lopez-Gatius F, Dubey JP, Gasbarre LC. Vet Parasitol.2014;34:146-152.
22. Almería S, Serrano-Perez B, Lopez-Gatius F. Immune response in bovine neosporosis: Protection or contribution to the pathogenesis of abortion. Microb. Pathog.2017;109:177-182.
23. Innes EA, Wright S, Bartley P, Maley S, Macaldowie C, Esteban-Redondo I, Buxton D. The host–parasite relationship in bovine neosporosis. Vet. Immun. Immunopathol.2005.108(1–2): 29-36.
24. Silva JB, Nicolino RR, Fagundes GM, Bomjardim HA, Reis ASB, Lima DHS, Oliveira CMC, Barbosa JD, Fonseca AH. Serological survey of *Neospora caninum* and *Toxoplasma*

- gondii in cattle (*Bos indicus*) and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in ten provinces of Brazil. *Compar.Immunol.Microb.Infect.Diseases*.2017;52:30-35.
25. Almería S, Serrano-Perez B, Darwich L, Domingo M, Mur-Navales R, Regidor-Cerrillo J, Cabezon O, Perez-Maillo M, Lopez-Helguera I, Fernandez-Aguilar X, Puig-Ribas M, Ortega-Mora LM, García-Ispuerto I, Dubey JP, Lopez-Gatius F. Foetal death in naive heifers inoculated with *Neospora caninum* isolate Nc-Spain7 at 110 days of pregnancy. *Experim.Parasitol*.2016;168:62-69.
 26. Oliveira VSF. Transmissão vertical e ocorrência de abortos por *Neospora Caninum* em bovinos de uma central de transferência de embriões em Goiás.[Dissertação].Goiânia.Universidade Federal de Goiás, Programa de Pós-Graduação da Escola de Veterinária e Zootecnia.2007.
 27. McAllister MM. Diagnosis and Control of Bovine Neosporosis. *Vet Clin Food Anim Prat*. 2016; 32:443-463.
 28. Calandra PM, Di Matía JM, Canoa DB, Odriozola ER, García JA, Spätha EJA, Odeóna AC, Paolicchia FA, Morrella EL, Camperoa CM, Moore DP. Neosporosis epidémica y endémica: descripción de dos eventos en bovinos para cria. *Rev. Argent. Microbiol*. 2014; 46(4):315-319.
 29. Hernandez J, Risco C, Donovan A. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. *J. Am.Vet. Med. Assoc*. 2001; 219:632–635.
 30. Neverauskas CE, Nasir A, Reichel MP. Prevalence and distribution of *Neospora caninum* in water buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle in the Northern Territory of Australia. *Parasitol.Inter*.2015;64:392–396.
 31. Romero JJ, Van Breda S, Vargas B, Dolz G, Frankena K. Effect of neosporosis on productive and reproductive performance of dairy cattle in Costa Rica. *Theriogenology*. 2005; 64:1928–1939.
 32. Häslér B, Regula G, Stärk KDC, Sager H, Gottstein B, Reist M. Simulating the impact of four control strategies on the population dynamics of *Neospora caninum* infection in Swiss dairy cattle. *Prev. Vet Med*. 2006; 77:230-253
 - Mazuz ML, Fisha L, Reznikovic D, Wolkomirskya R, Leibovitz B, Savitzkya I, Golenser J, Shkapa V. Neosporosis in naturally infected pregnant dairy cattle. *Vet Parasitol*. 2014; 205: 85–91.
 33. Borel N, Frey CF, Gottstein B, Hilbe M, Pospischil A, Franzoso FD, Waldvogel A. Laboratory diagnosis of ruminant abortion in Europe. *Vet J*.2014;200(2):218-229.
 34. Wheelhouse N, Dagleish M. Diagnosing the causes of ruminant abortion: Where are we now? *Vet J*. 2014; 201:201(3)243-244.

35. Björkman C, Lundén A, Holmdahl OJM, Barber J, Trees AJ, Uggla A. *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasite Immunol.* 1994;16: 643-648.
36. Paré J, Hietala SK, Thurmond MC. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *J Vet. Diagn. Invest.* 1995;7:352-359.
37. Aguado-Martínez A, Alvarez-García G, Fernandez-García A, Risco-Castillo V, Arnaiz-Seco I, Rebordosa-Trigueros X, Navarro-Lozano V, Ortega-Mora LM. Usefulness of rNcGRA7- and rNcSAG4-based ELISA tests for distinguishing primo-infection, recrudescence, and chronic bovine neosporosis. *Vet. Parasitol.* 2008; 157:182-195.
38. Björkman C, Holmdahl OJM, Uggla A. An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. *Vet Parasitol.* 1997;68: 251–260.
39. Romand S, Thulliez P, Dubey JP. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitol. Res.* 1998; 85:50–53.
40. Wapenaar W, Barkema HW, VanLeeuwen JA, McClure JT, O’Handley RM, Kwok OCH, Thulliez P, Dubey JP, Jenkins MC. Comparison of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. *Vet. Parasitol.* 2007; 143:166–173.
41. Björkman C, Näslund K, Stenlund S, Maley SW, Buxton D, Uggla A. An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1999; 11: 41–44.
42. Borsuk S, Andreotti R, Leite FPL, Pinto LS, Simionatto S, Hartleben CP, Goetze M, Oshiro LM, Matos MFC, Berne MEA. Development of an indirect ELISA-NcSRS2 for detection of *Neospora caninum* antibodies in cattle. *Vet. Parasitol.* 2011;177(1–2):33-38.
43. Dubey JP, Sreekumar C, Knickman E, Miska KB, Vianna MCB, Kwok OCH, Hill DE, Jenkins MC, Lindsay DS, Greence CE. Biologic, morphologic, and molecular characterization of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. *Int J Parasitol.* 2004; 34:1157-1167.
44. Alvarez-García G, García-Culebras A, Gutiérrez-Expósito D, Navarro-Lozano V, Pastor-Fernández I, Ortega-Mora LM. Serological diagnosis of bovine neosporosis: A comparative study of commercially available ELISA tests. *Vet. Parasitol.* 2013; 198(1–2): 85-95
45. Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozalo A, Pérez-Pérez V, Espi-Felgueroso A, Álvarez-García G, Collantes Fernández E, Ortega-Mora L M. Evaluation by different diagnostic techniques

- of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. *Vet. Parasitol.* 2003; 111:143-152.
46. Wouda W, Moen AR, Visser IJ, van Knapen F. Bovine foetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. *J. Vet. Diagn. Investig.* 1997; 9 (1997):180-185.
47. Sánchez GFD, Banda RVM, Sahagun RA, Ledesma MN, Morales SE. Comparison between immunohistochemistry and two PCR methods for detection of *Neospora caninum* in formalin-fixed and paraffin-embedded brain tissue of bovine fetuses. *Vet. Parasitol.* 2009; 164(2-4): 328-332.
48. López-Gatius F, Pabón M, Almería S. *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. *Theriogenol.* 2004; 62(3-4): 606-613.
49. Jensen AM, Bjorkman C, Kjeldsen AM, Wedderkopp A, Willadsen C, Ugglå A, Lind P. Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 1999; 40:151-163.
50. Basso W, Venturini L, Venturini MC, Hill DE, Kwok OCH, Shen SK, Dubey JP. First Isolation of *Neospora caninum* From the Feces of a Naturally Infected Dog. *J. Parasitol.* 2001. 87(3): 612-618.
51. Freitas TMS. Estratégias de manejo sanitário nos núcleos de conservação *in situ* de bovinos Curraleiro Pé-Duro e Pantaneiro [Dissertação]. Goiânia; Universidade Federal de Goiás, Programa de Pós Graduação da Escola de Veterinária e Zootecnia. 2014.
52. Innes EA, Wright SE, Maley S, Rae A, Schock A, Kirvar E, Bartley P, Hamilton C, Carey IM, Buxton D. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Inter. J. Parasitol.* 2001; 31(13): 1523-1534.
53. Marugan-Hernandez V. *Neospora caninum* and Bovine Neosporosis: Current Vaccine Research. *J. Compar. Pathol.* 2017; 157(2-3): 193-200.
54. Melo DPG, Silva AC, Ortega-Mora LM, Bastos SA, Boaventura CM. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos das microrregiões de Goiânia e Anápolis, Goiás, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2006; 15:105-109.
55. Santin API. Perfil sanitário de bovinos da raça Curraleiro frente a enfermidades de importância econômica [Tese]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia; 2008.

56. Guimarães LK. Geopidemiologia da Infecção por *Leptospira* spp. em bovinos do Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga [Dissertação].Goiânia:Universidade Federal de Goiás,Escola de Veterinária e Zootecnia;2017.
57. Dias JM. Fatores de risco para a infecção pelos Vírus da Diarreia Viral e Rinotraqueite Infeciosa Bovina do Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga. [Dissertação].Goiânia:Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia;2016.
58. Peixoto SV. Fatores de risco para a infecção pelo vírus da Leucose Enzoótica Bovina no Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga. [Dissertação].Goiânia:Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia;2016.
59. Gondim LFP, Mineo JR, Schares G. Importance of serological cross-reactivity among *Toxoplasma gondii*, *Hammondia* spp., *Neospora* spp.,*Sarcocystis* spp. and *Besnoitia besnoiti*. Parasitol.2017; 144: 851–868.
60. Ogawa L, Freire R L, Vidotto O, Gondim LFP, Navarro IT. Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2005; 57:312–316.
61. Santos RRD, Rocha CMB, Gonçalves TM, Guimarães AM. Quantification of vertical of transmission of *Neospora caninum* in dairy cows in Minas Gerais, Brazil. Rev. Bras. Parasitol., Jaboticabal. 2012; 21(3):294-297.
62. Bruhn FRP, Daher DO, Lopes E, Barbieri JM, da Rocha CMBM, Guimarães AM. Factors associated with seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in southeastern Brazil. Trop Anim Health Prod. 2013; 45:1093–1098.
63. Reichel MP, McAllister MM,Nasir A,Moore DP. A review of *Neospora caninum* in water buffalo (*Bubalus bubalis*). Vet.Parasitol.2015;212(3–4):75-79.
64. Moore DP, Konrada JL, Martino SS, Reichel MP, Méndez CSDB, Späthd E JL, Odeónd AC, Crudeli G, Campero CM. *Neospora caninum* serostatus is affected by age and species variables in cohabiting water buffaloes and beef cattle. Vet Parasitol. 2014; 203: 259–263.
65. López-Gatius F, Santolaria P, Almería S.*Neospora caninum* Infection does not affect the fertility of dairy cows in herds with high incidence of *Neospora* -associated Abortions.J. Vet. Med.2005;52(1):51-53.
66. Almería S, López-Gatius F, García-Ispuerto I, Nogareda C, Bech-Sàbat, G, Serrano B, Santolaria P, Yániz JL. Effects of crossbreed pregnancies on the abortion risk of *Neospora caninum*-infected dairy cows.Vet Parasitol; 2009;163(4):323-329.

67. Coelho RR. A relação entre os festejos de santos e os ciclos produtivos na comunidade quilombola Kalunga em Goiás. II Encontro de Pesquisadores sobre os Quilombolas Kalunga: Políticas Sociais e Pesquisa no Território Kalunga: Redes de Contatos e Saberes Goiânia: UFG/IESA, 2015: 307.
68. Ribeiro, HF. Análise sobre o comportamento espacial e temporal dos focos de calor no território quilombola Kalunga (GO). II Encontro de Pesquisadores sobre os Quilombolas Kalunga: Políticas Sociais e Pesquisa no Território Kalunga: Redes de Contatos e Saberes Goiânia: UFG/IESA, 2015;307.
69. Ablas DS, Titto EAL, Pereira AMF, Titto CG, Leme TMC. Comportamento de bubalinos a pasto frente a disponibilidade de sombra e água para imersão. Ciênc.Anim.Bras.2007. 8(2):167-175.
70. Rezende-Gondim MM, Silva AV, Schares G, Gondim LFP. In contrast to *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* tachyzoites did not sustain multiplication in vitro at increased incubation temperatures. Vet. Parasitol.2017;234:19-24
71. INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Available from: <http://www.inmet.gov.br>.
72. INPE. Instituto Nacional de pesquisas Espaciais. Available from: <http://www.inpe.br>
73. PNUD. Índice de desenvolvimento humano - municipal, 1991-2000. Available from: [http://www.pnud.org.br/atlas/ranking/IDH-M 91 00 Ranking decrescente \(pelos dados de 2000\).html](http://www.pnud.org.br/atlas/ranking/IDH-M_91_00_Ranking_decrescente_(pelos_dados_de_2000).html).
74. USGS. United States Geological Survey. Available from: <http://www.usgs.gov.br>.

ANEXO B- Modelo padrão das recomendações sanitárias entregues aos proprietários do Sítio Histórico Patrimônio Cultural Kalunga.



• **NEOSPOROSE**

- A neosporose é uma doença causada por um protozoário e não passa do gado para as pessoas. As fezes dos cães e de outros canídeos selvagens (raposas e lobos) contaminam os pastos. Os bovinos se contaminam quando comem esses pastos ou quando uma vaca prenhe passa o protozoário para o bezerro.
- O protozoário que causa a neosporose está presente em poucos/muitos dos seus bovinos. Mas nenhum deles apresentou sinal da doença. Mesmo não tendo nenhum bovino doente, o protozoário pode contaminar outros bovinos.
- Para evitar que mais bovinos se contaminem recomenda-se que:
 - 1) Se tiver que matar algum bovino, escolha os que deram positivos no exame.
 - 2) Fêmeas positivas devem ser observadas. Em caso de repetição frequente de cio ou perda de bezerro, eliminar do rebanho.
 - 3) Evite o contato de cães com o gado, especialmente considerando o local de beber água.
 - 4) Enterrar ou queimar restos do parto ou bezerras mortas.

Esperamos que essas informações sejam úteis para o Senhor(a) e sua Família e para terminar apresentamos todas as pessoas que foram responsáveis pela realização desse trabalho.

Goiânia, 05 de abril de 2017

ANEXO C- Termo de compromisso do produtor**TERMO DE COMPROMISSO DO PRODUTOR**

(Pessoa Física)

Eu, _____,
Produtor Rural, portador do R.G. nº _____, e CPF nº _____,
_____, proprietário/arrendatário da
Fazenda _____,
IE, nº _____, localizada no município de _____,
venho DECLARAR o COMPROMISSO de enviar para abate
em Estabelecimento sob Inspeção Sanitária Oficial, ou de promover o sacrifício na
minha propriedade do(s) animal(is) reagente(s) positivo(s) para Brucelose e ou
Tuberculose, nos exames a serem realizados pelo Médico Veterinário
_____, CRMV/GO nº _____, nos
termos da Instrução Normativa Federal nº 06, de 08 de janeiro de 2004, Capítulo
IX, art.(s) 34 a 37.

DECLARO, ainda, o COMPROMISSO de não transferir e de manter na
propriedade, os animais, depois de realizada a coleta de material para diagnóstico
de Brucelose nos termos do art. 35, *caput* do Decreto 5.652 de 06/06/2002, ou
depois de inoculada tuberculina para diagnóstico de Tuberculose.

Por fim, DECLARO estar ciente de que o não cumprimento das
exigências acima implicará em penalidades conforme disciplinado na legislação
sanitária animal em vigor.

Produtor Rural

1ª via: Produtor Rural
2ª via: Médico Veterinário Habilitado
3ª via: AGRODEFESA