



FÁBIO RAPHAEL PASCOTI BRUHN

**FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À SOROPREVALÊNCIA DE
Neospora caninum EM BOVINOS LEITEIROS NO ESTADO DE MINAS
GERAIS, BRASIL**

LAVRAS – MG

2012

FÁBIO RAPHAEL PASCOTI BRUHN

**FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À SOROPREVALÊNCIA DE
Neospora caninum EM BOVINOS LEITEIROS NO ESTADO DE MINAS
GERAIS, BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação “Stricto Sensu” em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. Dr. Antônio Marcos Guimarães

Coorientadora

Profª. Dra. Christiane Maria Barcellos Magalhães da Rocha

LAVRAS – MG

2012

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Bruhn, Fábio Raphael Pascoti.

Fatores de risco associados à soroprevalência de *Neospora caninum* em bovinos leiteiros no Estado de Minas Gerais, Brasil / Fábio Raphael Pascoti Bruhn. – Lavras : UFLA, 2012.

75 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Antônio Marcos Guimarães.

Bibliografia.

1. Vacas leiteiras. 2. Sorologia. 3. Problemas reprodutivos. 4. Regressão logística. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.0896936075

FÁBIO RAPHAEL PASCOTI BRUHN

**FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À SOROPREVALÊNCIA DE
Neospora caninum EM BOVINOS LEITEIROS NO ESTADO DE MINAS
GERAIS, BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação “Stricto Sensu” em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 29 de fevereiro de 2012

Dra. Ana Paula Peconick	UFLA
Dra. Christiane Maria Barcellos Magalhães da Rocha	UFLA
Dr. Alessandro de Sá Guimarães	Embrapa

Orientador

Prof. Dr. Antônio Marcos Guimarães

Coorientadora

Profa. Dra. Christiane Maria Barcellos Magalhães da Rocha

LAVRAS – MG

2012

*Aos meus queridos pais, Romilda e Valfrido, sempre presentes em
todos os momentos da minha vida, pelo amor incondicional*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A todos que tornaram possível a realização deste trabalho. Desde os trabalhadores rurais, pela participação e, principalmente, a confiança depositada no nosso trabalho; à CAPES, pelo auxílio financeiro e aos professores, colegas de curso, profissionais e secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras.

Aos professores Antônio Marcos Guimarães, Christiane Maria Barcellos Magalhães da Rocha e Marcos Aurélio Lopes, pelo exemplo de profissionalismo e competência, e, mais importante, pelo grande apoio e amizade desenvolvidos ao longo desses anos de trabalho.

Aos amigos Débora Oliveira Daher, Edna Lopes, Jonata Barbieri, Juliana Lucci, Fernanda Janoele e Iara Robeni, colegas do laboratório de epidemiologia da UFLA, cuja ajuda desde a coleta dos dados a análise foi imprescindível para a conclusão desta pesquisa.

A todos os outros amigos: Allan, Andréia, Caio, Charles, Davi, Guilherme, Leonardo, Priscila, Ronaldo e Tiago, entre outros não citados, alguns distantes mais igualmente importantes, pela grande amizade e companheirismo ao longo destes anos.

Finalmente e mais importante, aos meus pais, Romilda e Valfrido, irmão Fernando e a Fernanda, sobrinhos Gabriela e Thiago e a querida Nádia, pelo grande amor.

RESUMO

A neosporose é uma doença infecciosa, causada por *Neospora caninum*, protozoário intracelular obrigatório, formador de cistos, tendo o cão doméstico como principal hospedeiro definitivo. O cão quando infectado pode contaminar água e alimentos destinados a ruminantes, transmitindo, assim, a doença, considerada uma das principais causas de aborto em bovinos leiteiros, em várias partes do mundo. Este estudo de corte transversal foi realizado para avaliar a relação entre a soroprevalência de bovinos a *N. caninum* e potenciais fatores de risco entre 1.204 vacas em produção, criadas em 40 rebanhos leiteiros localizados em três mesorregiões do estado de Minas Gerais. Foram aplicadas entrevistas aos produtores e, na ocasião, amostras de sangue foram coletadas de aproximadamente 30 vacas por rebanho, para a realização da reação de imunofluorescência indireta (RIFI). A associação entre os potenciais fatores de risco e a soropositividade dos bovinos foi avaliada utilizando um modelo *generalized estimation equations* (GEE) de regressão logística. A prevalência média global foi de 19,4% (IC 95%= 17,2-21,8) (234/1204) e entre rebanhos de 95% (IC 95%= 83,1-99,4) (38/40). Diversas variáveis se mostraram associadas à soroprevalência de *N. caninum*. Em fazendas, a ocorrência de repetição de cio ($p= 0,02$; OR= 3,84; IC 95%= 1,239-11,893), abortos repetidos ($p= 0,001$; OR= 2,54; IC 95%= 1,423-5,402) e anestro temporário ($p= 0,001$; OR= 3,44; IC 95%= 1,976-5,994) apresentou associação significativa ($p<0,05$) com a infecção por *N. caninum*. Além disso, quando presentes, os cães, se criados soltos ($p= 0,041$; OR= 2,20; IC 95%= 1,033-4,672) e ou alimentados com carne crua ($p= 0,001$; OR= 1,91; IC95%= 1,443-2,519), constituem fatores de risco à infecção por *N. caninum*. Entre bovinos, foi observado que a soropositividade a *N. caninum* eleva quase duas vezes as chances de eles abortarem ao longo da sua vida reprodutiva ($p= 0,004$; OR= 1,978; IC 95%= 1,249-3,131). As evidências sorológicas deste estudo indicam que a infecção por *N. caninum* está amplamente distribuída entre os rebanhos leiteiros de Minas Gerais e associada significativamente a diversos fatores de risco, principalmente aqueles relacionados aos problemas reprodutivos em bovinos, com destaque para repetição de cios, abortos repetidos e anestros temporários.

Palavras-chave: Problemas reprodutivos. Regressão logística. Sorologia. Vacas leiteiras.

ABSTRACT

The neosporosis is an infectious disease caused by *Neospora Caninum*, obligate intracellular protozoan, former of cysts, that has the domestic dog as the main definitive host. This animal can contaminate water and food for ruminants, thereby transmitting the disease, considered a major cause of abortion in dairy cattle in various parts of the world. This cross-sectional study was conducted to evaluate the relationship between the prevalence of bovine *N. caninum* and potential risk factors between 1204 dairy cows reared on 40 dairy herds located on three of the twelve mesoregions the State of Minas Gerais. Interviews were carried out to producers, and at the time blood samples were collected from approximately 30 cows per herd to perform the indirect immunofluorescence assay (IFA). The association between potential risk factors and seropositivity animal model was evaluated using a generalized estimation equations (GEE) logistic regression. The global average prevalence was 19.4% (234/1204) and between herds of 95% (38/40). Several variables were associated with seroprevalence of *N. caninum*. At farm level, the occurrence of repeat breeders ($p = 0.02$, OR = 3.84, 95% CI = 1.239 to 11.893), repeated miscarriages ($p = 0.001$, OR = 2.54, 95% CI = 1.423 to 5.402) and temporary anoestrus ($p = 0.001$, OR = 3.44, 95% CI = 1.976 to 5.994) were significantly associated ($p < 0.05$) with infection with *N. caninum*. Furthermore, when present, set loose the dogs ($p = 0.041$, OR = 2.20, 95% CI = 1.033 to 4.672) and / or fed raw meat ($p = 0.001$, OR = 1.91, 95 % = 1.443 to 2.519) are risk factors for infection with *N. caninum*. Among animals, it was observed that each time a cow aborts increases almost twice the chances that animal seropositive to *N. caninum* ($p = 0.002$, OR = 1.676, 95% CI = 1.215 to 2.312). The serologic evidence of this study indicate that infection with *N. caninum* is widely spread among dairy herds in the State of Minas Gerais and significantly associated with several risk factors, especially those related to reproductive problems, with emphasis on repetition of cycles, repeated miscarriages and temporary anoestrus.

Key-words: Dairy cows. Logistic regression. Reproductive problems. Serology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Mapa de localização das três mesorregiões amostradas no estado de Minas Gerais (área escurecida).....35
- Figura 2 Posicionamento das 35 fazendas no mapa bidimensional definido pelas duas componentes principais retidas e a sua posição em relação às variáveis originais, após categorical principal component analysis.....64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Ocorrência de anticorpos anti- <i>N. caninum</i> , segundo diferentes técnicas sorológicas entre bovinos leiteiros criados em diferentes estados brasileiros.....	28
Tabela 2	Principais variáveis epidemiológicas questionadas em entrevistas aplicadas em 40 fazendas leiteiras no estado de Minas Gerais.....	37
Tabela 3	Variáveis quantitativas relacionadas ao efetivo bovino e produção leiteira avaliadas entre 40 propriedades leiteiras com menor ou maior frequência de vacas soropositivas (+) a <i>N. caninum</i> (RIFI 1:200), Minas Gerais.....	46
Tabela 4	Variáveis quantitativas relacionadas aos índices produtivos e reprodutivos avaliadas entre 40 propriedades leiteiras com menor ou maior frequência de vacas soropositivas (+) a <i>N. caninum</i> (RIFI 1:200), Minas Gerais.....	47
Tabela 5	Variáveis qualitativas relacionadas ao sistema de produção avaliadas entre 40 propriedades leiteiras com menor ou maior frequência de vacas soropositivas (+) a <i>N. caninum</i> (RIFI 1:200), Minas Gerais...	49
Tabela 6	Variáveis qualitativas relacionadas às características sanitárias avaliadas entre 40 propriedades leiteiras com menor ou maior frequência de vacas soropositivas (+) a <i>N. caninum</i> (RIFI 1:200), Minas Gerais.....	51
Tabela 7	Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)* na soropositividade de vacas leiteiras a <i>N. caninum</i> (RIFI 1:200), para todas as variáveis testadas entre 40 fazendas produtoras de leite em Minas Gerais.....	53
Tabela 8	Alterações reprodutivas entre vacas leiteiras provenientes de 40 propriedades leiteiras de acordo com o status sorológico para <i>N. caninum</i> (RIFI 1:200), Minas Gerais.....	55
Tabela 9	Resultado da análise de regressão logística múltipla estimada por <i>generalized estimation equations</i> (GEE), em relação aos fatores associados à soroprevalência por <i>N. caninum</i> (RIFI 1:200) em vacas leiteiras criadas em 40 fazendas produtoras de leite em Minas Gerais.....	60
Tabela 10	Variáveis determinantes nos componentes principais extraídos após análise de <i>categorical principal component analysis</i>	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISAO DE LITERATURA.....	12
2.1	Agente etiológico.....	12
2.2	Ciclo biológico.....	14
2.3	Mecanismos de transmissão.....	16
2.4	Patogenia e sinais clínicos.....	18
2.5	Aspectos imunológicos.....	19
2.6	Diagnóstico.....	21
2.7	Prevenção e controle.....	23
2.8	Epidemiologia.....	26
2.8.1	Prevalência.....	26
2.8.2	Fatores de risco.....	29
3	OBJETIVOS.....	33
3.1	Objetivo geral.....	33
3.2	Objetivos Especificos.....	33
4	MATERIAL E METODOS.....	34
4.1	Área do estudo.....	34
4.2	Seleção das fazendas.....	35
4.3	Sorologia.....	38
4.4	Análises estatísticas.....	38
4.4.1	Análise univariada.....	38
4.4.2	Análise múltipla.....	39
4.4.2.1	Regressão logística.....	39
4.4.2.2	<i>Categorical principal component analysis (CATPCA)</i>	41
5	RESULTADOS E DISCUSSAO.....	42
5.1	Soroprevalência.....	42
5.2	Perfil das propriedades leiteiras.....	44
5.3	Fatores de risco.....	54
5.4	<i>Categorical principal component analysis (CATPCA)</i>	60
6	CONCLUSÕES.....	65
	REFERENCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é referência na agropecuária mundial, com um dos maiores rebanhos bovinos, constituído por quase 210 milhões de cabeças, no ano de 2010 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2012b).

A sanidade dos rebanhos é um dos desafios ainda a serem enfrentados para que o Brasil continue se destacando na produção agropecuária. Na criação de bovinos leiteiros, o manejo sanitário é responsável pelo controle de diversas doenças nos rebanhos, como a neosporose, que se configura como uma importante enfermidade por causar distúrbios reprodutivos.

A neosporose é uma doença de descoberta relativamente recente e comum em muitos países produtores de leite (KAMGA-WALADJO et al., 2010; WILLIAMS et al., 2009), sendo causada pelo *Neospora caninum* (Apicomplexa: Sarcocystidae). Trata-se de um protozoário que pode infectar canídeos domésticos e silvestres, ruminantes e equinos. O parasito foi descrito e caracterizado, pela primeira vez, em 1984 e, atualmente, é considerado um dos principais agentes causadores de falhas reprodutivas em bovinos no mundo (BASSO et al., 2010).

Devido aos prejuízos econômicos causados por problemas reprodutivos em bovinos, *N. caninum* deve ser considerado um patógeno de importância. Alguns fatores de risco têm sido relacionados às infecções por *N. caninum*. Para determinar quais são estes fatores, é necessário associar informações (variáveis) sobre a realidade das propriedades, por meio da aplicação de formulários ou entrevistas, com a presença dos protozoários. Realizar estudos soropidemiológicos comparativos sobre esta doença em bovinos para estabelecer alguns fatores relacionados ao *N. caninum* que continuam

desconhecidos e propor práticas de prevenção são medidas importantes. Além disso, estudos que avaliam a sua abrangência em diferentes regiões são necessários (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007), para que se possa conhecer o real impacto desta doença para a produção animal no local.

Assim, considerando o papel de destaque do estado de Minas Gerais na produção de leite em âmbito nacional e a escassez de estudos sobre a epidemiologia de neosporose bovina, este trabalho foi realizado com o objetivo de determinar os fatores de risco relacionados à prevalência de bovinos infectados por *N. caninum*, em rebanhos leiteiros, no sul de Minas Gerais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Agente etiológico

A neosporose é uma doença causada pelo *Neospora caninum*, parasito intracelular obrigatório formador de cistos, que pode infectar uma série de hospedeiros de interesse produtivo, como os ruminantes (YAO et al., 2009).

Os prejuízos econômicos causados por este patógeno incluem, principalmente, as perdas reprodutivas, como retorno ao cio, com intervalos regulares ou irregulares, abortos, nascimento de animais fracos e inviáveis, com sinais neurológicos, ou persistentemente infectados (ALMERIA et al., 2009a; ALMERIA et al., 2010; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

A morfologia do *N. caninum* varia de acordo com o momento no ciclo biológico. No estágio de taquizoítos, apresenta formato ovoide, lunar ou globular, medindo 3-7 x 1-5 µm; possui uma membrana plasmática de três camadas, além de três organelas secretoras diferentes, que participam da invasão, formação e manutenção do vacúolo parasitóforo encontrado no

citoplasma da célula hospedeira, o que permite a sobrevivência e a proliferação do parasito (HEMPHILL et al., 1998).

Os taquizoítos possuem multiplicação rápida (do grego *tachys* = rápido), penetram ativamente na célula hospedeira, se dividem rapidamente por endodiogenia, provocando lise celular e infectando novas células. Sua presença no organismo do hospedeiro indica fase aguda ou proliferativa da infecção, transformando-se, a seguir, em bradizoítos, quando surge a resposta imune do hospedeiro. Os bradizoítos podem ser reativados e romper o cisto, se houver uma queda de imunidade do hospedeiro (WILLIAMS et al., 2009).

Os bradizoítos apresentam multiplicação lenta (do grego *bradys* = lento) e forma alongada, com um núcleo subterminal medindo aproximadamente 8x2 µm. Contêm organelas tipicamente encontradas em outros coccídios (DUBEY et al., 2002). Apresentam as mesmas organelas encontradas nos taquizoítos, porém, com segmentos membranosos planos e vesículas menores. É capaz de formar cistos intracelulares no interior de tecidos. O cisto tem a forma arredondada, sua parede é lisa, apresentando ramificação e sua espessura depende do tempo da infecção, podendo se apresentar envolta por uma membrana cística que o protege de reações imunológicas e fisiológicas do hospedeiro (FUCHS; SONDA; GOTTSTEIN, 1998).

Os cistos teciduais de *N. caninum* são encontrados em diferentes tecidos, como o nervoso e o muscular, primariamente em baixo número nos neurais, quando comparado aos de *T.gondii*, e podem ficar em latência por meses ou anos, por fim restabelecendo todo o ciclo, quando consumido por um hospedeiro definitivo. Os oocistos de *N. caninum* são formas infectantes, geralmente com tamanho de 11,7 x 11,3 µm, transparentes e com 0,6 a 0,8 µm de espessura. Os esporozoítos são alongados e têm, geralmente, 6,5 x 2 µm de tamanho (DUBEY et al., 2002).

2.2 Ciclo biológico

Neospora caninum tem um típico ciclo de vida heteroxeno facultativo, que envolve um hospedeiro definitivo canídeo e uma série de outros hospedeiros intermediários, como ruminantes, aves e equinos (WILLIAMS et al., 2009). O ciclo biológico do *N. caninum* foi elucidado por McAllister et al. (1998), após confirmação experimental de que os canídeos eliminam oocistos nas fezes quando ingerem cistos contidos em cérebro de camundongos infectados, levando a concluir que o cão é um dos hospedeiros definitivos.

O ciclo de vida se caracteriza por três tipos de formas infectantes: oocistos, taquizoítos e bradizoítos (EIRAS et al., 2011). Os oocistos constituem a forma ambientalmente resistente do parasito. Cada oocisto possui em seu interior dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos, que são resultantes da multiplicação sexuada gametogônica, que ocorre no processo de infecção enteroepitelial em cães (WILLIAMS et al., 2009). Após eliminação nas fezes do hospedeiro definitivo, os oocistos passam por um processo de esporulação, se tornando infectantes (DUBEY et al., 2002). Segundo Dubey, Schares e Ortega-Mora (2007), cães eliminam oocistos cinco dias ou mais após a infecção primária, podendo a duração dessa eliminação ser errática e variar de um a vários dias.

Dentre os possíveis hospedeiros intermediários, o mais comum e importante economicamente é o bovino. Neste hospedeiro ocorre multiplicação assexuada dos taquizoítos dentro de vacúolos parasitóforos de diferentes tipos celulares. Os taquizoítos se diferenciam, então, em bradizoítos, cuja multiplicação é mais lenta. Nesta forma, o parasito mantém a infecção persistente nos hospedeiros. O estágio de latência não impede a infecção quando

são ingeridos pelo cão. Ambas as formas são resultantes da proliferação no processo de infecção disseminada no ciclo extraluminal assexuado do parasito (WILLIAMS et al., 2009).

De acordo com Dubey, Schares e Ortega-Mora (2007), as três formas estão envolvidas na infecção dos hospedeiros: oocistos presentes no ambiente infectam os hospedeiros intermediários; bradizoítos em cistos teciduais dos hospedeiros intermediários infectam canídeos após ingestão destes tecidos e os taquizoítos passam pela placenta dos hospedeiros intermediários, promovendo a infecção de fetos. Isso ocorre com a reativação dos bradizoítos em taquizoítos que, ao migrar para outros tecidos como o útero, realizam a infecção fetal transplacentária endógena (WILLIAMS et al., 2009).

Neospora caninum possui um ciclo de vida em animais silvestres e outro em hospedeiros domésticos; nestes ambientes distintos, canídeos domésticos (*Canis lupus familiares*) e silvestres (*Canis lupus*, *Canis lupus latrans* e *Canis lupus dingo*) são os hospedeiros definitivos do agente, liberando oocistos nas fezes (BJORKMAN et al., 2010; DUBEY et al., 2011; DUBEY; LINDSAY, 1996; GODIM et al., 2004;). Recente discussão tem sido levantada sobre a existência de outros canídeos silvestres de importância epidemiológica com potencial de contaminação ambiental do agente (BJORKMAN et al., 2010), o que poderia constituir um fator de risco para a produção animal próximo às áreas de matas. Porém, pouco se sabe sobre a epidemiologia de *N. caninum* relacionada a essas áreas (AGUIAR et al., 2006).

Várias espécies animais podem servir como hospedeiros intermediários do *N. caninum*, sendo os bovinos os mais importantes economicamente (WILLIAMS et al., 2009). Sabe-se que camundongos e ratos são consumidos por diferentes espécies de carnívoros, inclusive canídeos. Especula-se que, provavelmente, eles contribuem para a disseminação do parasito (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

2.3 Mecanismos de transmissão

O protozoário *N. caninum* tem ampla distribuição mundial. A vertical é a principal via de transmissão do parasito (TREES; WILLIANS, 2005). A transmissão vertical assume papel primordial na manutenção da doença (HASLER et al., 2006; YILDZ et al., 2009), pelo fato de a maioria das infecções congênicas resultar em animais clinicamente normais, mas persistentemente infectados.

Em estudo recente, foi verificada maior soroprevalência para *N. caninum* em vacas sem histórico de abortos em relação àquelas que já abortaram, indicando a importância do nascimento de fetos sem sinais clínicos, mas já infectados com o agente, o que permite a manutenção da doença nas gerações futuras (YILDZ et al., 2009). Em estudo realizado por Moore et al. (2009), na Argentina, verificou-se que a taxa de transmissão vertical foi de 37,1%, em bovinos.

A transmissão vertical tem sido demonstrada em vários hospedeiros (cães, ruminantes, gatos, camundongos, macacos e porcos), sendo considerada a principal em bovinos (TREES; WILLIANS, 2005). Ocorre via materno-fetal, pela placenta, podendo, esta infecção, ser recrudesciente ou primária. Um animal infectado pode transmitir a infecção ao feto por sucessivas gestações, contribuindo significativamente para a persistência da infecção no rebanho e apresentar um ou mais abortos durante a sua vida reprodutiva, acarretando grandes perdas reprodutivas (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007). De acordo com Dubey, Schares e Ortega-Mora (2007), *N. caninum* é um dos parasitos com maior capacidade de passar pela placenta dos hospedeiros.

Em estudos recentes tem sido demonstrado que o termo “transmissão vertical” está dividido em endógena e exógena, para descrever duas situações. A

primeira se refere à transmissão fetal que ocorre durante a gestação caracterizada como infecção materna, definida como infecção transplacentária endógena. Neste tipo de infecção, os esporozoítos se diferenciam em taquizoítos que, por sua vez, migram pela circulação, provavelmente por meio de células do sistema fagocítico mononuclear para o útero (WILLIAMS et al., 2009). A segunda se refere à transmissão fetal que ocorre após a reativação da infecção materna pré-natal, sendo esta caracterizada como uma infecção exógena. Nesse tipo de transmissão, bradizoítos se diferenciam em taquizoítos que migram para o útero e, via placenta, realizam a infecção fetal (WILLIAMS et al., 2009).

Na transmissão horizontal, os hospedeiros intermediários ingerem alimentos ou água contaminada com oocisto de *N. caninum*, liberados, principalmente, pelos cães (BASSO et al., 2010). Essa forma de transmissão também pode acontecer em animais que ingerem cistos presentes em tecidos de qualquer hospedeiro intermediário, como restos de placenta ou sistema nervoso. Já foram encontrados anticorpos anti-*N. caninum* no homem, mas não foi possível realizar o isolamento do agente e nem foi identificado o parasito por meio de métodos moleculares em tecidos de seres humanos (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007). Assim, a neosporose apresenta um potencial zoonótico ainda em discussão (REITEROVA et al., 2009).

Outra possível forma de infecção de animais recém-nascidos é a lactogênica, principalmente por meio do colostro. Acredita-se que o *N. caninum* seja sensível à acidez estomacal, porém, em estudos recentes, demonstrou-se que animais alimentados com *pool* de colostro, ou seja, colostro de várias vacas diferentes que é fornecido aos bezerras, demonstram maior probabilidade de apresentarem a infecção pelo parasito (CORBELLINI et al., 2006).

2.4 Patogenia e sinais clínicos

A patogenia de *N. caninum* é complexa e só parcialmente compreendida. Alguns fatores parecem influenciar na ocorrência do aborto, tais como idade do animal, época da infecção, imunidade da mãe durante a gestação, dentre outros, o que determina porque alguns animais soropositivos abortam e outros não. Da mesma forma, o mecanismo preciso pelo qual ocorre aborto em infecções por *N. caninum* é desconhecido (ALMERIA et al., 2010).

Vacas soropositivas gestantes normalmente apresentam um aumento na quantidade de anticorpos anti-*N. caninum*, o que não representa proteção materna ao feto, e sim uma maior taxa de passagem dos parasitos pela placenta e, portanto, uma maior ocorrência de lesões fetais e aborto. Almeria et al. (2010) demonstraram que vacas com maiores títulos sorológicos apresentam maior propensão ao aborto, provavelmente, em função de um aumento na parasitemia, o que justifica os maiores níveis de anticorpos nestes animais.

O abortamento ocorre quando as lesões causadas pela proliferação do parasito na placenta ou no feto tornam a gestação inviável. Estas lesões podem ser causadas pela ação do parasito diretamente sobre o feto ou sobre a placenta, o que causa uma diminuição da passagem de nutrientes via placenta (ALMERIA et al., 2010). Neste mesmo estudo, os autores concluíram que as lesões na placenta e no feto, além da forte resposta imune no feto, principalmente em relação à liberação de interferon-gama, são mais importantes na patogenia do aborto que o tempo de infecção das mães gestantes. Essas lesões podem levar ao desenvolvimento dos sinais clínicos e patológicos descritos em casos de neosporose.

O sinal clínico mais importante e evidente em vacas adultas é, de fato, o abortamento, que pode ocorrer em qualquer estágio de infecção, mais frequente

na segunda metade da gestação (ALMERIA et al., 2010). Porém, além do aborto, os fetos também podem morrer no útero e ser mumificados ou autolisados; pode ainda ocorrer o nascimento de animais apresentando sinais clínicos nervosos ou clinicamente normais, mas persistentemente infectados (ALMERIA et al., 2009a).

Normalmente, vacas infectadas não apresentam nenhum outro sinal clínico, além destes de caráter reprodutivo (ALMERIA et al., 2010), mas ainda é descrita, na literatura, redução de produtividade (produção leiteira e ganho de peso) (REITEROVA et al., 2009). Parte da variação clínica observada na neosporose pode ocorrer em função da diversidade presente entre os diferentes isolados do agente que infectam os animais de forma natural. Estudos sobre esta diversidade genética do parasito são de grande importância, ao se considerar a potencial utilização de isolados de baixa virulência na fabricação de vacinas (ROJO-MONTEJO et al., 2009).

2.5 Aspectos imunológicos

A relação entre o sistema imune do hospedeiro intermediário e *N. caninum* é complexa e depende da rota e da época da primoinfecção (WILLIAMS et al., 2009).

As infecções parasitárias caracterizam-se por estimular inúmeros mecanismos imunológicos de defesa, mediados por células e anticorpos, e a eficiência da resposta imune depende do parasito em questão, do estágio da infecção e das condições fisiológicas do hospedeiro (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999). De maneira simplificada, após a infecção e início da resposta imune inata, ocorre a apresentação do antígeno a outras células do sistema imune, como por exemplo, aos linfócitos T CD4+ (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999). Quando há predomínio de células T CD4+ do tipo Th1, há um

microambiente de interleucina-2, interferon-gama e fator de necrose tumoral-alfa e beta, fatores críticos para o desenvolvimento da imunidade anti-parasitos intracelulares, assim como o predomínio de mudança isotípica para anticorpos do tipo IgG2. Por outro lado, o predomínio de células T CD4+ do tipo Th2 representa um predomínio das interleucina-4, 5, 6, 9, 10 e 13, que são essenciais para a resposta imune por meio de anticorpos, além de estimular a mudança dos anticorpos para a classe IgE e subclasse IgG1, importantes no combate a grandes parasitos extracelulares (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999).

Strohbusch et al. (2009) verificaram que taquizoítos de *N. caninum* são capazes de invadir e proliferar em células dendríticas imaturas, e que a presença deste parasito é capaz de propiciar a resposta imune tanto Th1 ou Th2, por meio do estímulo a liberação de interleucinas 10 e 12 (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999).

O balanço no controle de *N. caninum* desempenhado pelo sistema imune da gestante parece ser um fator determinante na ocorrência ou não do aborto (ALMERIA et al., 2010). Segundo Almeria et al. (2010), mais estudos sobre a expressão do perfil de citocinas são necessários, visando elucidar qual tipo de resposta está mais relacionada ao aborto ou a transmissão transplacentária durante a infecção.

Durante uma gestação normal, ocorre um predomínio da resposta do tipo Th2, cujas citocinas inibem a estimulação das células Th1. Porém, o estímulo gerado pela infecção intracelular de *N. caninum* leva a uma mudança neste perfil normal de citocinas, ou seja, da resposta Th2 para Th1 (ALMERIA et al., 2009b). Segundo Almeria et al. (2010), o interferon-gama liberado fortemente após estímulo de células Th1, apesar de ser mais adequado no combate a parasitos intracelulares, como *N. caninum*, aumenta a incidência de abortos, por também promover maior rejeição do embrião ou feto. Apesar disso, Almeria et al. (2009b) afirmam que os anticorpos da subclasse IgG2, associados ao

interferon-gama, ambos liberados na resposta tipo Th1, são fatores de proteção à ocorrência de abortos em vacas soropositivas para o *N. caninum*.

Segundo Williams et al. (2009) e Almeria et al. (2010), vacas já expostas ao *N. caninum* desenvolvem imunidade frente a transmissão horizontal, mas não são capazes de evitar o recrudescimento da doença durante a gestação. Isso significa que a memória imunológica de vacas infectadas, apesar de ser capaz de resistir ao desafio da transmissão exógena, não é suficiente para conferir proteção ao feto por meio do impedimento da transmissão vertical transplacentária endógena.

2.6 Diagnóstico

O diagnóstico da neosporose é baseado em avaliações *post-mortem* (feto abortado) ou *in vivo* (mãe), neste último por meio de exames que verificam a presença de anticorpos anti-*N. caninum* no soro dos hospedeiros. Segundo Moré et al. (2008), Reichel, Ross e McAllister (2008) e Wapenaar et al. (2007), métodos sorológicos, como reação de imunofluorescência indireta (RIFI), *enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA) e teste de aglutinação (NAT), são recomendados para o diagnóstico de doenças causadas por protozoários de interesse veterinário, como *N. caninum*, pois avaliam o contato do agente com o hospedeiro de forma específica, por meio da detecção de IgG. De acordo com Wapenaar et al. (2007), a RIFI é o teste com melhor desempenho entre esses três, apesar da subjetividade implícita na sua leitura. Contudo, segundo esses mesmos autores, NAT e ELISA, especialmente este último, podem ser mais recomendados para avaliação da presença do *N. caninum* em alguns casos. Isso porque os mesmos são testes não espécie-específicos e, como o parasito possui diferentes espécies hospedeiras, esta vantagem se torna importante na avaliação da neosporose.

Métodos sorológicos são importantes também nos estudos soroepidemiológicos das doenças. Segundo Hasler et al. (2006), na utilização do ELISA, é preciso ter cautela quando se pretende utilizar o resultado na classificação dos animais de um rebanho entre positivos ou negativos para o agente. Por exemplo, para o controle da neosporose por meio da eliminação de animais soropositivos, o teste pode apresentar resultados falso-negativos ou falso-positivos.

Como método molecular, pode ser utilizada a reação em cadeia de polimerase (PCR), técnica altamente específica e sensível para o diagnóstico de *N. caninum* (YAO et al., 2009). Esta técnica é aplicada, principalmente, no diagnóstico *post mortem* da neosporose em tecidos fetais (SUTEU et al., 2010).

O diagnóstico *post mortem* também pode ser baseado em avaliação histológica e imunoistoquímica de tecidos oriundos de fetos abortados. Pescador et al. (2007) avaliaram fetos abortados entre três e oito meses de idade e verificaram que 53% apresentavam cérebros liquefeitos. Microscopicamente, foi observado que a maioria das lesões se concentrava em tecidos musculares, com infiltrado de células mononucleares. Na maioria dos fetos também foi encontrada necrose acompanhada de infiltrado inflamatório mononuclear no tecido pulmonar que, em alguns casos, ocupava quase todo o lóbulo do pulmão, com edema associado. No tecido cerebral foi encontrada encefalite não supurativa e necrose acompanhada de infiltrado inflamatório mononuclear, que também foi verificado nos rins e no fígado, mas em menor quantidade. Neste mesmo estudo, após aplicação de técnicas de imunoistoquímica, foi verificada relação ($P < 0,01$) somente entre consistência cerebral (*odds ratio*=5,73) e lesões no pulmão (*odds ratio*=12,11) com a infecção por *N. caninum*. Estes resultados indicam que o tecido cerebral, mesmo que autolisado, é adequado para a aplicação da técnica de imunoistoquímica e que o tecido pulmonar pode ser

utilizado como auxiliar no diagnóstico presuntivo de aborto causado por *N. caninum*.

É importante ressaltar que, de acordo com Dubey, Schares e Ortega-Mora (2007), apesar de muito importante, o diagnóstico sorológico ou molecular de tecidos fetais não pode ser usado como determinante para se confirmar a neosporose como causa do aborto, devido à alta taxa de nascimento de bezerras saudáveis, porém, persistentemente infectados.

2.7 Prevenção e controle

Os prejuízos econômicos decorrentes da neosporose podem chegar a centenas de milhares de dólares por ano, no mundo (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007), o que evidencia a importância do desenvolvimento de medidas de profilaxia e, portanto, a minimização destes custos. Existem indícios de que as vacinas inativadas produzem um efeito preventivo na transmissão vertical (MOORE et al., 2011), porém, ainda não foi confirmada a eficiência na prevenção de abortos e os resultados ainda são muito discutidos.

Recentemente Weston, Heuer e Williamson (2012) verificaram que a eficácia da vacina Bovilis® Neoguard (batch 244016; Intervet International B.V., Boxmeer, The Netherlands) foi de 61% na prevenção do aborto em apenas uma de cinco fazendas avaliadas, além de não ter prevenido a transmissão vertical em nenhuma delas. Segundo Reichel e Ellis (2009), a vacinação eficaz contra *N. caninum* reduziria em até 90% as perdas econômicas decorrentes deste parasito em longo prazo. Estes pontos demonstram a importância do desenvolvimento de vacinas inativadas eficazes contra a neosporose (MOORE et al., 2011)

O desafio de uma vacina eficaz para a neosporose está no impedimento da primoinfecção de animais e do recrudescimento da doença em animais positivos, evitando, assim, o aborto (REICHEL; ELLIS, 2009).

Existem drogas experimentalmente eficazes contra o *N. caninum*, como o toltrazuril (KRITZNER et al., 2002). Porém, segundo Reichel e Ellis (2009), o tratamento deve ser iniciado o mais rápido possível, antes que os sinais clínicos se tornem irreversíveis, além de ser, muitas vezes, economicamente inviável. Apesar disso, de acordo com Dubey, Schares e Ortega-Mora (2007), com um maior conhecimento nas relações parasito-hospedeiro durante a gestação, diferentes estratégias de tratamento podem ser recomendadas em rebanhos com altos índices de transmissão transplacentária endógena e exógena. Segundo esses mesmos autores, atualmente, ainda não existem drogas seguras e eficientes que possam ser utilizadas na prática.

Segundo Dubey, Schares e Ortega-Mora (2007), medidas de biosseguridade compreendem as ações que visam impedir a entrada de determinado patógeno ou agente em uma população animal. Para a neosporose bovina, segundo estes mesmos autores, essas medidas devem ser tomadas para se evitar a entrada e a disseminação do agente em um rebanho livre ou mesmo infectado, ou seja, no intuito de diminuir tanto a transmissão horizontal como a vertical. Dentre as medidas de prevenção, as mais indicadas são: utilizar somente receptoras soronegativas na transferência de embrião; evitar o acesso de cães aos tecidos de fetos abortados, fluidos e restos de placentas, bem como a comedouros e bebedouros, mantendo sempre os alimentos em lugares fechados e incentivar o uso de maternidades individuais (REITEROVA et al., 2009) e o controle de roedores (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Dubey, Schares e Ortega-Mora (2007) citam que um controle correto da neosporose nos rebanhos inclui o descarte de animais soropositivos e a retirada da reprodução daqueles nascidos de mães comprovadamente positivas. Apesar

disso, devido às altas taxas de prevalência observadas em algumas regiões do Brasil, o descarte dos animais soropositivos no controle em uma propriedade não é economicamente viável, apesar de matematicamente mais eficiente, principalmente no curto prazo (HASLER et al., 2006).

A presença de um animal soropositivo em uma propriedade com histórico de abortos comprovados em resultado sorológico não infere que o descarte deve ser realizado, uma vez que muitos animais soropositivos podem ter abortado por outras causas. A melhor maneira de prevenção e controle da doença é realizar análise soroepidemiológica e conhecer o histórico reprodutivo. A compra de animais comprovadamente negativos para *N. caninum* é uma importante forma de prevenção (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Assim, é importante, no controle da neosporose, atuar sobre as duas formas de transmissão do agente: a vertical e a transmissão horizontal, esta última por meio da redução do contato de cães com os animais de interesse reprodutivo (CORBELLINI et al., 2006). Estas medidas podem trazer bons resultados, principalmente no que tange à redução dos custos associados ao diagnóstico, prevenção e controle do agente.

É importante ressaltar que, de acordo com Dubey, Schares e Ortega-Mora (2007), não é possível aplicar medidas gerais de controle efetivo, uma vez que cada região tem uma característica epidemiológica específica na neosporose. Assim, é prudente observar essas características antes de se realizar um programa de controle dessa doença.

2.8 Epidemiologia

2.8.1 Prevalência

Para se entender a epidemiologia do *N. caninum*, é importante conhecer a abrangência do agente e a sua distribuição geográfica (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Segundo Bartels et al. (2006), em estudo realizado na Europa, a soroprevalência para *N. caninum* em bovinos pode variar entre 16% a 94% entre rebanhos e 0,5% a 30% entre animais, dependendo do país e da região. Essa variação pode ocorrer em função da diferente exposição aos fatores de risco existentes em cada localidade.

Estudos soropidemiológicos já foram realizados em diferentes regiões do Brasil e alguns deles estão compilados na Tabela 1. Em Minas Gerais, a soroprevalência a *N. caninum* oscila bastante entre vacas leiteiras de diferentes rebanhos, podendo variar de 16,8% (COSTA et al., 2001) a 97,2% (GUEDES et al., 2008). No estado de São Paulo, Sartor et al. (2003) encontraram 15,3% de vacas leiteiras soropositivas, enquanto Ragozo et al. (2003) encontraram 27,3%, porém, utilizando título mais baixo. No Rio de Janeiro, Ragozo et al. (2003) e Munhoz et al. (2009) encontraram soroprevalências de 22,7% e 23,3%, respectivamente. Resultado similar foi verificado por Ragozo et al. (2003), no Paraná, quando observou que 21,3% das vacas leiteiras estudadas apresentavam anticorpos anti-*N. caninum*. Em Goiás e no Maranhão, Mello et al. (2006) e Teixeira et al. (2010) encontraram sorologias mais altas entre os animais, de 30,4% e 50,7%, respectivamente, enquanto, no Mato Grosso do Sul, Oshiro et al. (2007) e Mello et al. (2008) encontravam valores mais baixos, de 14,9% e 11,7%, respectivamente. Na Amazônia, no primeiro exame sorológico realizado naquela região, foi encontrada uma prevalência para *N. caninum* de 8,8% em

vacas e 72% entre fazendas (AGUIAR et al., 2006). A aparente ausência *N. caninum* em algumas regiões está mais relacionada à escassez de estudos soropidemiológicos que possam demonstrar a realidade epidemiológica da doença no Brasil que a falta do agente. Em outro estudo realizado por Corbellini et al. (2006), na região sul, foi verificada uma soroprevalência de 17,8% para animais e de 93,3% entre rebanhos. Santos et al. (2010), em gado de corte na Bahia, verificaram soroprevalência de 20%.

Na Europa, existe grande diferença na soroprevalência entre países como Espanha (63% em gado leiteiro e 46% em gado de corte), Alemanha (49% em gado leiteiro e 41% em gado de corte) e Holanda (76% em gado leiteiro e 61% em gado de corte) (BARTELS et al., 2006). Loobuyck et al. (2009) verificaram soroprevalência de 2,8% em vacas de leite na Suécia, valor bem abaixo daqueles encontrados em algumas regiões brasileiras e europeias. Em outros estudos, já foram encontrados 20% na França (KLEIN et al., 1997), 46% em Portugal (CANADÁ et al., 2004), 30,8% na Itália (RINALDI et al., 2005), 15,2% na Grécia (SOTIRAKI et al., 2008) e 12,9% no Reino Unido (WOODBINE et al., 2008).

Em avaliação soropidemiológica na África, Kamga-Waladjo et al. (2010) demonstraram a alta difusão do agente neste continente, com prevalência de 17,9% entre animais e de 100% entre as fazendas produtoras de leite. Na Argélia, Ghalmi et al. (2012) verificaram resultados próximos: 53% dos rebanhos avaliados apresentavam pelo menos um bovino soropositivo e 19,6% dos animais avaliados apresentavam anticorpos anti-*N. caninum*. Já na Austrália, Nasir et al. (2011) encontraram soroprevalência de 3,8% entre animais e de 40% entre rebanhos leiteiros.

É importante considerar que todas as diferenças encontradas na ocorrência do *N. caninum* entre regiões de um mesmo país ou entre países ocorrem, pois diversos fatores produtivos e sanitários de risco ou de proteção

associados à ocorrência do agente estão presentes em maior ou menor grau nas diferentes regiões. Além disso, a falta de padronização da técnica sorológica e de amostragem usada nos estudos, assim como a categoria animal investigada, são fatores de grande influência sobre os resultados obtidos.

Tabela 1. Ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum*, segundo diferentes técnicas sorológicas entre bovinos leiteiros criados em diferentes estados brasileiros.

Estado	n	Categoria animal	Ocorrência (%)	Técnica	Ponto de corte*	Referência
MG/SP	600	Vacas leiteiras	16,8	RIFI	1:200	Costa et al. (2001)
MG	584	Vacas leiteiras	18,7	ELISA	IDEXX	Melo et al. (2001)
MG	126	Vacas leiteiras	34,4	RIFI	1:25	Ragozo et al. (2003)
MG	559	Vacas leiteiras	97,2	RIFI	1:200	Guedes et al. (2008)
MG	534	Bezerras e novilhas	46,3	RIFI	1:200	Santos et al. (2009)
SP	150	Vacas leiteiras	27,3	RIFI	1:25	Ragozo et al. (2003)
SP	521	Vacas leiteiras	15,9	RIFI	1:200	Sartor et al. (2003)
SP	408	Vacas leiteiras	35,5	ELISA	1:100	Sartor et al. (2005)
RJ	75	Vacas leiteiras	22,7	RIFI	1:25	Ragozo et al. (2003)
RJ	563	Vacas leiteiras	23,3	ELISA	IDEXX	Munhoz et al. (2009)
PR	75	Vacas leiteiras	21,3	RIFI	1:25	Ragozo et al. (2003)
RS	70	Vacas leiteiras	18,6	RIFI	1:25	Ragozo et al. (2003)
RS	1549	Vacas leiteiras	17,8	RIFI	1:200	Coberllini et al. (2006)
GO	444	Vacas e novilhas leiteiras	30,4	RIFI	1:250	Mello et al. (2006)
MS	23	Vacas leiteiras	21,7	RIFI	1:25	Ragozo et al. (2003)
MS	2448	Bovinos	14,9	RIFI	1:50	Oshiro et al. (2007)
MS	392	Bovinos	11,7	RIFI	1:50	Mello et al. (2008)
MA	812	Vacas leiteiras	50,7	RIFI	1:200	Teixeira et al. (2010)
RO	2109	Vacas leiteiras	8,8	RIFI	1:25	Aguiar et al. (2006)
PA	40	Vacas leiteiras	17,5	RIFI	1:100	Minervino et al. (2008)

* IDEXX= IDEXX HerdChek *Neospora Caninum* antibody, indirect ELISA, sonicate lysate 598 of tachyzoites, IDEXX Laboratories, USA

Existem evidências que sugerem que bovinos leiteiros são mais susceptíveis à infecção por *N. caninum* que bovinos de corte, talvez em função do sistema de criação mais intensivo que favorece a transmissão pelo agente (ALMERIA et al., 2009a).

Há dois tipos de transmissão transplacentária para *N. caninum*, a endógena e a exógena (BASSO et al., 2010; DUBEY;CHARES; ORTEGA-MORA, 2007). Esta classificação é epidemiologicamente importante, pois está associada a dois tipos de abortos no rebanho bovino, o endêmico e o epidêmico (BASSO et al., 2010). No primeiro, a ocorrência do aborto se distribui ao longo do ano, em baixas quantidades e a sua ocorrência depende da ativação de uma infecção parasitária pré-existente. Em surtos de abortos epidêmicos, mais de 10% das vacas abortam em um período de quatro a oito semanas. Este último depende da exposição das vacas a uma fonte contaminante comum (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Pouco se sabe sobre os diferentes genótipos de *N. caninum* causadores de aborto, mas recentes estudos de biologia molecular podem ajudar a esclarecer esses pontos (BASSO et al., 2010). Em estudo realizado por Basso et al. (2010) foi demonstrado que: em situações de abortos epidêmicos existe só uma cepa do parasito relacionada ao surto, uma vez que a fonte infectante dos animais é a mesma. Apesar disso, é possível que os cães eliminem diferentes cepas, caso se alimentem de diferentes tecidos, o que poderia gerar uma infecção mista, mesmo em condições de abortos epidêmicos, após contaminação horizontal das vacas e transmissão vertical transplacentária exógena aos fetos (BASSO et al., 2010).

2.8.2 Fatores de Risco

Alguns fatores de risco têm sido relacionados às infecções por *N. caninum*. Segundo Dubey, Schares e Ortega-Mora (2007), para aumentar a

evidência de que, de fato, um fator estudado é um verdadeiro fator de risco, deve-se realizar a repetição dos estudos. Além disso, este tipo de estudo auxilia na minimização das perdas produtivas por meio do fornecimento de informações que possam auxiliar na prevenção e no controle de doenças. O conhecimento dos fatores de risco associados à prevalência do *N. caninum* e à ocorrência de abortos relacionados à neosporose também auxilia na implementação de métodos de controle da doença nos rebanhos. A maior parte do conhecimento sobre os fatores associados à ocorrência da neosporose é obtida a partir de estudos retrospectivos transversais ou de caso-controle (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

A susceptibilidade do hospedeiro favorece uma maior exposição, devido à existência de vários mecanismos que possibilitam a disseminação da doença. Por exemplo, a presença de fetos abortados ou restos placentários constituem fontes de infecção do agente, principalmente aos hospedeiros definitivos (cães), que passam a contaminar o ambiente com oocistos nas fezes. Dessa forma, ocorre a transmissão horizontal do agente aos hospedeiros intermediários, podendo causar o aborto. Nesse sentido, segundo Williams et al. (2009), uma vaca infectada com *N. caninum* tem de três a sete vezes mais probabilidade de abortar que uma não infectada.

O risco de infecção dos hospedeiros susceptíveis aumenta quando diferentes espécies que participam do mesmo ciclo de vida de um agente são criadas no mesmo ambiente, em contato direto ou indireto. Em estudo realizado por Vanleeuwen et al. (2010), em rebanhos bovinos, os fatores de risco estavam associados à presença de cães, principalmente em propriedades rurais onde foi relatada ocorrência de sinais clínicos da neosporose. Neste mesmo estudo foi verificado que, independente de os cães se alimentam ou não de restos de placentas ou fetos abortados, sua presença constitui um fator de risco à ocorrência da neosporose. Isso corrobora os resultados de Corbellini et al.

(2006), que verificaram que vacas de fazendas menores em área apresentavam maiores chances de serem soropositivas para o agente em relação a vacas de fazendas maiores, pois, segundo estes mesmos autores, em fazendas menores, os cães têm maior contato com as vacas e, assim, maiores chances de se infectar e, conseqüentemente, contaminar o ambiente com oocistos eliminados nas fezes, aumentando o risco de transmissão horizontal. Por outro lado, Aguiar et al. (2006) observaram ausência desta relação de risco entre a presença de cães nas propriedades e a taxa de soropositividade para *N. caninum* em rebanhos bovinos, na região amazônica.

Moré et al. (2009) verificaram que vacas leiteiras com histórico de aborto têm mais chance de serem soropositivas para *N. caninum* em relação às que não abortaram e que fêmeas de corte. Isso confirma a existência da relação entre problemas reprodutivos em bovinos com a neosporose, assim como a evidência desta relação com tipo de exploração (gado leiteiro ou de corte).

Outro fator de risco para a neosporose nas propriedades leiteiras é a utilização de *pool* de colostro, o que pode propiciar uma possível transmissão do *N. caninum* pela via lactogênica (CORBELLINI et al., 2006).

Aguiar et al. (2006) verificaram que rebanhos leiteiros com mais de 25 vacas apresentam um risco quase dez vezes maior de apresentar o agente em relação aos com de até 25 animais. Em estudo semelhante, Almeria et al. (2009a) demonstraram que o manejo intensivo dos rebanhos está associado a uma maior prevalência de *N. caninum* nos animais.

Existem evidências de que a soroprevalência para *N. caninum* pode variar de acordo com a raça dos animais (ALMERIA et al., 2009a; SANTOLARIA et al., 2011). Segundo Bartels et al. (2006), algumas raças de corte nativas da Espanha, pastando em baixas densidades, apresentam maior resistência à neosporose que outras raças, enquanto algumas raças nativas da Suécia apresentam maior susceptibilidade à doença. Kamga-Waladjo et al.

(2010) também verificaram diferenças na susceptibilidade de bovinos leiteiros ao parasito em função do tipo de raça (nativa, exótica ou cruzada). Porém, existem diferenças, principalmente em relação ao sistema de produção e não propriamente a susceptibilidade à infecção por determinada raça, o que torna necessária a cautela na interpretação dos resultados (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Almeria et al. (2009a) verificaram que vacas holandesas inseminadas com sêmen proveniente de touros de corte, especialmente da raça Limousin, apresentam menores taxas de aborto em decorrência do *N. caninum*, quando comparadas com aquelas inseminadas com sêmen de touro de mesma raça da vaca da fêmea. Nesse estudo, foi observado que vacas soropositivas inseminadas com sêmen de touros da raça Limousin apresentavam uma taxa de aborto estatisticamente igual a taxas de aborto de vacas soronegativas. Isso ocorre, provavelmente, em função de uma menor passagem de parasitas pela placenta de vacas com feto mestiço, em comparação à placenta de gestação com fetos de raças não mestiças.

Maiores taxas de abortos em fetos apresentando lesões cerebrais foram relatadas em animais com níveis altos de anticorpos anti-*N. caninum*, uma vez que isso pode significar um aumento no número de parasitos, o que elevaria a ocorrência de lesões cerebrais e aborto fetal (ALMERIA et al., 2009a). Além disso, Kamga-Waladjo et al. (2010) observaram que vacas soropositivas para *N. caninum* apresentam piores índices reprodutivos relativos ao número de inseminação necessárias para a concepção e o intervalo entre partos, em comparação às soronegativas, em função da perda fetal logo no início da gestação.

Segundo Vanleeuwen et al. (2010), a utilização de transferência de embrião constitui um fator de proteção contra a neosporose, bem como outras medidas relacionadas a um maior cuidado do produtor com a sanidade do seu

rebanho que, segundo os autores, indiretamente se relacionam à menor soroprevalência do *N. caninum* nos animais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a soroprevalência e avaliar os fatores de risco associados à infecção por *N. caninum* em bovinos leiteiros, no sul de Minas Gerais.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a prevalência de vacas com anticorpos anti-*N. caninum* provenientes de fazendas leiteiras no sul de Minas Gerais.
- Avaliar os fatores produtivos, reprodutivos e sanitários associados à infecção por *N. caninum* em rebanhos leiteiros.
- Calcular os riscos de cada fator associado à ocorrência de *N. caninum* em bovinos leiteiros.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

Foi realizado um estudo observacional de corte transversal para avaliar a associação entre a prevalência do *N. caninum* em bovinos leiteiros e possíveis fatores de risco relacionados à infecção pelo parasito. Para isso, se avaliou a soroprevalência em vacas leiteiras criadas em fazendas produtoras de leite presentes em três das doze mesorregiões do estado de Minas Gerais. Minas Gerais é um importante polo de produção agrícola e bacia leiteira do Brasil. No estado se encontram, aproximadamente, 25% (12.636.548 cabeças) das vacas ordenhadas no Brasil e 28% (20.157.682.000 litros) da produção de leite total do país no ano de 2010 (IBGE, 2012a).

Minas Gerais é dividido em doze mesorregiões, das quais as três pesquisadas neste estudo se localizam geograficamente no sul do estado (meridiano 45°W e do paralelo 21°S), caracterizado por clima temperado úmido (Cwa e Cwb), segundo classificação de Köppen-Geiger.

O estudo foi realizado em 40 propriedades leiteiras distribuídas em 14 cidades de Boa Esperança, Campo Belo, Carrancas, Guapé, Ijaci, Ilícinia, Ingaí, Itumirim, Lavras, Nepomuceno, Oliveira, Perdões, Ribeirão Vermelho e São Francisco de Paula, localizadas nas mesorregiões do Campo das Vertentes, oeste e sul/sudoeste de Minas Gerais (Figura 1). Segundo dados do IBGE para o ano de 2006 (IBGE, 2012a), nestas três mesorregiões foram ordenhadas 25% das vacas do estado de Minas Gerais (795.027 cabeças) e 6,3% do total de vacas ordenhadas no Brasil. Em relação à produção leiteira, nas três mesorregiões, foram produzidos 28,5% (1.606.263.000 litros) do total de leite de Minas Gerais e 8% do total produzido no Brasil.



Figura 1. Mapa de localização das três mesorregiões amostradas no estado de Minas Gerais (área escurecida).

4.2 Seleção das fazendas

As propriedades foram escolhidas aleatoriamente a partir de listagens adquiridas em órgãos competentes locais, como Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), cooperativas ou secretarias municipais de agricultura e pecuária. Foram aplicados dois critérios de exclusão: a presença de, no mínimo, trinta vacas em produção na fazenda (secas e em lactação) e produção média de, pelo menos, 350 litros de leite/dia. A abordagem inicial foi feita com o responsável local, explicando a pesquisa, seus objetivos e benefícios, e buscando sua participação. O período de realização da coleta de dados foi de junho a dezembro de 2011.

A definição do número de observações (soros) (n) necessário à estimação da prevalência da doença no sul de Minas Gerais foi baseada na fórmula do Centro Panamericano de Zoonoses (CENTRO PAN-AMERICANO DE ZOONOSES - CEPANZO, 1979), a seguir:

$$n = [p \times (100 - p) \times z^2] / (d \times p / 100)^2$$

em que n= número de indivíduos a estudar (nº de amostras), p= prevalência esperada, d= erro esperado e z= grau de confiança, a 95%. Considerando uma prevalência estimada de 30%, um grau de confiança de 1,96 e uma margem de erro admissível de 10%, foi obtido um número de amostras de soros mínimo de 896. A partir deste valor, optou-se por estabelecer n=1204 animais, a fim de aumentar a confiança nos resultados.

Foram selecionadas, aproximadamente, e de forma aleatória, 30 vacas por fazenda, para a coleta de sangue, o que resultou num total de 40 fazendas pesquisadas. Para a coleta de informações, foram realizadas entrevistas a partir de formulários semiestruturados e testados previamente, com o objetivo de levantar informações sobre os possíveis fatores associados à ocorrência de *N. caninum* e a caracterização dos produtores e produção leiteira. O formulário era composto por 135 perguntas fechadas e 18 abertas, relacionadas a: i. propriedade, ii. rebanho, iii. manejo com a vaca gestante, iv. alterações reprodutivas, v. manejo sanitário, vi. parâmetros reprodutivos e vii. percepção sobre a neosporose bovina. Na tabela 2 estão representadas as principais perguntas presentes no formulário.

Além do questionário relativo a características de rebanho, para cada animal cujo sangue foi coletado foi questionado sobre o histórico de aborto (sim ou não e quantas vezes) e sobre a ocorrência de outros problemas reprodutivos (sim ou não) e, no caso positivo, quais seriam estes problemas. A entrevista foi

aplicada por entrevistador único, médico veterinário, com o tomador de decisão presente na propriedade, tendo, no primeiro mês, sido realizado o pré-teste do questionário para ajustes *in loco* da versão final, melhorando assim sua validade. Portanto, o período de amostragem foi de aproximadamente seis meses.

Tabela 2. Principais variáveis epidemiológicas questionadas em entrevistas aplicadas em 40 fazendas leiteiras no estado de Minas Gerais.

Item	Variáveis
1. Características da propriedade	Atividade da fazenda, área em hectares para o gado de leite, uso de monensina na ração de bovinos, abastecimento de água, nível de instrução dos funcionários.
2. Características do rebanho	Efetivo bovino, criação de outros animais na fazenda, quantidade e tipo de leite produzido, sistema de criação, manejo da alimentação, vacinas, tipo de reprodução, descarte e reposição dos bovinos, utilização de pool de colostro.
3. Manejo da vaca gestante e parto	Tipo de maternidade pré-parto, condição das vacas no parto.
4. Alterações reprodutivas	Ocorrência de problemas reprodutivos (aborto, nascimento de crias fracas, distocia, retenção de placenta, repetição de cio, entre outros) e manejo das vacas que abortaram e do feto abortado.
5. Manejo sanitário	Assistência veterinária, manejo de carcaças, características de criação dos cães na fazenda (hábitos alimentares e manejo sanitário).
6. Parâmetros reprodutivos	Taxa de natalidade, intervalo entre partos, número de dose de sêmem/concepção, peso e idade a primeira cobrição.
7. Percepção sobre a neosporose bovina	Conhecimentos gerais sobre a doença.

4.3 Sorologia

Para o diagnóstico, foi realizada a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), técnica sorológica considerada “padrão ouro” para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos. A RIFI foi realizada conforme técnica descrita por Paré, Hietala e Thurmond (1995), utilizando como antígeno lâminas de vidro com taquizoítos de *N. caninum* (Laboratório Imunodot, Jaboticabal, SP, Brasil) e conjugado anti-IgG caprino (SIGMA, St. Louis, MO, USA) na diluição de 1:50. Controles positivo e negativo foram utilizados em cada lâmina. Foram considerados positivos (*cut off*) os soros que apresentaram título na diluição 1:200 e com completa fluorescência da superfície dos taquizoítos (DUBEY, 1999).

4.4 Análises estatísticas

4.4.1 Análise univariada

Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do pacote estatístico PASW 18.0. Para traçar o perfil dos produtores e os modos de produção leiteira em Minas Gerais, foi feita a análise descritiva das principais variáveis levantadas.

Visando à aplicação da estatística indutiva, a maior parte das questões abertas foi categorizada e, assim como a maioria das fechadas, transformada em dicotômicas. Além disso, como quase a totalidade das fazendas apresentou pelo menos um bovino soropositivo a *N. caninum*, optou-se por categorizar as fazendas de acordo com a prevalência do agente parasitário em cada propriedade. Assim, os rebanhos foram categorizados de acordo com a

percentagem de bovinos infectados por *N. caninum*: i. até 20% e ii. mais de 20% de vacas soropositivas, para viabilizar a comparação das variáveis quantitativas em nível de fazenda entre os dois perfis sorológicos categorizados. Essa categorização foi baseada na prevalência média encontrada no presente estudo.

Assim, inicialmente, foram aplicados os testes de normalidade de Kolgomorov-Smirnov e de homocedasticidade de Levene nas variáveis métricas do estudo. Entre as variáveis que apresentavam normalidade e homocedasticidade (variáveis independentes), foi aplicado o teste paramétrico t de Student para amostras independentes, para a comparação das médias destas variáveis entre fazendas menos (até 20% do rebanho) ou mais (mais que 20% rebanho) soropositivas (variável dependente). A mesma variável dependente foi utilizada entre as variáveis que não apresentaram distribuição normal, sendo o teste de Mann-Whitney aplicado nestes casos. Além disso, as médias de soroprevalência em cada rebanho (variável independente) também foram testadas por meio do teste t de Student, entre as principais variáveis qualitativas (dependentes) presentes no estudo.

4.4.2 Análise múltipla

4.4.2.1 Regressão logística

Para identificar os fatores associados à infecção por *N. caninum* entre animais foi realizada a análise estatística, utilizando-se os resultados sorológicos obtidos por meio da RIFI como variável dependente e as variáveis em nível de animal (relativas a cada animal) coletadas nas entrevistas como variáveis independentes, sendo aquelas relacionadas ao histórico de ocorrência de aborto e outros problemas reprodutivos em cada animal.

Assim, a variável dependente foi transformada em dicotômica (0-negativo; 1-positivo) e foi feita a análise univariada por meio do teste de qui-quadrado (χ^2). As variáveis que mostraram associação com $p < 0,02$, pelo teste de χ^2 ou exato de Fischer (menos de cinco observações em pelo menos uma célula da tabela de contingência), foram selecionadas para a construção do modelo múltiplo. Foi calculado o risco por meio da *Odds Ratio* ajustada e seu intervalo de confiança, a 95%, para aquela variável que apresentou associação significativa ($p < 0,05$) na regressão logística.

Já a existência de associação entre possíveis fatores de risco em nível de rebanho (coletadas por meio de entrevista) e a soroprevalência, foi verificada por meio do modelo múltiplo *generalized estimating equations* (GEE) de regressão logística. Esta análise é mais adequada em situações em que se observa a ocorrência de dados correlacionados, ou seja, na situação do presente estudo, vacas de uma mesma fazenda (HANLEY et al., 2003), considerando cada fazenda como um sujeito e cada bovino um caso. A análise GEE permite a avaliação de associação de múltiplos animais, considerando a fazenda em que eram criados no modelo, assumindo que os casos são dependentes dentro cada sujeito e independentes entre sujeitos. Assim, foi aplicado o teste de qui-quadrado, tendo aquelas variáveis que apresentaram associação com $p \leq 0,2$ sido adicionadas ao modelo múltiplo da regressão logística GEE. Não foram discutidos neste trabalho efeitos de modificação de variáveis sobre outras e nem testadas possíveis interações entre elas. Para todas as variáveis presentes no modelo final ($p < 0,05$), foi calculado o risco por meio da *Odds Ratio* ajustada e seu intervalo de confiança, a 95%.

4.4.2.2 *Categorical principal component analysis (CATPCA)*

Para resumir as informações presentes nas variáveis: i. ocorrência de abortos repetidos (Abortorepdico3): 1. não, 2. sim; ii. taxa de ocorrência de aborto (taxaabortomais1): numérica contínua; iii. destino da placenta (placentadico2): 1. enterrada, 2. não enterrada; iv. tipo de leite produzido (tipoleite): 1. A, 2. B, 3. cru refrigerado; v. produção de bovinos de raças mestiças (mestiço): 1. não, 2. sim e vi. forma de criação das vacas em lactação (criaçãovaca): 1. sistema intensivo, 2. sistema semi-intensivo e 3. sistema extensivo em componentes principais, além de permitir a identificação de grupos de indivíduos e identificar as variáveis que identificam cada grupo, foi feita a análise exploratória *categorical principal component analysis (CATPCA)*. Esta análise se baseia em um recurso designado por *optimal scaling*, que atribui quantificações numéricas às categorias de cada uma das variáveis qualitativas, permitindo, dessa forma, a aplicação da análise de componentes principais entre dados qualitativos (MAROCO, 2007). Assim, o modelo final de CATPCA apresentado neste estudo foi encontrado baseando-se em critérios de seleção das variáveis de interesse que, juntas, explicassem uma proporção considerável da informação presente e no α de Cronbach, como medida de consistência interna de cada fator e do modelo em geral. Foram retidos componentes com valores próprios superiores a 1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Soroprevalência

De 1.204 amostras de soros bovino, 19,4% (I. C. 95%= 17,2-21,8) (234/1204) apresentaram anticorpos anti-*N. caninum*, detectados pela RIFI. Do total de propriedades testadas, em 95,0% (I. C. 95%= 83,1-99,4) (38/40) foi identificado pelo menos um bovino reagente a *N. caninum*.

A observação que aproximadamente 20% de bovinos infectados a presença do agente em 95% das propriedades demonstra a alta disseminação de *N. caninum* entre rebanhos leiteiros no sul de Minas Gerais. Associada a esses aspectos, a dificuldade de se estabelecer vacinação e tratamento eficazes, além das altas taxas de transmissão transplacentária endógena (DUBEY; SCHARES; 2011; MOORE et al., 2009), eleva ainda mais a importância da presença do parasito entre os bovinos leiteiros no estado, uma vez que o controle da neosporose passa pelo descarte seletivo dos animais soropositivos do rebanho (HASLER et al., 2006), o que levaria a grandes prejuízos econômicos.

A prevalência global observada entre animais está próxima de outras investigações sorológicas realizadas no país entre vacas leiteiras com o mesmo teste e ponto de corte utilizados (RIFI 1:200). Em Minas Gerais, foram encontrados 16,8% das vacas sororreativas a *N. caninum* (COSTA et al., 2001); em São Paulo, 15,9% (SARTOR et al., 2003) e, no Rio Grande do Sul, 17,8% (COBERLLINI et al., 2006). Também utilizando a mesma categoria animal e técnicas laboratoriais, em Minas Gerais foi observada uma frequência do parasito de 97,2% (GUEDES et al., 2008), bem acima do verificado no presente estudo, assim como no Maranhão, onde 50,7% das vacas avaliadas eram soropositivas a *N. caninum*. Utilizando a RIFI (1:200), porém, entre bezerras e

novilhas, Santos et al. (2009) encontraram soroprevalência de 46,3% em Minas Gerais. É importante ressaltar que, assim como descrito por Coberllini et al. (2006), diversos fatores, muitos difíceis de mensurar, como práticas de higiene, tamanho das fazendas, sistema de criação, presença de cães e de outros animais, e práticas de descarte seletivo, podem influenciar os resultados obtidos em diferentes estudos.

É importante ressaltar que diferenças nas técnicas sorológicas e títulos utilizados na diluição do soro sanguíneo são fatores importantes a serem avaliados, ao se comparar resultados de diferentes estudos soroepidemiológicos. A falta de padronização para a investigação sorológica leva à utilização de diferentes técnicas entre autores, o que pode levar a diferenças nos resultados obtidos.

Assim, em diversos trabalhos realizados no Brasil, por meio do ELISA ou mesmo RIFI, com títulos menores que 1:200, entre vacas leiteiras, foram encontradas soroprevalências variáveis. Em Minas Gerais, Ragozo et al. (2003) encontraram 34,4% (RIFI 1:25) de animais sororreativos. Em São Paulo, Ragozo et al. (2003) e Sartor et al. (2003) observaram 27,3 % 15,9%, respectivamente. No estado do Rio de Janeiro, Munhoz et al. (2009) verificaram que 23,3% (ELISA – IDEXX) das vacas leiteiras apresentavam anticorpos anti-*N. caninum*, enquanto, no Paraná, Ragozo et al. (2003) encontraram 21,3% (RIFI 1:25) e, no Mato Grosso do Sul, Oshiro et al. (2007) observaram 14,9% (RIFI 1:50) das vacas soropositivas. Já na região norte do país, Aguiar et al. (2006) e Minervino et al. (2008) encontraram 8,8% (RIFI 1:25) e 17,5% (RIFI 1:100) dos animais soropositivos ao *N. caninum*.

5.2 Perfil das propriedades leiteiras

Quase todas as variáveis quantitativas avaliadas neste estudo não apresentaram distribuição normal de dados e, assim, foram utilizados a mediana e os quartis como medidas de tendência central e dispersão, respectivamente. Para as demais (número de vacas secas e galinhas criadas, quantidade de litros de leite/vaca produzidos, taxa de natalidade e intervalo entre partos), foram utilizados a média e o desvio padrão como medidas de tendência central e dispersão, respectivamente (Tabela 3).

Neste estudo, as fazendas apresentavam a área total mediana de 110 ha (Q1=47,0; Q3=270,0), sendo a área destinada exclusivamente à produção leiteira (área de currais, sala de ordenha e pastos) de 20 ha (Q1=7; Q3=75). As propriedades apresentaram uma mediana de 82 vacas em produção (secas + lactação) (Q1=50,5; Q3=148,75) e 62 em lactação (Q1=40; Q3=120). Verificou-se que estas vacas apresentaram produção média de $20 \pm 7,4$ litros de leite/cabeça, o que representou a produção mediana de 1.350 litros de leite/dia (Q1=562,5; Q3=2287,5), indicando que as fazendas avaliadas neste estudo apresentaram produção elevada, acima da média observada entre os estabelecimentos produtores de leite no Brasil (41 litros/dia) e em Minas Gerais (69 litros/dia) (IBGE, 2012a). Isso ocorreu em função do fator de inclusão adotado neste trabalho (produção mínima de 350 litros de leite/dia na fazenda) para seleção das propriedades investigadas.

Em relação às fazendas que criavam outros animais além dos bovinos, foram observadas medianas de cinco cães (Q1= 3; Q3= 6) e sete suínos (Q1= 3,5; Q3= 14,5) e média de 473 galinhas entre as propriedades (1867,9). Os valores podem ser considerados expressivos, uma vez que a presença desses animais constitui potencial fator de risco para a neosporose bovina, pois aumenta

a probabilidade de exposição do bovino, principal hospedeiro intermediário, a *N. caninum*. O cão constitui o único hospedeiro definitivo do parasito comprovado presente no Brasil até o momento e as aves e os suínos potenciais hospedeiros intermediários, com capacidade de infectar os cães, predispondo, assim, à infecção horizontal desse protozoário entre os bovinos.

Tabela 3. Variáveis quantitativas relacionadas ao efetivo bovino e produção leiteira avaliadas entre 40 propriedades leiteiras com menor ou maior frequência de vacas soropositivas (+) a *N. caninum* (RIFI 1:200), Minas Gerais.

Variável*		Geral	Até 20% +	Mais de 20% +
Área total da fazenda		110,0 (Q1=47,0; Q3=270,0)	118,5 (Q1=54,0; Q3=292,5)	80,0 (Q1=30,0; Q3=210,0)
Área para produção de leite		20 (Q1=7; Q3=75)	29 (Q1=7,8; Q3=80)	15 (Q1=6; Q3=50)
Efetivo de trabalhadores	Permanentes	3 (Q1=2; Q3=5)	3 (Q1=2; Q3=5,5)	4 (Q1=3; Q3=5)
	Temporários	0 (Q1=0; Q3=0)	0 (Q1=0; Q3=0)	0 (Q1=0; Q3=1)
Lactação		62 (Q1=40; Q3=120)	58 (Q1=34,8; Q3=132,3)	70 (Q1=46; Q3=120)
Secas		18,6 (12,1)	17,6 (11,7)	20,1 (14,0)
Efetivo bovino	Novilhas	38,5 (Q1=14,8; Q3=50)	32 (Q1=16,3; Q3=48,5)	40 (Q1=13,8; Q3=58,5)
	Bezerras	32,5 (Q1=15; Q3=50)	35 (Q1=15; Q3=52,5)	30 (Q1=18; Q3=40)
	Touros	2 (Q1=1; Q3=3)	1 (Q1=1; Q3=2,5)	2 (Q1=1; Q3=3)
	Cães	5 (Q1=3; Q3=6)	5 (Q1=3; Q3=6)	4 (Q1=2,3; Q3=5,8)
Efetivo criação	Galinhas	473 (1867,9)	626,2 (2190)	71,3 (55,5)
	Suínos	7 (Q1=3,5; Q3=14,5)	7 (Q1=4; Q3=15)	8,5 (Q1=2,75; Q3=135,5)
Produção leiteira	Leite/dia	1350 (Q1=562,5; Q3=2287,5)	1300 (Q1=525; Q3=2550)	1500 (Q1=950; Q3=2250)
	Leite/vaca	20 (7,4)	20 (8,2)	19,9 (6,0)
	Leite/ha	4414,6 (Q1=1825; Q3=11932,7)	4106,3 (Q1=1166; Q3=11698,7)	5018,8 (Q1=2588,4; Q3=20277,8)
Contagem de células somáticas (CCS)		400 (Q1=234; Q3=600)	400 (Q1=223,5; Q3=600)	365 (Q1=213; Q3=525)

*Nenhuma variável apresentou $p < 0,05$ entre fazendas com menos ou mais de 20% de vacas soropositivas a *N. caninum*.

Considerando os índices produtivos e reprodutivos (Tabela 4), os rebanhos com menor idade ao primeiro parto apresentavam mais animais soropositivos ($p < 0,05$). Isso pode estar relacionado ao sistema de criação mais intensivo a partir de gado de raças puras adotado na maior parte das fazendas cujo rebanho é mais soropositivo. Esse sistema mais intensivo de criação, possivelmente, está associado a um manejo nutricional melhor, o que eleva mais rapidamente o peso dos animais, diminuindo assim a idade ao primeiro parto das novilhas.

Tabela 4. Variáveis quantitativas relacionadas aos índices produtivos e reprodutivos avaliadas entre 40 propriedades leiteiras com menor ou maior frequência de vacas soropositivas (+) a *N. caninum* (RIFI 1:200), Minas Gerais.

Variável	Geral	Até 20% +	Mais de 20% +
Dias em lactação	300 (Q1=262,5; Q3=330)	300 (Q1=210; Q3=300)	307,5 (Q1=277,5; Q3=368,8)
Taxa de descarte de vacas	14,3 (Q1=7,7; Q3=18,8)	14,3 (Q1=8,1; Q3=19,4)	15 (Q1=7,7; Q3=18,9)
Taxa de aborto	4,0 (Q1=2,3; Q3=6,7)	3,4 (Q1=2,3; Q3=7,0)	4,1 (Q1=2,1; Q3=5,7)
Taxa mortalidade de bezerros	8 (Q1=4; Q3=15)	8,3 (Q1=5,5; Q3=17,2)	7,5 (Q1=2,9; Q3=13,5)
Taxa natalidade	66,0 (20,1)	68,4 (19,2)	62,3 (21,5)
Intervalo entre partos	12,8 (2,0)	12,9 (2,0)	12,5 (1,9)
Nº de doses de sêmen para concepção	2,5 (Q1=2; Q3=3,3)	2,3 (Q1=2; Q3=3,4)	2,5 (Q1=1,6; Q3=3,3)
Idade a primeira cobrição/inseminação	18 (Q1=15; Q3=24)	18 (Q1=16; Q3=24)	15 (Q1=14; Q3=20)
Peso a primeira cobrição/inseminação	350 (Q1=350; Q3=360)	350 (Q1=330; Q3=360)	350 (Q1=350; Q3=352,5)
Idade ao primeiro parto*	27 (Q1=24; Q3=33)	30 (Q1=25; Q3=33)	24 (Q1=21; Q3=27)

*Variável com $p < 0,05$, pelo teste de Mann-Whitney, entre fazendas com menos ou mais de 20% de vacas soropositivas ao *N. caninum*.

A maioria das propriedades visitadas nesse estudo se caracterizou por apresentar a atividade leiteira como única fonte de renda (55%), produzir leite cru refrigerado (52,5%) e criar gado mestiço (51,3%). Além disso, estes produtores, em sua maioria, estão na propriedade há mais de 20 anos produzindo leite (51,3%), e os trabalhadores que lidam com os bovinos apresentam apenas a instrução mínima, ou seja, até a 4ª série do ensino fundamental (65,0%). Apesar disso, foi observado que, na maioria das fazendas (60,0%), os bovinos eram criados em sistema semi-intensivo de criação e realizadas duas ordenhas por dia (87,5%), em sistema mecânico canalizado (72,5%). Predomina a utilização da inseminação artificial (65,0%) como principal método de reprodução dos bovinos leiteiros.

Assim, em relação a esses dados, observa-se que a produção de leite constitui uma atividade de grande importância econômica, em constante evolução na região estudada, pois, além de ser manter como única fonte de renda há mais de 20 anos na maioria das fazendas, indicadores de tecnificação das propriedades, como o uso de inseminação artificial e a ordenha do tipo mecânica canalizada, estão presentes. Na maior parte das fazendas (72,5%) eram utilizadas aguadas naturais como principal fonte de água e todas produziam silagem em silo do tipo trincheira (Tabela 5).

Tabela 5. Variáveis qualitativas relacionadas ao sistema de produção avaliadas entre 40 propriedades leiteiras com menor ou maior frequência de vacas soropositivas (+) a *N. caninum* (RIFI 1:200), Minas Gerais.

Variável		Geral	Até 20% +	Mais de 20% +
Atividade produtiva	Somente leite	55	52	48
	Misto	45	60	40
Instrução da mão de obra	Ensino fundamental	65	72	53,3
	Ensino médio	25	16	40
	Ensino superior	10	12	6,7
Tipo de leite	A	5	4	6,6
	B	42,5	40	46,7
	Cru refrigerado	52,5	56	46,7
Tipo racial	Zebu	2,6	0	6,7
	Europeu	46,2	37,5	60
	Mestiço	51,3	62,5	33,3
Sistema de criação	Semi-intensivo	60	60	40
	Intensivo	37,5	36	60
	Extensivo	2,5	4	0
Tipo de ordenha	Mecânica canalizada	72,5	68	80
	Mecânica ao pé	27,5	32	20
Quantidade de ordenhas	Duas	87,5	84	93,3
	Três	12,5	16	6,7
	Monta natural	32,5	44	13,3
Tipo de reprodução	Inseminação artificial	65	52	80
	Transferência de embrião	2,5	4	6,7
Fonte de água	Empresa pública/poço artesiano	27,5	32	20
	Aguadas naturais	72,5	68	80
Tipo de silo	Trincheira	100	100	100

Neste estudo foi observado que a infecção por *N. caninum* está amplamente disseminada entre rebanhos de bovinos leiteiros criados em Minas Gerais (95,0%). Essa alta disseminação do parasito pode ser explicada pelo fato de que diversos potenciais fatores de risco (Tabela 6), principalmente aqueles que aumentam a exposição do hospedeiro ao *N. caninum*, estão presentes na maioria das propriedades avaliadas, como: i. problemas reprodutivos constituem o principal motivo para o descarte de vacas leiteiras (70,0%), ii. não fechamento do silo após sua utilização (75,0%), iii. divisa com outras fazendas leiteiras (67,5%), iv. presença de área de mata (90,0%), v. não destinação correta da placenta, ou seja, não são enterradas (92,5%) e vi. presença de cães domésticos (80,0%), errantes (87,5%) e criação de aves (82,5%), juntamente com a produção de bovinos leiteiros. Assim, presença de *N. caninum* entre fazendas indica que esses potenciais fatores de risco podem, de maneira individual ou conjunta, contribuir para a alta disseminação do parasito entre os rebanhos envolvidos neste estudo.

Por outro lado, potenciais fatores de proteção, que podem reduzir a ocorrência da neosporose, também estão presentes na maioria das fazendas em questão, conforme relatado pelos produtores: i. não compram bovinos para reprodução (59,3%), ii. não utilizam *pool* de colostro na alimentação de bezerros (57,5%), iii. fazem destinação correta dos fetos abortados (52,6%) e bezerros e vacas mortas são enterrados/queimados (53,8%), iv. não há criação de suínos (60,0%) ou v. presença de canídeos silvestres (76,5%) na maioria das propriedades.

Tabela 6. Variáveis qualitativas relacionadas às características sanitárias avaliadas entre 40 propriedades leiteiras com menor ou maior frequência de vacas soropositivas (+) a *N. caninum* (RIFI 1:200), Minas Gerais.

Variável		Geral	Até 20% +	Mais de 20% +
Motivo de descarte de vacas	Reprodução	70	72	66,6
	Outros	30	28	33,4
	Sim	40,7	35,3	50
Compram bovinos para reprodução	Não	59,3	64,7	50
	Sim	67,5	72	60
Divisa com outras fazendas leiteiras	Não	32,5	28	40
	Aberto	75	78,9	69,2
Silo	Fechado	25	21,1	30,8
	Sim	42,5	48	33,3
Pool de colostro	Não	57,5	52	67,7
	Sim	90	92	86,7
Área de mata	Não	10	8	13,3
	Enterrado/queimado	52,6	50	57,1
Feto abortado	Outra	47,4	50	42,9
	Enterrado	7,5	12	0
Placenta	Outra	92,5	88	100
	Enterrado	53,8	54,2	53,3
Bezerros/vacas mortos	Outra	46,2	45,8	46,7
	Sim	80	76	86,7
Cães domésticos	Não	20	24	13,3
	Sim	82,5	88	75,3
Galinhas	Não	17,5	12	26,7
	Sim	40	30	58,3
Suínos	Não	60	69,6	41,7
	Sim	85	84	86,7
Equinos	Não	15	16	13,3
	Sim	23,5	23,8	23,1
Cães silvestres	Não	76,5	76,2	76,9
	Sim	87,5	88	86,7
Cães errantes	Não	12,5	12	13,3

No presente estudo foi observado que as medidas de manejo sanitário estão diretamente ligadas à ocorrência de *N. caninum* em rebanhos leiteiros (Tabela 7). Isso ocorre porque a susceptibilidade de diversos hospedeiros intermediários favorece uma maior exposição, devido à existência de vários mecanismos que possibilitam a disseminação da doença. Por exemplo, a presença de restos de tecidos de fetos abortados, animais mortos ou placentas constituem fontes de infecção do agente para os hospedeiros definitivos (cães) (CAVALCANTE et al., 2011) que, posteriormente, podem contaminar o ambiente com oocistos eliminados nas fezes.

Esta análise está coerente com o resultado do presente estudo, pois foi verificado que o correto descarte de restos placentários está relacionado a uma menor soropositividade entre as vacas de rebanhos leiteiros avaliados. Ou seja, em fazendas cujas placentas são enterradas, observa-se menor frequência de infecção por *N. caninum* em relação às propriedades que não adotam este procedimento ($p < 0,05$). Isso ocorre porque, durante o processo de transmissão horizontal de *N. caninum*, os cães se infectam após ingerirem tecidos dos hospedeiros intermediários com presença do agente, com destaque para restos placentários e tecidos nervosos de fetos abortados. Uma vez infectados, os cães passam a eliminar, de maneira intermitente, oocistos nas fezes, podendo, dessa forma, infectar os bovinos (BASSO et al., 2010). Esse resultado evidencia que medidas gerais de biossegurança, como a correta destinação de restos placentários, visando não permitir o acesso dos cães a estes tecidos, assim como fontes de água e alimento dos bovinos, são ações fundamentais no controle da neosporose bovina em rebanhos leiteiros.

Além disso, foi observado que, naquelas fazendas cujos produtores relataram a ocorrência de abortos repetidos, houve maior frequência de animais soropositivos a *N. caninum* em relação a propriedades que não têm este mesmo tipo de problema ($p < 0,05$). Também foi verificado que rebanhos cujos

produtores buscam diagnóstico laboratorial do aborto apresentam maior frequência de animais soropositivos ao parasito em relação aos proprietários que não adotam esse procedimento ($p < 0,05$). É provável que isso ocorra em função do fato de que rebanhos mais infectados por *N. caninum* apresentam maiores problemas com aborto causado pelo parasito, o que estimula os produtores a buscarem o diagnóstico laboratorial em maior proporção, visando diminuir a ocorrência dessa alteração reprodutiva na propriedade. Segundo Dubey, Schares e Ortega-Mora (2007), o diagnóstico laboratorial do aborto é importante no controle da neosporose.

Tabela 7. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)^{*} na soropositividade de vacas leiteiras a *N. caninum* (RIFI 1:200), para todas as variáveis testadas entre 40 fazendas produtoras de leite em Minas Gerais.

Variável		Média (%) ± desvio padrão	Valor de p [*]
Realiza diagnóstico do aborto	Sim	31,1±7,7	0,028
	Não	17,7±12,6	
Destino da placenta	Enterrada	4,4±7,7	0,031
	Não enterrada	20,7±12,2	
Ocorrência de abortos repetidos	Sim	26,0±13,9	0,006
	Não	14,5±10,0	

*Teste t de student.

Quanto à percepção sobre a neosporose bovina, foi verificado, neste estudo, que a maioria dos entrevistados já tinha ouvido falar desta doença (62,5%), para os quais a principal fonte de informação foi o médico veterinário (50%). Apesar disso, a maioria não se considerava bem informada (57,1%), mesmo que 94,4% tenham respondido o aborto, quando questionados sobre o que a neosporose causa nos bovinos. A maioria dos entrevistados relatou acreditar que essa doença já tenha ocorrido na propriedade (70%). Esses resultados indicam que, apesar de

os produtores acreditarem que a neosporose está presente na propriedade, como potencial causadora de abortos e, conseqüentemente, prejuízos à sua produção, uma parte considerável ainda desconhece os outros aspectos importantes dessa doença.

A neosporose é considerada uma enfermidade parasitária de descoberta relativamente recente (KAMGA-WALADJO et al., 2010; WILLIAMS et al., 2009), fato que associado à baixa ocorrência de busca por diagnóstico laboratorial na maioria dos casos de aborto, em fazendas leiteiras, como observado no presente estudo, possivelmente gera o desconhecimento, de grande parte dos produtores de leite no estado, sobre o *N. caninum*. Essa característica certamente está associada a uma maior dificuldade em controlar a doença em vacas leiteiras em Minas Gerais.

5.3 Fatores de risco

De acordo com os resultados das análises de regressão logística, no nível individual, foi observado que a infecção por *N. caninum* se configura como importante causa de alterações reprodutivas em vacas leiteiras. Assim, foi verificado que a soropositividade a *N. caninum* é fator de risco para a ocorrência de aborto ($p= 0,004$; $OR= 1,978$; $IC\ 95\%= 1,249-3,131$), sendo que vacas reagentes apresentam quase duas vezes mais chances de abortar que as soronegativas (Tabela 8). Considerando a ocorrência do aborto de maneira numérica não dicotômica (quantas vezes o animal já abortou), também por meio da regressão logística, foi observado que, cada vez que a vaca aborta, aumenta em quase duas vezes a chance de esse animal ser soropositivo a *N. caninum* ($p= 0,002$; $OR= 1,676$; $IC\ 95\%= 1,215-2,312$).

Tabela 8. Alterações reprodutivas entre vacas leiteiras provenientes de 40 propriedades leiteiras de acordo com o status sorológico para *N. caninum* (RIFI 1:200), Minas Gerais.

Variável	n	Geral	Status sorológico		Valor de p*	Odds ratio	IC (95%)
			Positivo	Negativo			
Ocorrência de aborto*	Sim	106	8,8	13,7	0,004	1,978	1,249-3,131
	Não	1098	91,2	86,3			
Outros problemas reprodutivos**	Sim	208	17,7	19,0	-	-	-
	Não	966	82,3	81,0			

*Regressão logística. **Não adicionado no modelo de regressão logística ($p > 0,05$ pelo teste de qui-quadrado).

Entre rebanhos, principalmente as variáveis relativas à ocorrência de problemas reprodutivos foram significativas nos modelos múltiplos de regressão logística GEE. A ocorrência de repetição de cio ($p = 0,02$; OR= 3,84; IC 95%= 1,239-11,893), abortos repetidos ($p = 0,001$; OR= 2,54; IC 95%= 1,423-5,402) e anestro temporário ($p = 0,001$; OR= 3,44; IC 95%= 1,976-5,994) se mostrou associada à infecção por *N. caninum* (Tabela 9).

Segundo Almeria et al. (2010), o mecanismo preciso pelo qual ocorre aborto em infecções por *N. caninum* é parcialmente conhecido. De acordo com estes mesmos autores, o aborto constitui o sinal clínico mais importante e evidente em vacas adultas, podendo ocorrer em qualquer fase da gestação, porém, sendo mais frequente na sua segunda metade (ALMERIA et al., 2010; DUBEY; SCHARES, 2011). No presente estudo, a época de ocorrência do aborto não se mostrou associada à ocorrência do *N. caninum*, porém, o parasito confirmou seu papel como causador dessa importante alteração reprodutiva em bovinos.

De fato, a interrupção da gestação ocorre quando as lesões causadas pela proliferação do parasito na placenta ou no feto tornam a gestação inviável. Além do aborto, em casos de neosporose pode ocorrer uma série de outras alterações

reprodutivas, com destaque para a absorção embrionária (DUBEY; SCHARES, 2011).

A repetição de cio causada pelo *N. caninum* ocorre, principalmente, quando a transmissão transplacentária endógena ou exógena ocorre logo no início da gestação, levando à morte e à absorção embrionária. Quando ocorre, a vaca que havia entrado em anestro gestacional volta a apresentar cio. Kamga-Waladjo et al. (2010), em estudo realizado na África, observaram que vacas leiteiras soropositivas para *N. caninum* apresentam piores índices reprodutivos relativos ao número de inseminações necessárias para a concepção e o intervalo entre partos, em comparação as soronegativas, provavelmente em função da perda embrionária logo no início da gestação.

Embora, no presente estudo, não tenha sido observada esta mesma relação entre soropositividade e índices reprodutivos, os resultados obtidos pelos autores citados indicam que, nas condições em questão, a repetição de cio pode causar graves prejuízos aos produtores, em função de possíveis alterações nos índices reprodutivos das vacas, em razão da absorção embrionária.

Entretanto, segundo Dubey, Schares e Ortega-Mora (2007) e Pabón et al. (2007), apenas uma pequena proporção das vacas repete o aborto devido à neosporose. Porém, neste estudo, observou-se associação entre *N. caninum* e abortos repetidos em bovinos leiteiros. Ou seja, nas condições deste estudo, os achados permitem sugerir que *N. caninum* é um dos responsáveis pelo aborto, além de predispor o animal a abortar novamente durante sua vida reprodutiva. Como já discutido anteriormente, uma série de mecanismos, ainda pouco elucidados, está relacionada à ocorrência do aborto (ALMERIA et al., 2010). Mas, de fato, *N. caninum* é um parasito que mantém uma infecção crônica, sob a forma de bradizoítos presentes em cistos teciduais dos hospedeiros intermediários. Segundo Williams et al. (2009) e Almeria et al. (2010), vacas já expostas ao *N. caninum* desenvolvem imunidade frente à transmissão horizontal,

mas não são capazes de evitar o recrudescimento da doença durante a gestação. Isso significa que o sistema imune de vacas persistentemente infectadas, apesar de ser capaz de resistir ao desafio da transmissão exógena, não é suficiente para proteger o feto, impedindo a transmissão transplacentária endógena, permitindo, assim, a ocorrência de abortos repetidos ao longo da sua vida reprodutiva.

Esses resultados evidenciam que *N. caninum* se configura como um importante problema reprodutivo em bovinos leiteiros, por causar não só o aborto, como já verificado em outros estudos (GHALMI et al., 2012; LOPEZ-GATIUS et al., 2004; MORÉ et al., 2009; WILLIANS et al., 2009), mas também devido à repetição de cio e anestro temporário, confirmando a importância do controle da neosporose bovina como meio de diminuir as perdas econômicas em rebanhos leiteiros.

Em diversos trabalhos há relatos de que o risco de infecção dos hospedeiros susceptíveis aumenta quando diferentes espécies que participam do mesmo ciclo de vida de um agente convivem no mesmo ambiente, em contato direto ou indireto. Porém, no presente estudo, a presença de cães ou canídeos silvestres, assim como de potenciais hospedeiros intermediários, como suínos e aves (DARWICH et al., 2012; GONDIM et al., 2010; MARTINS; KWOK; DUBEY, 2011), que poderiam atuar com fontes de infecção aos cães e destes aos bovinos, não constituiu fatores de risco à infecção de *N. caninum*.

Em estudo realizado por Vanleeuwen et al. (2010), entre bovinos leiteiros no Canadá, os fatores de risco estão associados à presença de cães, principalmente em propriedades rurais onde foi relatada ocorrência de sinais clínicos da neosporose. Neste mesmo estudo, foi verificado que, independente de os cães se alimentarem ou não de restos de placentas ou fetos abortados, sua presença constitui um fator de risco à ocorrência da neosporose. Isso corrobora os resultados de Corbellini et al. (2006) que, ao contrário do presente estudo, em que não foi observada esta relação, vacas de fazendas com áreas menores

apresentavam maiores chances de serem soropositivas, se comparadas a vacas de propriedades maiores. Segundo Corbellini et al. (2006), em fazendas menores, o cão tem maior contato com as vacas e, assim, maior chance de se infectar e, conseqüentemente, contaminar o ambiente com oocistos eliminados nas fezes, aumentando o risco de transmissão horizontal. De acordo com Corbellini et al. (2006), para cada cão presente na propriedade, aumenta, em 1,13 vez, a chance de o bovino ser infectado por *N. caninum*.

Outros autores já relataram a relação de risco existente entre canídeos e soroprevalência a *N. caninum* (GHALMI et al., 2012; HOBSON et al., 2005; OTRANTO et al., 2003). Por outro lado, Aguiar et al. (2006) observaram ausência desta relação de risco entre a presença de cães nas propriedades e a taxa de soropositividade para *N. caninum* em rebanhos bovinos, na região amazônica.

Embora no presente estudo nem a presença e nem o número de cães criados nas fazendas tenham se mostrado associados à infecção por *N. caninum*, foi observado que, quando estão presentes, se criados soltos ($p=0,041$; $OR=2,20$; $IC\ 95\%=1,033-4,672$) e alimentados com carne crua ($p=0,001$; $OR=1,91$; $IC\ 95\%=1,443-2,519$), estes animais constituem um fator de risco à infecção deste agente para os bovinos. Ou seja, os cães, se criados nas condições citadas, aumentam em aproximadamente duas vezes a probabilidade de as vacas leiteiras serem soropositivas a *N. caninum* (Tabela 9). Isso se deve ao fato de uma maior probabilidade dos cães das fazendas se infectarem ao consumirem tecidos crus dos hospedeiros intermediários com cistos teciduais contendo bradizoítos. Assim, após se infectarem, os cães podem transmitir o parasito aos bovinos presentes na fazenda, pois, sendo criados soltos, aumentam as chances de eliminar oocistos nas fezes e contaminar água e alimentos destinados aos bovinos (GHALMI et al., 2012).

Assim como discutido por Corbellini et al. (2006), alguns autores sugerem que a via horizontal de infecção de *N. caninum* é secundária, sendo a

vertical a rota principal de transmissão deste parasito (TREES; WILLIANS, 2005). Porém, resultados discutidos por esses autores, obtidos em trabalho com vacas leiteiras no Rio Grande do Sul, são semelhantes aos observados no presente estudo. Ou seja, variáveis relacionadas à transmissão horizontal constituíram fatores de risco para a soroprevalência a *N. caninum*. Assim, cães criados soltos e alimentados com carne crua, além da destinação incorreta das placentas nas propriedades, demonstraram elevar a soropositividade das vacas, por aumentar a exposição dos bovinos a oocistos eliminados pelos cães, evidenciando, assim, a importância desse tipo de transmissão de *N. caninum* em propriedades leiteiras no estado de Minas Gerais. Segundo Corbellini et al. (2006), quanto mais hospedeiros intermediários infectados na propriedade maiores são as chances de ocorrência da transmissão horizontal do *N. caninum*, também sugerindo a importância dessa via de propagação do parasito.

Tabela 9. Resultado da análise de regressão logística múltipla estimada por *generalized estimation equations* (GEE), em relação aos fatores associados à soroprevalência por *N. caninum* (RIFI 1:200) em vacas leiteiras criadas em 40 fazendas produtoras de leite em Minas Gerais.

Fatores	N	Valor de p	Odds ratio	IC (95%)
Repetição de cio				
Não	30	0,002	1	1,239-
Sim	1174		3,84	11,893
Aborto repetido				
Não	665	0,001	1	1,423-5,402
Sim	450		2,54	
Anestro temporário				
Não	210	0,001	1	1,976-5,994
Sim	994		3,44	
Cães criados soltos				
Não	208	0,041	1	1,033-4,672
Sim	630		2,20	
Cães alimentados com carne crua				
Não	935	0,001	1	1,443-2,519
Sim	30		1,91	

5.4 Categorical principal component analysis (CATPCA)

Em relação à análise exploratória *categorical principal component analysis*, foi obtido um modelo final, do qual foram extraídos dois componentes principais que, juntos, explicam 58,3% da variância total das variáveis originais, valor que foi considerado suficiente, considerando a grande quantidade de variáveis que podem estar relacionadas à soroprevalência de *N. caninum*.

Pelos dados da tabela 10 é possível observar os pesos de cada variável nos componentes, assim como a variância explicada para cada componente e o

valor do α de Cronbach. A observação dos pesos de cada variável permite a discriminação genérica do componente 1 por manejo produtivo, pois as variáveis relacionadas aos diferentes modos de produção adicionadas no modelo se identificam claramente com este componente. São elas: i. tipo de leite produzido (0,696), ii. produção de bovinos de raças mestiças (0,756) e iii. sistema de criação das vacas em lactação (0,806). Já o componente 2 pode ser designado por aspectos reprodutivos, uma vez que as demais variáveis se identificam mais com este componente, sendo: i. ocorrência de abortos repetidos (0,609), ii. taxa de ocorrência de aborto (0,467) e iii. destino da placenta (0,619). A consistência interna do modelo foi elevada (α de Cronbach= 0,857), tendo o primeiro componente apresentado maior consistência interna que o segundo, refletindo, assim, na maior proporção da variância explicada pelo primeiro componente em relação ao segundo.

Tabela 10. Variáveis determinantes nos componentes principais extraídos após análise de *categorical principal component analysis*.

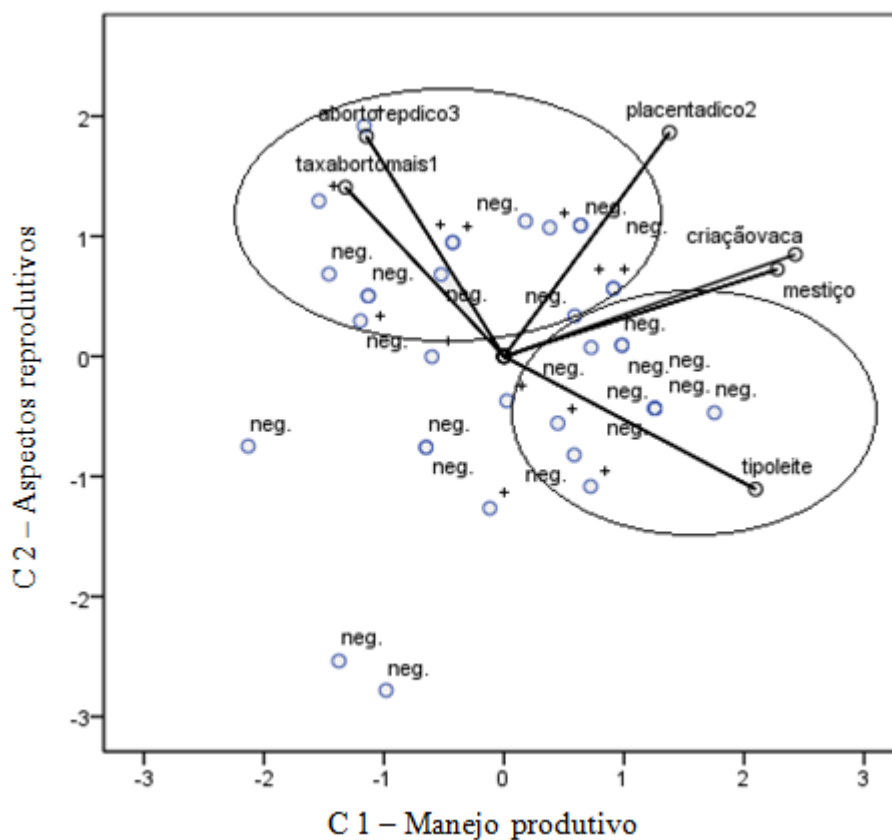
Variáveis	Componentes	
	1 Manejo produtivo	2 Aspectos reprodutivos
Ocorrência de abortos repetidos (Abortorepdico3): 1.não; 2. sim	-0,381	0,609
Taxa de ocorrência de aborto (taxaabortomais1): numérica contínua	-0,439	0,467
Destino da placenta (placentadico 2): 1. enterrada; 2. não enterrada	0,458	0,619
Tipo de leite produzido (tipoleite): 1.A; 2. B; 3. cru refrigerado	0,696	-0,367
Produção de bovinos de raças mestiças (mestiço): 1.não; 2. sim	0,756	0,241
Sistema de criação das vacas em lactação (criaçãovaca): 1.sistema intensivo; 2. sistema semi-intensivo; 3. sistema extensivo	0,806	0,282
Valor próprio	2,252	1,244
Variância explicada	37,531	20,738
A de Cronbach	0,667	0,236

Variância explicada até o segundo componente= 58,269%; α de Cronbach do modelo= 0,857

Na Figura 2 está representado o posicionamento de cada fazenda pesquisada no mapa bidimensional dos dois componentes retidos e a sua posição em relação às variáveis originais. É possível observar que uma parte

considerável das fazendas que apresentam frequência de animais soropositivos acima de 20% se distribui, principalmente, em torno das variáveis relacionadas aos aspectos reprodutivos. Ou seja, as fazendas com maior frequência de vacas soropositivas, de maneira geral, apresentam *scores* elevados no segundo componente, permitindo verificar uma tendência de aumento na taxa de aborto e ocorrência de abortos repetidos na medida em que aumenta a frequência de *N. caninum*, assim como a destinação incorreta da placenta também aumenta a taxa de positividade do parasito nos rebanhos leiteiros.

Neste estudo, foi verificado que a soroprevalência a *N. caninum* está mais relacionada com os aspectos reprodutivos e sanitários, e os aspectos produtivos (tipo de leite produzido, tipo racial e modo de criação das vacas em lactação) exercem menor influência sobre a taxa de infecção do parasito nas propriedades leiteiras em questão.



Variância explicada até o segundo componente= 58,3%

Figura 2. Posicionamento fazendas no mapa bidimensional definido pelas duas componentes principais retidas e a sua posição em relação às variáveis originais, após *categorical principal component analysis*.

Os resultados da análise exploratória de componentes principais corroboram o verificado por meio da análise dos fatores de risco associados à soroprevalência de *N. caninum*. Ou seja, *N. caninum* se configura como responsável por perdas reprodutivas em bovinos, e os aspectos sanitários, principalmente em relação à criação de cães, estão diretamente relacionados à infecção deste parasito em rebanhos leiteiros. Assim, medidas gerais de biossegurança, principalmente aquelas que restringem a transmissão horizontal

aos cães e destes aos bovinos, são necessárias no controle efetivo do *N. caninum*, visando minimizar os prejuízos causados pelo parasito em rebanhos bovinos leiteiros.

6 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado este estudo, pode-se concluir que:

- *Neospora caninum* está presente na maior parte dos rebanhos leiteiros, no estado de Minas Gerais;
- a soropositividade a *N. caninum* constitui fator de risco para a ocorrência de aborto, principalmente com recidiva ao longo da vida reprodutiva dos bovinos, além de repetição de cio e anestro temporário em vacas leiteiras;
- quando presentes nas fazendas, cães criados soltos e/ou alimentados com carne crua constituem fator de risco para infecção por *N. caninum* em bovinos oriundos de rebanhos leiteiros;
- fazendas leiteiras que não fazem uma destinação correta da placenta apresentam maior frequência de bovinos soropositivos a *N. caninum* em relação às propriedades que enterram esse tipo de material.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, D. M. et al. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 142, n. 1/2, p. 71-77, Nov. 2006.

ALMERIA, S. et al. Effects of crossbreed pregnancies on the abortion risk of *Neospora caninum*-infected dairy cows. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 163, n. 4, p. 323-329, Aug. 2009a.

ALMERIA, S. et al. Fetal death in cows experimentally infected with *Neospora caninum* at 110 days of gestation. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 169, n. 3/4, p. 304-311, May 2010.

ALMERIA, S. et al. Specific anti- *Neospora caninum* IgG1 and IgG2 antibody responses during gestation in naturally infected cattle and their relationship with gamma interferon production. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 130, n. 1/2, p. 35-42, July 2009b.

BARTELS, C. J. M. et al. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, the Netherlands, Spain and Sweden. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, n. 1/2, p. 17-27, Apr. 2006.

BASSO, W. et al. Microsatellite typing and avidity analysis suggest a common source of infection in herds with epidemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 173, n. 1/2, p. 24-31, Oct. 2010.

BJORKMAN, C. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* in gray wolves in Scandinavia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 173, n. 1/2, p. 139-142, Oct. 2010.

CANADÁ, N. et al. Prevalence of *Neospora Caninum* infection in dairy cows and its consequences for reproductive management. **Theriogenology**, Stoneham, v. 62, n. 7, p. 1229-1235, Oct. 2004.

CAVALCANTE, G. T. et al. Shedding of *Neospora Caninum* oocysts by dogs fed different tissues from naturally infected cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 179, n. 1/3, p. 220-223, June 2011.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSES. **Procedimientos para estudios de prevalencia de enfermedades cronicas en el ganado**. Buenos Aires: R. Mejia, 1973. 35 p.

CORBELLINI, L. G. et al. Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 74, n. 2/3, p. 130-141, May 2006.

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

DARWICH, L. et al. Presence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora Caninum* DNA in the brain of wild birds. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 183, n. 3/4, p. 377-381, Feb. 2012.

DUBEY, J. P. et al. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora Caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 181, n. 2/4, p. 382-387, Sept. 2011.

DUBEY, J. P. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidian. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 32, n. 8, p. 929-946, July 2002.

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

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

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals-the last five years. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 180, n. 1/2, p. 90-108, Aug. 2011.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora Caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 20, n. 2, p. 323-367, Apr. 2007.

EIRAS, C. et al. *Neospora Caninum* seroprevalence in dairy and beef cattle from the northwest region of Spain, Galicia. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 98, n. 2/3, p. 128-132, Feb. 2011.

FUCHS, N.; SONDA, S.; GOTTSTEIN, B. Differential expression of cell surface-and dense granule-associated *Neospora caninum* proteins in tachyzoites and bradyzoites. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 84, n. 4, p. 753-758, Aug. 1998.

GHALMI, F. et al. Study of the risk factors associated with *Neospora Caninum* seroprevalence in Algerian cattle populations. **Research Veterinary Science**, London, Jan. 2012. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528811005042>>. Acesso em: 13 fev. 2012.

GONDIM, L. F. P. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 159-161, Feb. 2004.

GONDIM, L. S. Q. et al. Toxoplasma gondii and *Neospora Caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 168, n. 1/2, p. 121-124, Feb. 2010.

GUEDES, M. H. P. et al. Frequência de anticorpos anti-*Neospora Caninum* em vacas e fetos provenientes de municípios do sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 189-194, out./dez. 2008.

HANLEY, A. J. et al. Statistical analysis of correlated data using generalized estimating equations: an orientation. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 157, n. 4, p. 364-375, Feb. 2003.

HASLER, B. et al. *Neospora caninum*: serological follow-up in dairy cows during pregnancy. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, n. 3/4, p. 222-230, Apr. 2006.

HEMPHILL, A. et al. Identification and characterisation of a dense granule-associated protein in *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 429-438, Mar. 1998.

HOBSON, J. C. et al. Risk factors associated with *Neospora Caninum* abortion in Ontario Holstein dairy herds. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 127, n. 3/4, p. 177-188, Feb. 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo agropecuário 2006, produção de leite**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=t&o=24&i=P&c=932>>. Acesso em: 3 fev. 2012a.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa pecuária municipal, efetivo dos rebanhos brasileiros**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp.?t=2&z=t&o=24&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1>>. Acesso em: 5 jan. 2012b.

KAMGA-WALADJO, A. R. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies and its consequences for reproductive parameters in dairy cows from Dakar-Senegal, West Africa. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 42, n. 5, p. 953-959, June 2010.

KLEIN, F. et al. *Neospora Caninum*: enquête serologique sur les avortements des bovins normands et charolais. **Le Point Veterinaire**, Milão, v. 28, n. 1, p. 1283-1286, 1997.

KRITZNER, S. et al. An explorative study to assess the efficacy of Toltrazuril-sulfone (Ponazuril) in calves experimentally infected with *Neospora caninum*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, London, v. 1, n. 4, Oct. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC149379/pdf/1476-0711-1-4.pdf>>. Acesso em: 9 fev. 2012.

LOOBUYCK, M. et al. Seroprevalence and spatial distribution of *Neospora caninum* in a population of beef cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 92, n. 1/2, p. 116-122, Nov. 2009.

LÓPEZ-GATIUS, F. et al. *Neospora*-associated abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in north-east Spain. **Journal of Veterinary Medicine. Séries B**, Berlin, v. 51, n. 7, p. 348-352, Sept. 2004.

MAROCO, J. **Análise estatística com utilização do SPSS**. 3. ed. Lisboa: SÍLABO, 2007. 822 p.

MARTINS, J.; KWOK, O. C. H.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Neospora Caninum* in free-range chickens (*Gallus domesticus*) from the Americas. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 182, n. 2/4, p. 349-351, Dec. 2011.

MCALLISTER, M. M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, Sept. 1998.

MELLO, D. P. G. et al. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora Caninum* em bovinos das microrregiões de Goiânia e Anápolis, Goiás, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 105-109, 2006.

MELLO, R. C. et al. Levantamento epidemiológico de *Neospora Caninum* em bovinos de assentamentos rurais em Corumbá, MS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 17, p. 311-316, 2008. Suplemento 1.

MELO, C. B. et al. *Neospora Caninum*: distribuição de anticorpos em três faixas etárias de rebanhos bovinos de leite em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 25, n. 2, p. 250-252, 2001.

MINERVINO, A. H. H. et al. Prevalence of *Neospora Caninum* antibodies in cattle from Santarém, Pará, Brazil. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 84, n. 2, p. 254-256, Apr. 2008.

MOORE, D. P. et al. Immune response to *Neospora Caninum* native antigens formulated with immune stimulating complexes in calves. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 175, n. 3/4, p. 245-251, Feb. 2011.

MOORE, D. P. et al. Risk factors associated with *Neospora caninum* infections in cattle in Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 161, n. 1/2, p. 122-125, Apr. 2009.

MORÉ, G. et al. Diagnosis of *Sarcocystis cruzi*, *Neospora caninum*, and *Toxoplasma gondii* infections in cattle. **Parasitology Research**, Berlin, v. 102, n. 4, p. 671-675, Mar. 2008.

MORÉ, G. et al. Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 160, n. 1/2, p. 51-54, Mar. 2009.

MUNHOZ, A. D. et al. *Neospora Caninum* seropositivity in cattle breeds in the South Fluminense Paraíba Valley, state of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 1, p. 29-32, Jan. 2009.

NASIR, A. et al. Sero-prevalence of *Neospora Caninum* and *Besnoitia besnoiti* in South Australian beef and dairy cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, Nov. 2011. Disponível em: <http://www.adelaide.edu.au/vetsci/research/pub_pop/vet_diag/17.pdf>. Acesso em: 1 fev. 2012.

OSHIRO, L. M. et al. Prevalence of anti-*Neospora Caninum* antibodies in cattle from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 133-138, July/Sept. 2007.

OTRANTO, D. et al. Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 118, n. 1/2, p. 7-18, Dec. 2003.

PABÓN, M. et al. Chronic *Neospora Caninum* infection and repeat abortion in dairy cows: a 3-year study. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 147, n. 1/2, p. 40-46, June 2007.

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

PESCADOR, C. A. et al. Histopathological and immunohistochemical aspects of *Neospora caninum* diagnosis in bovine aborted fetuses. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 150, n. 1/2, p. 159-163, Nov. 2007.

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

REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. *Neospora caninum*: how close are we to development of an efficacious vaccine that prevents abortion in cattle? **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 39, n. 11, p. 1173-1187, Sept. 2009.

REICHEL, M. P.; ROSS, G. P.; MCALLISTER, M. M. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of *Neospora caninum* infection in sheep and determination of the apparent prevalence of infection in New Zealand. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 151, n. 2/4, p. 323-326, Feb. 2008.

REITEROVA, K. et al. *Neospora caninum*, potential cause of abortions in dairy cows: the current serological follow-up in Slovakia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 159, n. 1, p. 1-6, Jan. 2009.

RINALDI, L. et al. *Neospora Caninum* in pastured cattle: determination of climatic, environmental, farm management and individual animal risk factors using remote sensing and geographical information systems. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 128, n. 3/4, p. 219-230, Mar. 2005.

ROITT, I. M.; BROSTOFF, J.; MALE, D. K. **Imunologia**. 5. ed. São Paulo: Helvética, 1999. 500 p.

ROJO-MONTEJO, S. et al. Isolation and characterization of a bovine isolate of *Neospora caninum* with low virulence. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 159, n. 1, p. 7-16, Jan. 2009.

SANTOLARIA, P. et al. Different humoral mechanisms against *Neospora Caninum* infection in purebred and crossbreed beef/dairy cattle pregnancies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 178, n. 1/2, p. 7-76, May 2011.

SANTOS, R. R. D. et al. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bezerras e novilhas de rebanhos leiteiros na microrregião de Lavras, Minas Gerais. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 10, n. 1, p. 271-280, 2009.

SANTOS, S. L. et al. Investigation of *Neospora caninum*, *Hammondia* sp., and *Toxoplasma gondii* in tissues from slaughtered beef cattle in Bahia, Brazil. **Parasitology Research**, Berlin, v. 106, n. 2, p. 457-461, Jan. 2010.

SARTOR, F. I. et al. Ocorrência de anticorpos anti- *Neospora Caninum* em bovinos leiteiros e de corte na região de Presidente Prudente, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n. 4, p. 423-418, out./dez. 2005.

SARTOR, F. I. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora Caninum* em vacas leiteiras avaliados pelo método de ELISA e RIFI no município de Avaré, SP. **Semina Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 3-10, jan./jun. 2003.

SOTIRAKI, S. et al. *Neospora caninum* infection in Greek dairy cattle herds detected by two antibody assays in individual milk samples. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 152, n. 1/2, p. 79-84, Mar. 2008.

STROHBUSCH, M. et al. *Neospora caninum* and bone marrow-derived dendritic cells: parasite survival, proliferation, and induction of cytokine expression. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 31, n. 7, p. 366-372, July 2009.

SUTEU, O. et al. First identification of *Neospora caninum* by PCR in aborted bovine fetuses in Romania. **Parasitology Research**, Berlin, v. 106, n. 3, p. 719-722, Feb. 2010.

TEIXEIRA, W. C. et al. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora Caninum* (Apicomplexa: Sarcocystidae) em bovinos leiteiros de propriedades rurais em três microrregiões no estado do Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 9, p. 729-734, set. 2010.

TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 12, p. 558-561, Dec. 2005.

VANLEEUEWEN, J. A. et al. Risk factors associated with *Neospora caninum* seropositivity in randomly sampled Canadian dairy cows and herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 93, n. 2/3, p. 129-138, Feb. 2010.

WAPENAAR, W. et al. Comparison of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 143, n. 2, p. 166-173, Jan. 2007.

WESTON, J. F.; HEUER, C.; WILLIAMSON, N. B. Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 103, n. 2/3, p. 136-144, Feb. 2012.

WILLIAMS, D. J. L. et al. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* - how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. **Parasitology**, London, v. 136, n. 14, p. 1895-1900, Dec. 2009.

WOODBINE, K. A. et al. A four year longitudinal sero-epidemiology study of *Neospora caninum* in adult cattle from 114 cattle herds in south west England: associations with age, herd and dam-offspring pairs. **BMC Veterinary Research**, London, v. 4, n. 1, p. 1-35, Sept. 2008.

YAO, L. et al. Detection of *Neospora caninum* in aborted bovine fetuses and dam blood samples by nested PCR and ELISA and seroprevalence in Beijing and Tianjin, China. **Parasitology**, London, v. 136, n. 11, p. 1251-1256, Sept. 2009.

YILDIZ, K. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle ranches with high abortion rate: special emphasis to serologic co-existence with *Toxoplasma gondii*, *Brucella abortus* and *Listeria monocytogenes*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 164, n. 2/4, p. 306-310, Oct. 2009.