

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS IGG ANTI-*NEOSPORA*
spp. EM EQUINOS NO RECÔNCAVO DA BAHIA**

Caroline Dantas Primo Marques

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2016**

**PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS IGG ANTI-NEOSPORA spp. EM
EQUINOS NO RECÔNCAVO DA BAHIA**

Caroline Dantas Primo Marques
Bacharel em Medicina Veterinária
UFRB, 2016

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal (Produção de não ruminantes)

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Moraes Pinheiro

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA

M357p

Marques, Caroline Dantas Primo.

Prevalência de anticorpos iGg anti-*Neospora* spp. em eqüinos no Recôncavo da Bahia / Caroline Dantas Primo Marques. – Cruz das Almas, BA, 2016.

61f.; il.

Orientador: Alexandre Moraes Pinheiro.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Parasitologia veterinária. 2.Doenças parasitárias. 3.Equino – Avaliação. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 636.089696

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS IGG ANTI-NEOSPORA spp. EM
EQUINOS NO RECÔNCAVO DA BAHIA**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de
Caroline Dantas Primo Marques

Aprovada em: 29 de Fevereiro de 2016

Prof. Dr. Alexandre Moraes Pinheiro
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Orientador

Prof. Dr. Fred da Silva Julião
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano
Examinador Externo

Profa. Dra. Virgínia Maria Góes da Silva
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Examinador Externo

DEDICATÓRIA

Essa é mais uma fase concretizada na minha vida e tenho a certeza que não seria possível sem a presença marcante de uma grande guerreira, que me ensinou a lutar pelos meus sonhos e ter garra para enfrentar as barreiras encontradas pelo caminho, me mostrando que com amor e dedicação tudo pode se tornar possível. A minha mãe, Edite Marques meu maior exemplo de ser humano e ao meu querido irmão, Igor Marques por me apoiar e me alegrar nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus pela proteção divina e por me permitir ter paciência e perseverança para realizar os meus objetivos;

Aos meus pais, Edite Marques e Pedro Marques e ao meu irmão Igor Marques por todo o infinito amor, carinho, apoio e compreensão concedidos a mim. Tenho imensa gratidão aos esforços dedicados para que eu alcançasse os meus sonhos. A todos os princípios aprendidos com vocês, me permitiu um ser humano melhor.

A meu companheiro Kaúli Moura por todo apoio, carinho e amor;

À minha família, pelo apoio e carinho, em especial a minha madrinha Juty;

Ao meu orientador Alexandre Pinheiro pela paciência, ensinamentos, apoio e principalmente por ter contribuído para me tornar a profissional que sou;

Aos meus queridos amigos, em especial a Lilian Ramos, Ramon Santana e Rodrigo Machado por todo apoio e ajuda durante as coletas;

Ao meu colega de profissão Éder Santos, que me permitiu o contato com os proprietários de alguns haras para a realização das minhas coletas;

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, como os proprietários que permitiram a coleta assim com os seus animais, os cavalos alvo desse estudo;

Aos queridos companheiros de Laboratório de Bioquímica e Imunologia Veterinária Cíntia, Diana, Antônio, Juliana, Kêu, Wellyson, Luciana pelos momentos de alegrias, apoio e, sobretudo pelos conhecimentos compartilhados;

Ao laboratório do Instituto de Ciência da Saúde pelo fornecimento de alguns materiais indispensáveis para o desenvolvimento do meu trabalho;

A Capes pela concessão da bolsa da Pós-graduação.

EPÍGRAFE

“O conhecimento nunca está terminado. É uma teia que vamos tecendo a partir da superação dos limites: eu respeito o limite do outro e estabeleço com ele o pacto do cuidado, ao mesmo tempo em que ambos avançamos. E arrematou: não posso negar o que o outro é e nem encarar o não saber como limite. Toda estranheza cai por terra se dividimos nossas necessidades”.

“Padre Fábio de Melo”

PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS IGG ANTI-NEOSPORA spp. EM EQUINOS NO RECÔNCAVO DA BAHIA

RESUMO: A neosporose é uma parasitose descrita pela primeira vez em meados da década de 80, é causada por um protozoário intracelular obrigatório. O *Neospora* sp. é um importante agente relatado como responsável por causar abortamentos, especialmente, em bovinos, estimando-se grandes prejuízos econômicos na pecuária. Duas espécies já foram descritas nesse gênero, o *N. caninum* que afeta uma ampla variedade de mamíferos e o *N. hughesi* isolado apenas de equinos. O conhecimento dos fatores considerados como de risco para o desenvolvimento da neosporose são cruciais para a compreensão da distribuição desse parasito. Uma vez que a prevalência de anticorpos IgG anti-*Neospora* spp. tem sido verificada mundialmente, de forma que equinos soropositivos já foram detectados em todos os continentes. O objetivo desse trabalho foi determinar a prevalência de anticorpos anti-*Neospora* spp. e relacionar os fatores de risco associados com a doença no Recôncavo da Bahia. Foram utilizadas amostras séricas de 234 equinos hípidos e sem histórico de alterações reprodutivas e neurológicas que foram submetidas à reação de imunofluorescência indireta (RIFI), os títulos variaram de 1:50 até 1:800. No ponto de corte de 1:50, foram detectados anticorpos IgG anti-*Neospora* sp. em 106 animais representando uma soropositividade de 45,30%. As amostras foram testadas em diluições dobradas até não mais apresentar reação. Verificou-se uma soropositividade no título de 1:100 de 38,03% (89/234); 21,79% (51/234) na titulação de 1:200; 4,70% (11/234) em 1:400 e apenas 0,42% (1/234) apresentou título de 1:800. Não foi verificada correlação positiva entre as variáveis estudadas e a soropositividade. Entretanto o estudo demonstrou que probabilidade de ocorrência da neosporose é mais significativa em animais abaixo de cinco anos de idade assim também em animais sem raça definida. Contudo, de acordo como os resultados encontrados nesse estudo verificou-se uma elevada prevalência de anticorpos IgG anti-*Neospora* spp. na região do recôncavo da Bahia.

PALAVRAS CHAVE: fatores de risco; *Neospora caninum*; *Neospora hughesi*; reação de imunofluorescência indireta; sorodiagnóstico

IGG ANTIBODY PREVALENCE ANTI-NEOSPORA spp. IN EQUINE IN BAHIA RECÔNCAVO

ABSTRACT: Neosporosis is a parasitic disease first described in the mid-80, which is caused by an obligate intracellular protozoan parasite. *Neospora sp.* is an important agent reported as responsible for abortions, especially in cattle, causing great economic losses in livestock. Two species have been described in this genus, *N. caninum* that affects a wide variety of mammals and *N. hughesi* isolated only in horses. Knowing the risk factors for the development of neosporosis are crucial to the study of this disease. The prevalence of anti-Neospora spp IgG antibodies was verified worldwide, indicating that seropositive horses have been found on all continents. The objective of this study was to determine the prevalence of antibodies IgG anti-Neospora spp. and list the risk factors associated with the disease in the Recôncavo da Bahia. Serum samples from 234 healthy horses without history of reproductive and neurological changes were submitted to indirect immunofluorescence test (IFAT), where titles ranged from 1:50 to 1: 800. In the cutoff 1:50 antibodies IgG anti-Neospora spp were detected in 106 (45.30%) animals. Serum samples were tested in folded dilutions up to no more reaction. There was a seropositivity of 38.03% (89/234) in titer of 1: 100; 21.79% (51/234) in the titer of 1: 200; 4.70% (11/234) in 1: 400 and 0.42% (1/234) in the 1: 800. There was no positive correlation between the study variables and seropositivity. However there was a probability of occurrence of neosporosis in animals younger than five years old as well as those cross breed. However, according to the results found in this study there was a high prevalence of antibodies IgG anti-Neospora spp. in the Recôncavo da Bahia.

KEYWORDS: indirect immunofluorescence reaction; *Neospora caninum*; *Neospora hughesi*; risk factors; serodiagnosis

LISTAS DE ABREVIATURAS

DNA – Ácido Desoxirribonucléico
ELISA – Ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática
EPM - Mieliencefalite Protozoária Equina
EUA – Estados Unidos da América
FITC – Isotiocianato de fluoresceína
HAI - Hemaglutinação passiva
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IHQ – Imuno-histoquímica
ITS1 - Espaço Interno do Transcrito 1
M - Molar
MAT- Teste de aglutinação modificado
Nc – *Neospora caninum*
PBS - Tampão Fosfato Salino
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
RIFI – Reação de Imunofluorescência indireta
SAG - Antígeno de Superfície
SNC – Sistema Nervoso Central
SDS - Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil sulfato de Sódio
SRS do ingles “SAG1 *related sequence*”
 μ l – Microlitro
 μ m – Micrômetro
mg - Miligrama
WB - *Western Blotting*.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 Taquizoitos de <i>N. caninum</i> cepa Nc-Bahia – Acervo pessoal	7
Figura 2 Cisto tecidual de <i>N. caninum</i> (DUBEY et al., 2007).	8
Figura 3 Oocistos de <i>N. caninum</i> . A – Oocisto não esporulado. B – Oocisto esporulado. Sem coloração. 400 X. (ANDREOTTI et al., 2003).....	8
Figura 4 Ciclo de vida do <i>N. caninum</i> (OSHIRO et al., 2013).	11

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1	Histórico do <i>Neospora</i> spp.....	3
2.2	<i>Neospora caninum</i>	5
2.2.1	Etiologia.....	5
2.2.2	Ciclo biológico	6
2.2.2.1	Hospedeiros do <i>N. caninum</i>	9
2.2.2.2	Formas de transmissão	9
2.3	<i>Neospora hughesi</i>	12
2.3.1	Diferença entre o <i>N. caninum</i> e o <i>N. hughesi</i>	12
2.3.2	Vias de transmissão do <i>N. hughesi</i>	13
2.4	Sinais clínicos do <i>Neospora</i> spp.....	14
2.5	Diagnóstico do <i>Neospora</i> spp.....	16
2.6	Epidemiologia do <i>Neospora</i> spp.....	18
2.7	Fatores de risco do <i>Neospora</i> spp.....	20
CAPÍTULO 1 – PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS IGG ANTI <i>NEOSPORA</i>		
<i>SP.</i> EM EQUINOS NO RECÔNCAVO DA BAHIA.....		22
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
REFERÊNCIAS.....		41
APÊNDICES		49
INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES		50

1 INTRODUÇÃO

A neosporose é uma parasitose descrita pela primeira vez em meados da década de 80. Durante certo período os casos diagnosticados eram relacionados como toxoplasmose, devido semelhança morfológica e das características referentes ao ciclo de vida dos parasitos. A diferenciação estrutural e antigênica do *Neospora caninum* foi esclarecida somente em 1988, determinando a descoberta de um novo parasito. *Neospora* spp. é intracelular obrigatório, que pertence ao filo Apicomplexa, da família Sarcocystidae, caracterizado pela capacidade de formação de cistos nos tecidos dos seus hospedeiros. Até o momento já foram descritas duas espécies desse gênero, *Neospora caninum*, que foi isolado pela primeira vez do encéfalo de cão em 1988 e o *Neospora hughesi* isolado em 1998 do cérebro e medula espinhal de um equino.

O *Neospora* spp. possui um parasitismo heteróxico são necessários hospedeiros definitivos e intermediários para completar o ciclo. Com relação aos hospedeiros definitivos do *N. caninum* têm-se descrito os cães (*Canis lupus familiaris*), os coiotes (*Canis latrans*), os dingos (cão silvestre australiano – *Canis lupus dingo*) e mais recentemente o lobo cinzento (*Canis lupus*). Diversas espécies domésticas já foram relatadas como hospedeiros intermediários incluindo os bovinos, bubalinos, equinos, caprinos, ovinos, suínos e felinos. Enquanto que os hospedeiros definitivos do *N. hughesi* não são conhecidos, sendo os equinos até então os únicos hospedeiros intermediários descritos.

O *N. caninum* tem sido mundialmente relacionado como causa de abortamentos, perdas neonatais, redução na produção de leite em bovinos. Estima-se que a neosporose nos bovinos gere grandes prejuízos econômicos na pecuária, entretanto com relação a infecção causada pelo *N. hughesi* esses dados ainda não foram estimados. A neosporose nos equinos pode ser causada por ambas as espécies do gênero e provoca sintomas semelhantes ao descritos em bovinos. No entanto, devido ao quadro de alterações neurológicas e a mieloencefalite causadas na neosporose equina, o *N. hughesi* vem sendo

descrito como um possível causador da mieloencefalite protozoária equina (EPM).

Diversas patologias relatadas em equinos prejudicam demasiadamente o agronegócio do cavalo, o que desperta uma maior atenção dos produtores a respeito de um manejo que lhes garantam uma sanidade melhor ao rebanho. Esse mercado movimenta em torno de 7,3 bilhões de reais ao ano e gera cerca de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos no setor. O plantel equino brasileiro está entre um dos maiores mundialmente, com oito milhões de animais, dos quais a maior parte concentra-se na Região Sudeste, enquanto que a Região Nordeste destaca-se pelo maior registro de asininos e muares (MAPA, 2015).

A prevalência de anticorpos IgG anti-*Neospora* spp., tem sido verificada mundialmente percebendo uma distribuição cosmopolita desse parasito, equinos soropositivos já foram detectados em diversos países, de forma que o conhecimento dos fatores considerados como de risco para o desenvolvimento da neosporose são cruciais para a compreensão dessa distribuição do parasito. Acredita-se que a idade, o clima da região, a associação de espécies que estão relacionadas com o ciclo biológico do *Neospora* spp., o tipo de alimentação e fonte hídrica são pontos críticos, uma vez que aumentam as chances de contato dos hospedeiros com o parasito, e por conseguinte a infecção.

Diante da importância da equinocultura no Brasil e a fim de conhecer a distribuição do *Neospora* spp. o objetivo desse estudo foi a identificação de anticorpos IgG anti-*Neospora* spp. em equinos na região do recôncavo da Bahia associando a sua positividade aos fatores considerados como risco para a doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico do *Neospora* spp.

A primeira observação do *Neospora caninum* aconteceu em 1984, quando Bjerkas *et al.* (1984) estudavam uma ninhada de cães da raça boxer, que apresentavam sintomas neurológicos. Os animais apresentavam lesões inflamatórias e necrose no SNC, juntamente com a paralisia dos membros posteriores, quadro incomum aos observados em animais com toxoplasmose. A sorologia pelo Teste de Sabin Feldman realizada para análise de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* e a imuno-histoquímica para avaliação da morfologia notaram que os resultados eram negativos para *T. gondii*.

O'Toole e Jeffrey (1987) relataram o caso de um bezerro recém-nascido com alterações neurológicas e encefalomielite, o qual veio a óbito no terceiro dia de vida. Contudo, com resultados negativos para toxoplasmose pela imuno-histoquímica e apresentação de diferenças estruturais aos cistos de *T. gondii*, levaram os pesquisadores a inferir que se tratava de um novo protozoário. No ano seguinte Dubey *et al.*, (1988a) o nomearam como *Neospora caninum*. Com a nova descoberta foi realizada uma reavaliação em tecidos de cães congelados, nos quais em 10 das 23 amostras testadas foram observados cistos de *N. caninum*, determinando que o diagnóstico anterior tivesse sido equivocado (DUBEY *et al.*, 1988a). Neste mesmo ano foi obtido o isolado desse coccídeo a partir do cultivo celular e do bioensaio em camundongos, permitindo a padronização do teste de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para neosporose (DUBEY *et al.*, 1988b).

A fim de melhorar o diagnóstico pesquisadores aprimoraram diversas técnicas, incluindo testes moleculares (KAUFMANN *et al.*, 1996; SPENCER *et al.*, 2000), testes imuno-histoquímicos (LINDSAY e DUBEY, 1989), ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) (BJORKMAN *et al.*, 1994) e aglutinação direta (DUBEY *et al.*, 1999a).

No Brasil o primeiro relato de neosporose foi verificado a partir de um inquérito sorológico realizado em 1996, em bovinos dos estados de São Paulo

e Mato Grosso do Sul. No estudo foi observada uma prevalência de 12,2% (BRAUTIGAM *et al.* 1996). Em 1999 foi realizado o primeiro estudo de soroprevalência no Estado da Bahia. Para este, foram utilizados soros de 447 vacas holandesas e mestiças provenientes de 14 propriedades leiteiras. Utilizou-se a RIFI como técnica de diagnóstico, considerando positivos os animais que apresentavam título de anticorpos IgG anti-*N. caninum* de 1:200. Os resultados obtidos com o estudo foi uma prevalência de 14,09%, um total de 63 animais reagentes (GONDIM *et al.*, 1999). Apenas no ano de 2000 houve o primeiro isolamento no país, obtido de um cão da raça Collie com sete anos de idade, que apresentava um quadro clínico de neuropatia, paresia dos membros posteriores e incoordenação. Para isso foi utilizado o cérebro do cão, inoculando-o em gerbis da Mongólia (*Meriones unguilatus*), eutanasiados entre três ou quatro meses de idade após o procedimento. As amostras obtidas foram usadas na inoculação de células renais de macacos que resultou na cepa Nc-Bahia (GONDIM *et al.*, 2001).

Ao final da década de 80 foi possível relacionar a neosporose como uma das causas de abortamentos em bovinos (THILSTED e DUBEY, 1989). Posteriormente foi descrita como uma das maiores causas de abortamento e doenças neonatais em diversos países (DUBEY, 2003a; BIELSA, 2004; REICHEL *et al.*, 2013).

Os estudos nos equinos foram iniciados nos Estados Unidos a partir do primeiro relato de abortamento, em que foram identificados taquizoitos de *N. caninum* no feto, o que provocou rumores da possibilidade de infecção transplacentária nos equinos (DUBEY e PORTERFIELD, 1990). Em 1998 na Califórnia, EUA, Marsh *et al.* (1998), isolaram do encéfalo e medula espinhal de um animal adulto, taquizoitos do gênero *Neospora*, entretanto as diferenças moleculares encontradas permitiram demonstrar que se tratava de outra espécie, a qual nomeou como *Neospora hughesi*. A partir disso diversos estudos epidemiológicos em equinos foram então realizados nos Estados Unidos (DUBEY e PORTERFIELD, 1990; GRAY *et al.*, 1996; LINDASY *et al.*, 1996; CHEADLE *et al.*, 1999; DUBEY *et al.*, 2001b) na França (PRONOST *et al.*, 1999; PITEL *et al.* 2003; CIARAMELLA *et al.*, 2004), na Itália (BÁRTOVÁ *et al.* 2015), Argentina (DUBEY *et al.*, 1999a) e Coreia do Sul (GRUPTA *et al.*, 2002).

Nos equinos a neosporose apresenta um quadro neurológico, cursando com uma mieloencefalite muito semelhante a que é observada na EPM. *Sarcocystis neurona* é o principal agente responsável por desenvolver a EPM, considerada uma importante doença neurológica que afeta comumente equinos na América do Norte, devido à presença dos hospedeiros definitivos nessa região (DUBEY *et al.*, 2001a). Entretanto estudos já mostram que o *N. hughesi* tem grande capacidade de desenvolver a mieloencefalite (FINNO *et al.* 2007; WOBESER *et al.* 2009; FINNO *et al.* 2010).

2.2 *Neospora caninum*

2.2.1 Etiologia

N. caninum é um protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao gênero *Neospora*, a sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidiida, família Sarcocystidae (DUBEY *et al.*, 1988a; DUBEY *et al.*, 2002; MULLER *et al.*, 2002). Até o momento duas espécies foram descritas, o *N. caninum* que foi isolado do encéfalo de cão (DUBEY *et al.*, 1988b) e o *N. hughesi* isolado de cérebro e medula espinhal de equino (MARSH *et al.*, 1998).

Estruturalmente o parasito apresenta um complexo apical formado por estruturas especializadas, organelas secretoras como as micronêmas, as roptrias e os grânulos densos. Tais estruturas são de extrema importância na invasão, multiplicação e manutenção dos taquizoitos nas células do hospedeiro, desempenhando um papel essencial no ciclo do parasito. As micronêmas são bastante numerosas e localizam-se na porção anterior dos taquizoitos. Os grânulos densos encontram-se dispersos por todo citoplasma, entretanto estão mais concentrados na porção posterior. Já as roptrias encontradas em número de 6 a 16 são homogeneamente eletrondensas, duas a quatro vezes mais espessas do que o diâmetro das micronêmas (DUBEY e LINDSAY, 1996; DUBEY *et al.*, 2002).

A presença desse complexo apical permite que *N. caninum* infecte uma variedade de tecidos corporais, como pulmões, músculos esqueléticos e cardíaco, sistema nervoso central, membranas fetais, fígado, túbulos renais, sistema cutâneo entre outros (DUBEY, 1988a; DUBEY e DE LAHUNTA, 1993; DUBEY *et al.*, 2002). Apesar de possuir a capacidade de infectar diversos tecidos, o parasito tem um tropismo em especial pelo sistema nervoso, sendo considerada a principal localização dos cistos. Consequentemente as expressões dos sinais clínicos variam de acordo com a porção afetada (DUBEY *et al.*, 2002). Essa disseminação geralmente acontece na fase aguda da infecção, e dependerá do estágio evolutivo do parasito (WOUDA *et al.*, 1997).

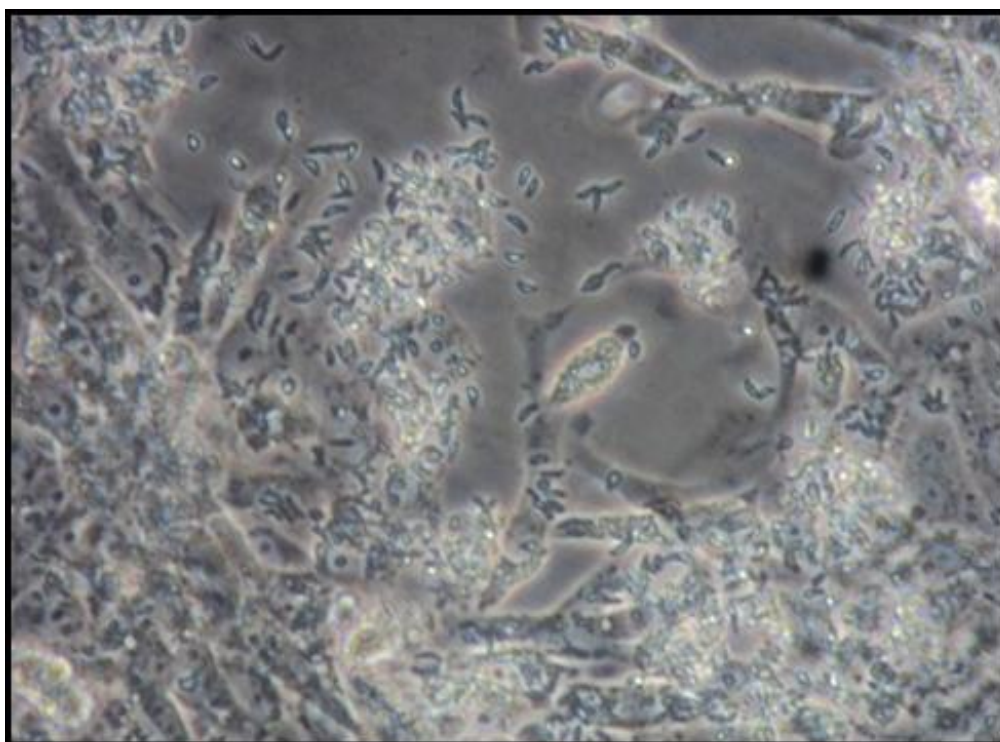
2.2.2 Ciclo biológico

O ciclo de vida do *N.caninum* apresenta em três estágios evolutivos, os taquizoitos, bradizoitos e oocistos, os quais dependem principalmente da fase da infecção e da resposta do hospedeiro (DUBEY *et al.*, 2002).

Os taquizoitos, são formas infectantes, proliferam-se rapidamente, ao invadir a célula do hospedeiro multiplicam-se intensamente dentro de vacúolos parasitóforos ou dispersos no próprio citoplasma (Figura 1). A multiplicação ocorre de forma tão rápida por endodiogenia que promove a morte da célula do hospedeiro (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2006).

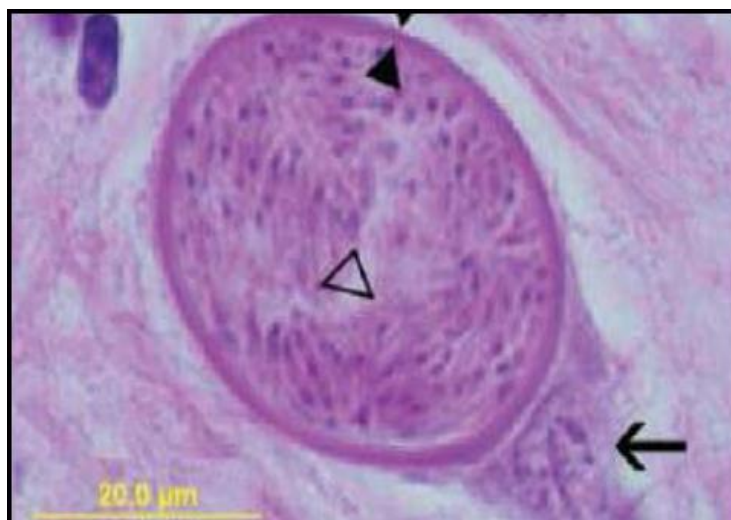
Os taquizoitos estão ligados à fase aguda da infecção, apresentam uma arquitetura ovóide, lunar ou globular, cujas dimensões variam de 3 a 7 µm de comprimento por 1 a 5 µm de largura, conforme o estágio de divisão, geralmente os taquizoitos que não estão em processo de divisão tem um tamanho de 7x 2 µm (DUBEY *et al.*, 1988a).

Figura 1 Taquizoitos de *N. caninum* cepa Nc-Bahia – Acervo pessoal



Os bradizoitos estão relacionados com a fase crônica da doença, encontram-se no interior de cistos teciduais, multiplicando-se lentamente (DUBEY *et al.*, 1988a; DUBEY *et al.*, 2002). Esses possuem formato delgado de 6 a 8 μm de comprimento por 1 a 1,8 μm de largura, essas estruturas possuem as mesmas organelas dos taquizoitos, entretanto com menor número de roptrias e maior número de grânulos (DUBEY e LINDSAY, 1996). Os bradizoitos permanecem por longos períodos no interior dos cistos teciduais de forma que não provocam nenhuma manifestação clínica (BUXTON *et al.*, 2002; DUBEY *et al.*, 2002). Os cistos podem medir até 107 μm e espessura de parede de 1-4 μm (Figura 2). Tais estágios estão presentes tanto em hospedeiros definitivos como nos intermediários, correspondendo à reprodução assexuada (DUBEY *et al.*, 2007).

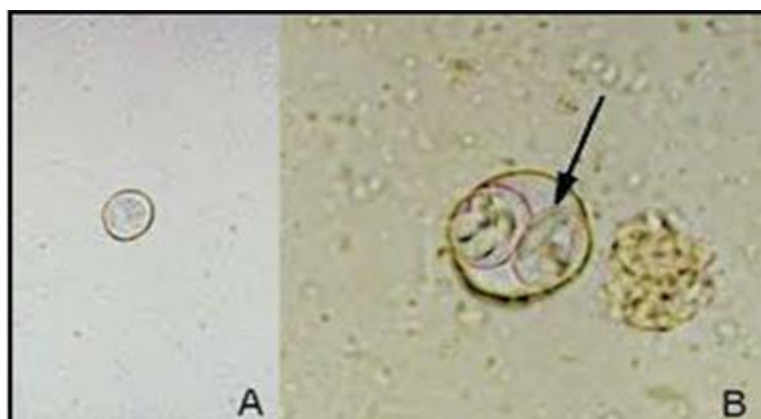
Figura 2 Cisto tecidual de *N. caninum* (DUBEY et al., 2007).



Os oocistos resultantes da reprodução sexuada do *N. caninum* são encontrados apenas em hospedeiros definitivos, os quais são eliminados juntamente com as fezes (MCALLISTER *et al.*, 1998; DUBEY *et al.*, 2002; DUBEY *et al.*, 2007).

Medindo cerca de 10 a 11 μ m de diâmetro, apresentam uma parede lisa, com forma esférica ou sub-esférica. Quando sofrem o processo de esporulação apresentam dois esporocistos com quatro esporozoítos alongados medindo cerca de 6,5 x 2,0 μ m, cada (Figura 3A e 3B) (DUBEY *et al.*, 2002). Esse processo dependerá das condições ambientais favoráveis, como a temperatura e umidade (MCALLISTER *et al.*, 1998).

Figura 3 Oocistos de *N. caninum*. A – Oocisto não esporulado. B – Oocisto esporulado. Sem coloração. 400 X. (ANDREOTTI et al., 2003).



2.2.2.1 Hospedeiros do *N. caninum*

O *N. caninum* possui um parasitismo que necessita de dois tipos de hospedeiros para a conclusão do ciclo. Dentre os hospedeiros definitivos descritos estão os cães - *Canis lupus familiaris* (MCALLISTER *et al.*, 1998; LINDSAY *et al.*, 1999), os coiotes - *Canis latrans* (GONDIM *et al.*, 2004) os dingos - *Canis lupus dingo* (KING *et al.*, 2010), e mais recentemente descobriu-se o lobo cinzento - *Canis lupus* (DUBEY *et al.*, 2011a).

Com relação aos hospedeiros intermediários já foram identificados anticorpos IgG anti-*N. caninum* em uma variedade de espécies como bovinos, caprinos, ovinos, lagomorfos (ALMERÍA *et al.*, 2007), equinos, bubalinos, camelídeos (WOLF *et al.*, 2005), várias espécies de cervos (TIEMANN *et al.*, 2005), antílope, bisão (CABAJ *et al.*, 2005), guaxinim, marsupiais (YAI *et al.*, 2003), raposa vermelha (JAKUBEK *et al.*, 2001), raposa cinzenta (LINDSAY *et al.*, 2001), lobo (BJÖRKMAN *et al.*, 2010), felinos selvagens (SOBRINO *et al.*, 2008), rinoceronte (SANGSTER *et al.*, 2010), camundongos - *Mus musculus* e ratos - *Rattus norvegicus* (JENKINS *et al.*, 2007; FUEHRER *et al.*, 2010), capivara (TRUPPEL *et al.*, 2010), javali (BÁRTOVÁ *et al.*, 2006), mamíferos marinhos (DUBEY *et al.*, 2003b) (FURUTA *et al.*, 2007) e aves como galinhas, urubus e corvos (DARWICH *et al.*, 2011).

2.2.2.2 Formas de transmissão

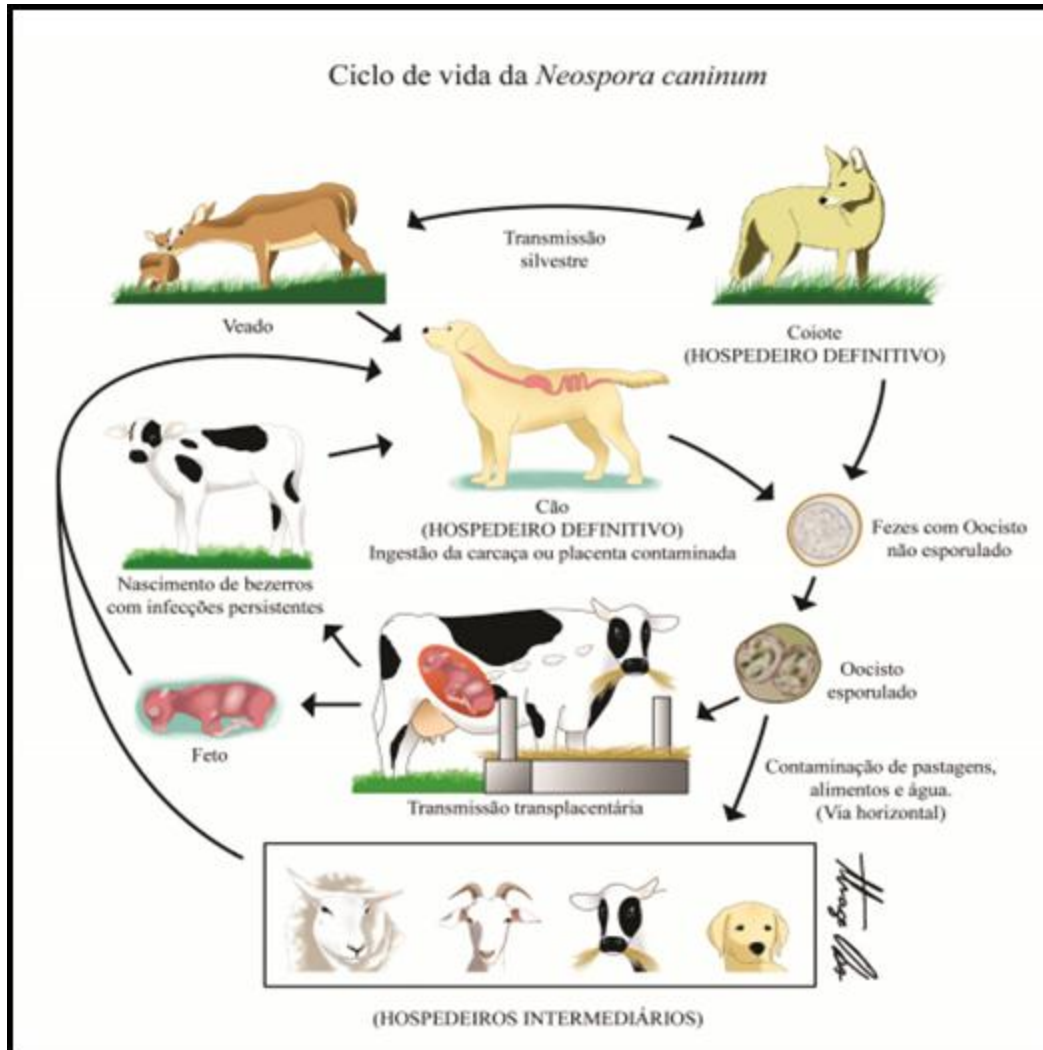
A principal via de transmissão do *N. caninum* é a oral, responsável pela transmissão horizontal do parasito (Figura 4). Os oocistos esporulados presentes no ambiente proveniente das fezes dos hospedeiros definitivos disseminando-se nos alimentos como silagem, feno, pasto, rações, água (MCALLISTER, 1998; DIJKSTRA *et al.*, 2001; DUBEY, 2003a; GONDIM *et al.*, 2004; DUBEY *et al.*, 2006; KING *et al.*, 2010). Assim ao serem ingeridos, no trato gastrointestinal, os oocistos liberam os esporozoítos que se transformam em taquizoítos iniciando a fase de adesão e invasão das células, uma vez no

interior dessas iniciam a expansão parasitária por endodiogenia. A elevada multiplicação no interior das células promove a ruptura permitindo que os taquizoitos se espalhem pelos demais tecidos (DUBEY *et al.*, 2007).

Os efeitos da infecção desencadeiam uma resposta do o sistema imune do hospedeiro. O parasito para evadir transforma-se em bradizoitos reduzindo a multiplicação celular e internalizando-se em cistos teciduais (LYONS *et al.*, 2002). Quando os hospedeiros definitivos alimentam-se de restos teciduais, como placentas, tecidos de abortamentos contendo os cistos teciduais, podem assim como os hospedeiros intermediários se infectarem com o *Neospora* spp. promovendo a manutenção do ciclo biológico (MCALLISTER *et al.*, 1998; LINDSAY *et al.*, 1999).

A transmissão transplacentária ou vertical é considerada como a forma crucial para a manutenção do agente no rebanho (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2006; ANTONELLO *et al.*, 2012). (Figura 4). Na infecção vertical o parasito é transmitido para o feto através da placenta, sustentando a infecção por gerações nos rebanhos bovinos sem a necessidade de um hospedeiro definitivo (DUBEY *et al.*, 2007). Esse tipo de transmissão já comprovado em algumas espécies, como em cães (COLE *et al.*, 1995), bovinos, ovinos, caprinos, felinos, equinos (DAVIDSON *et al.*, 1999; BUXTON *et al.*, 2002). Em equinos em 1990 foi sugerida a possibilidade da transmissão vertical a partir do caso de um feto equino abortado com a presença de taquizoitos de *N. caninum* nos pulmões, que foi comprovado por imuno-histoquímica (DUBEY e PORTERFIELD, 1990). A transmissão transplacentária foi verificada por Lindsay *et al.*, (1996), que constataram a presença da infecção neonatal em um potro que nasceu com alterações neurológicas e visuais. Ao realizar a imuno-histoquímica observaram a presença de cistos teciduais em diversos órgãos, como hipotálamo, baço, linfonodos mesentéricos, coração, e ao redor da musculatura ocular.

Figura 4 Ciclo de vida do *N. caninum* (OSHIRO et al., 2013).



2.3 *Neospora hughesi*

O *Neospora hughesi* descoberto em 1998, foi isolado na Califórnia de um equino da raça Quarto de Milha de 11 anos, que apresentava sinais compatíveis com mieloencefalite protozoária equina (EPM). Posteriormente outras duas cepas de *N. hughesi* foram isoladas nos Estados Unidos, ambas obtidas da medula espinhal de equinos adultos com EPM, no Alabama (CHEADLE *et al.*, 1999), e no Oregon (DUBEY *et al.*, 2001b). As informações existentes sobre o *N. hughesi* são muito escassas. Essa espécie tem sido relatada como sendo um dos agentes responsáveis por causar EPM (STELMANN e AMORIM, 2010).

Os equinos são os únicos hospedeiros intermediários descritos até o momento, entretanto os hospedeiros definitivos dessa espécie são desconhecidos. O ciclo biológico do *N. hughesi* ainda não foi descrito, uma vez que só são conhecidos apenas os estágios de taquizoitos e bradizoitos (DUBEY e SCHARES, 2011b).

Da mesma maneira que *N. caninum* o *N. hughesi* também pode disseminar-se em grande variedade de tecidos nos hospedeiros. Estudos realizados verificaram a presença de taquizoitos em células musculares cardíacas, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos e ocasionalmente em linfócitos (DUBEY *et al.*, 2001b). Os cistos teciduais tem predileção pelo sistema nervoso central (SNC) e já foram observados em regiões da retina e músculo ocular, nervos periféricos, justificando os sinais clínicos dos animais acometidos por essa espécie (WOBESER *et al.*, 2009; FINNO *et al.*, 2010).

2.3.1 Diferença entre o *N. caninum* e o *N. hughesi*

Estruturalmente o *N. hughesi* apresentam estrutura apical complexa, possuindo em torno de 13 a 27 roptrias, enquanto o *N. caninum* tem de 8 a 18 (DUBEY *et al.*, 2002). Os taquizoitos tem um tamanho reduzido apresentando

2,0 X 5,0 μm , enquanto que o de *N. caninum* possuem 2,0 X 6,0 μm . Quanto aos cistos teciduais possuem paredes com espessuras diferentes, os de *N. caninum* (1- 4 μm), e os de *N. hughesi* (0,15-1,0 μm) (MARSH *et al.*, 1998; DUBEY *et al.*, 2001b).

Existe um elevado grau de similaridade antigênica entre as espécies do gênero *Neospora* permitindo que ocorra grande possibilidade de reação cruzada em testes sorológicos mais comuns (MARSH *et al.* 1998, WALSH *et al.* 2000, PACKHAM *et al.* 2002). A descoberta de proteínas granulares como a GRA6 e a GRA7, que são expelidas após a infecção e ruptura das células afetadas permitiu o desenvolvimento de anticorpos específicos para cada espécie, o que representa um importante avanço na diferenciação das espécies (WALSH *et al.* 2001).

Marsh *et al.* (1998) analisando as sequências das proteínas do espaço interno do transcrito 1 (ITS1) do DNA ribossômico perceberam uma diferença em sete pares de bases de nucleotídeos, representando uma paridade de 98% entre elas. No ano seguinte através de uma observação na expressão de antígenos de superfície dos taquizoitos como o SAG1 e SRS2, observou-se que NcSAG1 expresso pelo *N. caninum* possuía 94% de similaridade na sequência de aminoácidos com a NhSAG1 expressado pelo *N. hughesi*. Ao passo que o NcSRS2 (*N. caninum*) apresentava 91% de igualdade na sequência com o antígeno NhSRS2 (*N. hughesi*). Permitindo assim diferenciação entre as espécies a partir das sequências de bases que codificam as proteínas ITS1 e dos antígenos imunodominantes SAG1 e SRS2 (MARSH *et al.*, 1999).

2.3.2 Vias de transmissão do *N. hughesi*

A transmissão horizontal do *N. hughesi* ainda é desconhecida, os equinos são os únicos hospedeiros intermediários conhecidos, no entanto a forma como adquirem a infecção não é conhecida (DUBEY *et al.*, 2007). Entretanto a infecção vertical foi sugerida em 1990, quando se relatou um caso

de aborto em uma égua da raça quarto milha de 8 anos de idade que 2 meses antes da gestação vir a termo. Confirmando a presença de taquizoitos em macrófagos e em células alveolares através de exame histopatológico (DUBEY e PORTERFIELD, 1990). Por muitos anos apenas suposições foram relatadas, mas a confirmação da possibilidade de infecção congênita de *N. hughesi* ocorreu recentemente, através de um estudo no qual os autores avaliaram a infecção transplacentária em um grupo de éguas, durante dois anos. Durante o período, 58 éguas e 74 potros nascidos dessas éguas foram testados. Desses filhotes apenas três apresentaram sorologia positiva através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), com títulos de anticorpos pré-colostrais que variavam de 2560 a 20480. Dentre eles dois eram descendentes da mesma égua que deu origem a uma potranca diagnosticada com neosporose neuronal (PUSTERLA et al., 2011).

2.4 Sinais clínicos do *Neospora* spp.

Os efeitos da infecção pelo *Neospora* spp. nos equinos não estão bem esclarecidos (TOSCAN *et al.*, 2010). A doença clínica está relacionada com a multiplicação dos taquizoitos no SNC, justificando os sinais clínicos apresentados por esses animais (DUBEY, 2003a). O quadro clínico pode cursar com abortamentos, doença neonatal, doenças neurológicas do sistema nervoso central e doenças viscerais (GRAY *et al.*, 1996; LINDSAY, 2001; FINNO *et al.*, 2010).

Comumente a infecção causada pelo *N. caninum* em equinos é muito relacionada com abortamentos, doenças neonatais, distúrbios reprodutivos (LINDSAY, 2001; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2006a). O quadro de abortamento em equinos é mais raro quando comparado com o dos bovinos. Estudos apontam que provavelmente isso se deve fato das características placentárias das vacas que permite uma maior eficiência do parasito (PITEL *et al.*, 2003). Em contrapartida a doença causada por *N. hughesi* na maioria das vezes cursa com alterações neurológicas (HAMIR *et al.* 1998). Observa-se uma

mieloencefalite, característica da EPM, uma enfermidade bem descrita e causada pelo *Sarcocystis neurona* (FINNO *et al.*, 2007; WOBESER *et al.*, 2009).

A identificação de sintomatologia semelhante a EPM em animais foi verificada por Finno *et al.*, (2007) na Universidade da Califórnia em Davis nos EUA, que a descreveram em três equinos. O primeiro deles era um macho castrado de 24 anos, Appaloosa, com histórico de incoordenação do membro pélvico. Após uma avaliação neurológica notou-se uma hipermetria caracterizada por uma ataxia de grau 2 de 5 nos membros torácico e pélvico esquerdo, e uma ataxia de grau 3 de 5 nos membros torácico e pélvico direito. O soro do animal foi testado pela RIFI para a identificação de anticorpos IgG anti- *N. hughesi* e o resultado encontrado foi positivo com título de 1:2560. Os outros dois foi um equino de 16 anos, Quarto de milha, com histórico de alterações na marcha e perda de peso progressiva, com sorologia positiva através da RIFI com título de 1:1280, e por fim uma potra de quatro meses de idade com um quadro de agudo de ataxia, incoordenação, alterações na marcha e título de 1:1280 na mesma técnica a qual foram submetidos os outro animais.

Em 2009 Wobeser *et.al.*, relatou o caso de um equino macho de 10 anos de idade, da raça Árabe, eutanasiado e submetido ao serviço de necropsia em Saskatoon, Saskatchewan. O cavalo estava cambaleante com grande debilidade e tinha perda de peso progressiva. Na necropsia observaram alterações em diversos órgãos, e no histopatológico áreas focais de malacia e com a presença de múltiplos taquizoítos, dessa forma foi realizado a técnica de imuno-histoquímica, no qual a coloração foi positiva para *Neospora* spp. e negativo para *S. neurona*.

Em 2010, na Universidade da Califórnia em Davis nos EUA, uma mula de 23 anos foi atendida na instituição e apresentava um histórico de anormalidade ocular e apresentação de alterações neurológicas. Essas eram caracterizadas por paralisia do nervo facial direito, extensa área de atrofia muscular simétrica na região dos glúteos e ataxia assimétrica dos membros pélvicos. Ao exame clínico descobriu-se que a lesão neurológica apresentava um envolvimento multifocal do tronco encefálico. A RIFI foi realizada em amostras séricas e líquido para identificação de anticorpos IgG anti- *N. hughesi*,

encontrando resultado positivo. Este foi o primeiro caso de EPM por *N. hughesi* associado ao estrabismo e defeitos oculo-motores e em equídeos (FINNO *et al.*, 2010).

2.5 Diagnóstico do *Neospora* spp.

A neosporose, assim como outras doenças infecciosas apresenta sintomatologia inespecífica, com sinais clínicos comuns, fato esse que dificulta bastante o diagnóstico clínico da enfermidade (PACKHAM, *et al.*, 2002).

Diversos métodos diagnósticos foram padronizados desde a descoberta da neosporose, a fim de permitir a possibilidade da detecção desse agente. Dentre eles têm-se os testes parasitológicos caracterizados como sendo método diagnóstico direto e os sorológicos que são métodos indiretos (DUBEY *et al.*, 2007).

A confirmação laboratorial da neosporose é realizada através do emprego de testes parasitológicos (PETERS *et al.*, 2001). Dentre os meios empregados têm-se a imuno-histoquímica, a reação em cadeia da polimerase (PCR), a observação dos cistos nos tecidos, o exame de fezes dos cães e o isolamento *in vivo* ou *in vitro* (PETERS *et al.*, 2001; HEMPHILL *et al.*, 2000).

A técnica de imuno-histoquímica utiliza anticorpos específicos anti-*Neospora* spp. em fragmentos teciduais que serão testados, além de anticorpo secundário conjugado a uma enzima, de forma que quando adiciona o substrato específico há formação de uma coloração identificando a reação antígeno-anticorpo (VAN MAANEN *et al.*, 2004).

A (PCR) é uma técnica que permite a amplificação de pequenas porções do DNA, mesmo naqueles tecidos em estado de autólise (JENKINS *et al.*, 2002). A realização da imuno-histoquímica ou da PCR são importantes para um diagnóstico confirmatório, visto que outros agentes provocam lesões teciduais muito semelhantes, de forma que o histopatológico não é um método suficiente para identificar o agente (JENKINS *et al.*, 2002). Em um estudo comparativo entre as técnicas de PCR e a imuno-histoquímica, observou-se

que a PCR possui uma maior sensibilidade e especificidade na detecção de *N. caninum* em tecidos fetais bovinos (VAN MAANEN *et al.*, 2004).

O exame histopatológico busca as lesões que o protozoário causou nas células infectadas e também a presença de estágios morfológicos do parasito como os taquizoitos, cistos teciduais contendo bradizoitos. Observa-se lesões em regiões do sistema nervoso central, como encefalite focal, com necrose, inflamação não supurativa, podendo encontrar também miocardite, miosite focal, hepatite portal não supurativa (BARR *et al.*, 1991; ANDERSON *et al.*, 2000).

O isolamento do *Neospora sp.* é um procedimento bastante utilizado em pesquisas, entretanto devido ao seu custo elevado torna o uso limitado. A técnica baseia-se na inoculação de oocistos ou tecidos contendo taquizoitos, por via parenteral ou oral, em animais susceptíveis como gerbis (*Meriones unguiculatus*) (DUBEY *et al.*, 1998).

Os testes sorológicos são realizados para assinalar a presença de anticorpos anti-*Neospora spp.*. A identificação de imunoglobulinas no soro dos animais não determinam presença de infecção ativa e sim a exposição prévia ao agente (VARDELEON *et al.*, 2001). Entretanto, na maioria dos estudos de soroprevalência realizados utilizam-se como antígeno taquizoitos de *N. caninum*, os métodos sorológicos convencionais não diferenciam as espécies de *Neospora*, devido ao compartilhamento antigênico entre ambas as espécies, existe grande possibilidade de reação cruzada (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2006a).

A RIFI foi o primeiro método sorológico padronizado para o diagnóstico de *Neospora caninum* e é considerado como referência na pesquisa de anticorpos (HEMPHILL *et al.*, 2000). O teste ELISA baseia-se na ligação antígeno-anticorpo identificada através de uma reação imunoenzimática, a qual gera a formação de uma coloração que é quantificada no espectrofotômetro (BJÖRKMAN e UGGLA, 1999).

O teste de soroaglutinação modificada (MAT) para *N. caninum* foi desenvolvida a partir do teste de aglutinação direta para toxoplasmose por Packham *et al.*, (1998), demonstrando ser um teste prático de execução rápida, de fácil utilização e com sensibilidade elevada.

O Western blot (WB) geralmente é utilizado como teste confirmatório para *Neospora* spp. devido a sua alta especificidade. Esse teste investiga reações antígeno-anticorpo direcionadas às proteínas específicas. No estudo comparativo realizado por Duarte *et al.*, (2003) no qual foi utilizado amostras de soro equino para diagnóstico da EPM, foram avaliadas por três técnicas, a RIFI, Western Blot modificado (mWB) e WB. Observaram uma sensibilidade de 88,9% nos três métodos, entretanto, as especificidades diferiram; onde a RIFI apresentou uma especificidade de 100%, enquanto que o WB apresentou 87,2% e o mWB 69,2%. Demonstrando que a RIFI é o teste mais adequado para diagnóstico da MPE em equinos (DUARTE *et al.*, 2003).

2.6 Epidemiologia do *Neospora* spp.

O *Neospora* sp. tem uma distribuição geográfica ampla, uma vez que cavalos soropositivos foram notificados nas Américas, Europa e na Ásia (CHEADLE *et al.*, 1999; DUBEY, *et al.*, 1999a,b; GRUPTA *et al.*, 2002; DUBEY *et al.*, 2003c).

Um estudo realizado no Alabama, nos Estados Unidos, com 536 animais, testados pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), 11,5% foram considerados soropositivos, de forma que as amostras reagentes foram tituladas até a máxima reatividade, encontrando no título de 1:50 (35/6.5%), 1:100 (19/3.5%), 1:200 (7/1.3%) e 1:1600 (1/0.2%) (CHEADLE *et al.*, 1999).

Na França em 2003, foi realizado um inquérito sorológico através da técnica de soroaglutinação em que foi utilizado um grupo de éguas com histórico de abortamento. A soropositividade foi de 50% no título de 1:40 (27/54), 11.1% (6/54) em 1:80; 7.4% (4/54) em 1:100; 5.6% (4/54) em 1:200; 3.8% (2/54) na diluição 1:400 e por fim 1.9% (1/54) em 1:800 (PITEL *et al.*, 2003). Na Itália em 2004, analisaram 150 equinos assintomáticos para *Neospora* sp. pela RIFI, os títulos variaram de 1:50 a 1:800. Sendo encontrado no título de 1:50 10,5% (16/150), enquanto que no título de 1:100 17% (26/150), 5.3% (8/150) na diluição de 1:200 e 0.6% (1/150) em 1:800 (CIARAMELLA *et al.* 2004).

Em um estudo realizado no estado de Durango no México, Yeargan *et al.* (2013) com o objetivo de avaliar a exposição de equinos ao *N. hughesi*. Para isso, produziram uma proteína recombinante de *N. hughesi* (rNhSAG1), a qual foi utilizada no desenvolvimento de um teste de ELISA. Anticorpos IgG anti- *N. hughesi* foram detectados em apenas 3% (15/495) dos animais do estudo

Recentemente na Itália foi realizada uma pesquisa de anticorpos IgG anti-*Neospora sp.* em 643 cavalos aparentemente saudáveis de 60 fazendas e 51 municípios no sul da Itália. Empregando-se a RIFI como método diagnóstico, no ponto de corte de 1:50, retestando os animais também através do ELISA. Dessa forma foi encontrada uma percentagem de 2,3% (15/643), considerados positivos pela RIFI. Enquanto que pelo o ELISA o número de animais reagentes foi de 10,9% (70/643) (BÁRTOVÁ *et al.*, 2015)

Em um estudo pioneiro realizado na Jordânia foram coletas amostras sanguíneas de 227 animais no período da primavera de seis regiões climáticas diferentes, encontraram uma soroprevalência de 3% (7/227) pelo ELISA. O estudo mostrou que o uso de medicação anti-helmíntica pelo menos uma vez ao ano pode ter reduzido a soropositividade (TALAFHA *et al.*, 2015)

Os inquéritos sorológicos no Brasil são escassos verificando-se uma prevalência bastante variada entre 2,5 a 47% (DUBEY *et al.*, 1999b; HOANE *et al.*, 2006; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2006b; VILLALOBOS *et al.*, 2006). Em um estudo realizado no estado do Paraná com 36 éguas e seus potros em dois períodos de coletas, utilizando a RIFI como técnica diagnóstica na diluição de 1:50, os autores encontraram uma soroprevalência de 47%. Já no ponto de corte de 1:100 a positividade caiu para 13,8% no ano de 2003. Enquanto que a nova coleta em 2004 dos mesmos animais a prevalência encontrada no ponto de 1:50 foi igual a 30% (11/36) e na diluição de 1:100 foi de 16.6% (6/36). Com relação aos potros nascidos dessas éguas foram testados antes da ingestão do colostro, verificou-se que 22% desses animais haviam sido expostos ao *Neospora sp.* ainda na vida intrauterina (LOCATELLI-DITTRICH *et al.* 2006b). Neste mesmo ano Hoane *et al.*, (2006) realizaram um estudo soroepidemiológico em equinos de algumas regiões do Brasil (Bahia, Goiás, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul, Rondônia, Santa Catarina e

São Paulo) testados pelo ELISA no qual constataram uma prevalência de 2,5% (24/961).

No Estado de São Paulo Stelmann *et al.*, (2011) utilizando 26 equinos com histórico de ataxia, verificaram através da RIFI uma soropositividade de 57,6% (15/26) no título de 1:50 para *N. caninum*. Já no Rio Grande do Sul 203 potros neonatos foram testados antes de ingerirem o colostro, através da RIFI. Os autores utilizaram uma diluição de 1:16 e 1:50. O estudo detectou que 25,1% das amostras (51/203) eram positivas na diluição de 1:16 e 9,9% (20/203) na diluição de 1:50. As amostras foram tituladas encontrando 4,4% (09/203) reagindo até 1:100, 2,9% (06/203) 1:200 e 1,4% (03/203) na diluição de 1:400 (ANTONELLO *et al.*, 2012).

No Sul do Brasil, Quevedo *et al.* (2015) realizaram um estudo para verificação da transmissão vertical, para o desenvolvimento deste trabalho utilizando a técnica de imunofluorescência indireta (RIFI) em soros de 78 éguas e seus potros. A diluição inicial dos soros das éguas foi de 1:50 e a dos potros 1:16. Tal pesquisa demonstrou que 64% (50/78) éguas e 41% (32/78) potros foram positivos. Sendo que das 50 éguas que apresentaram anticorpos IgG anti-*Neospora sp.* 24 delas geraram potros positivos, em contrapartida dentre as 28 éguas que não reagiram, oito deram a luz a potros positivos.

2.7 Fatores de risco do *Neospora spp.*

Os fatores de risco são considerados como chave para a compreensão da distribuição e desenvolvimento da neosporose nos animais (DUBEY *et al.*, 2007; MOURA *et al.*, 2013; ABREU *et al.*, 2014; VILLALOBOS *et al.*, 2012). Alguns fatores foram analisados dentre eles, o clima da região; a idade dos animais; a fonte hídrica disponível; o tipo de alimentação; o manejo empregado na propriedade; o pastejo consorciados com outras espécies de risco; o acesso de animais silvestres nas propriedades de criação; assim como outras espécies domésticas como cães e gatos e seus hábitos alimentares (ABREU *et al.*, 2014).

A idade pode estar intimamente relacionada com a susceptibilidade do hospedeiro ao parasito. Observa-se que animais mais velhos são mais susceptíveis a adquirir infecção que os mais jovens. Uma vez que quanto mais tempo um animal permaneça em uma região endêmica maiores chances terão de contrair a doença (BARTLES *et al.*, 2006). O risco de infecção aumenta quando diferentes espécies compartilham o mesmo ambiente, no mesmo sistema de manejo, principalmente se as espécies consorciadas participarem do ciclo biológico do parasito (WOUDA *et al.*, 1999). Outro fator é o clima da região que pode interferir positivamente ou negativamente, uma vez que a esporulação, que é um fenômeno de grande importância no ciclo do parasito, somente acontece em condições de umidade e temperatura ideais. Ambientes mais úmidos ou determinadas épocas do ano, que favoreçam essas condições, possibilitam maior desenvolvimento do parasito (DUBEY *et al.*, 2007; MOURA *et al.*, 2013).

A fonte alimentar e hídrica são pontos críticos na perpetuação da infecção (DUBEY *et al.*, 2007). O local de armazenamento e a forma como a alimentação é fornecida para os animais podem facilitar o acesso de espécies domésticas, principalmente dos cães, possibilitando a contaminação com oocistos do parasito, ainda que a presença desse não implique na eliminação dos oocistos (ABREU *et al.*, 2014). Além desses, os felinos domésticos através do hábito de rolar-se na terra, onde por muitas vezes as fezes dos canídeos são depositadas, depois se deitam no feno ou mesmo no pasto transportando os oocistos presos no pelo para o alimento (FRENKEL e PARKER, 1996).

Medidas profiláticas devem ser adotadas, pois não existem métodos efetivos de tratamento para a enfermidade. Dessa forma deve-se levar em consideração o bloqueio das vias de transmissão seja ela horizontal ou vertical (ATKINSON *et al.*, 2000). Os tecidos placentários de abortamentos devem ser eliminados para impedir provável disseminação do protozoário para os cães e animais silvestres. Descarte gradativo de animais soropositivos, evitando a sua utilização na reprodução, reduzir o contato das fezes de cães com alimentos e água, devendo dessa forma promover proteção dos locais de armazenamento. (ANDREOTTI *et al.*, 2003).

CAPÍTULO 1 – Prevalência de anticorpos IgG anti *Neospora sp.* em equinos no recôncavo da Bahia

Artigo a ser submetido ao Periódico Veterinary Parasitology, Qualis A1 na Área Zootecnia/Recursos Pesqueiros

RESUMO: A neosporose é uma parasitose descrita pela primeira vez em meados da década de 80, é causada por um protozoário intracelular obrigatório. O *Neospora sp.* é um importante agente relatado como responsável por causar abortamentos, especialmente, em bovinos, estimando-se grandes prejuízos econômicos na pecuária. Duas espécies já foram descritas nesse gênero, o *N. caninum* que afeta uma ampla variedade de mamíferos e o *N. hughesi* isolado apenas de equinos. O conhecimento dos fatores considerados como de risco para o desenvolvimento da neosporose são cruciais para a compreensão da distribuição desse parasito. Uma vez que a prevalência de anticorpos IgG anti-*Neospora spp.* tem sido verificada mundialmente, de forma que equinos soropositivos já foram detectados em todos os continentes. O objetivo desse trabalho foi determinar a prevalência de anticorpos anti-*Neospora spp.* e relacionar os fatores de risco associados com a doença no Recôncavo da Bahia. Foram utilizadas amostras séricas de 234 equinos hígidos e sem histórico de alterações reprodutivas e neurológicas que foram submetidas à reação de imunofluorescência indireta (RIFI), os títulos variaram de 1:50 até 1:800. No ponto de corte de 1:50, foram detectados anticorpos IgG anti-*Neospora sp.* em 106 animais representando uma soropositividade de 45,30%. As amostras foram testadas em diluições dobradas até não mais apresentar reação. Verificou-se uma soropositividade no título de 1:100 de 38,03% (89/234); 21,79% (51/234) na titulação de 1:200; 4,70% (11/234) em 1:400 e apenas 0,42% (1/234) apresentou título de 1:800. Não foi verificada correlação positiva entre as variáveis estudadas e a soropositividade. Entretanto o estudo demonstrou que probabilidade de ocorrência da neosporose é mais significativa em animais abaixo de cinco anos de idade assim também em animais sem raça definida. Contudo, de acordo como os resultados encontrados nesse estudo verificou-se uma elevada prevalência de anticorpos IgG anti-*Neospora spp.* na região do recôncavo da Bahia.

Palavras-chave: *Neospora caninum*, *Neospora hughesi*, sorodiagnóstico, Reação de imunofluorescência indireta, fatores de risco.

ABSTRACT: Neosporosis is a parasitic disease first described in the mid-80, which is caused by an obligate intracellular protozoan parasite. *Neospora sp.* is an important agent reported as responsible for abortions, especially in cattle, causing great economic losses in livestock. Two species have been described

in this genus, *N. caninum* that affects a wide variety of mammals and *N. hughesi* isolated only in horses. Knowing the risk factors for the development of neosporosis are crucial to the study of this disease. The prevalence of anti-*Neospora* spp IgG antibodies was verified worldwide, indicating that seropositive horses have been found on all continents. The objective of this study was to determine the prevalence of antibodies IgG anti-*Neospora* spp. and list the risk factors associated with the disease in the Recôncavo da Bahia. Serum samples from 234 healthy horses without history of reproductive and neurological changes were submitted to indirect immunofluorescence test (IFAT), where titles ranged from 1:50 to 1: 800. In the cutoff 1:50 antibodies IgG anti-*Neospora* spp were detected in 106 (45,30%) animals. Serum samples were tested in folded dilutions up to no more reaction. There was a seropositivity of 38.03% (89/234) in titer of 1: 100; 21.79% (51/234) in the titer of 1: 200; 4.70% (11/234) in 1: 400 and 0.42% (1/234) in the 1: 800. There was no positive correlation between the study variables and seropositivity. However there was a probability of occurrence of neosporosis in animals younger than five years old as well as those cross breed. However, according to the results found in this study there was a high prevalence of antibodies IgG anti-*Neospora* spp. in the Recôncavo da Bahia.

KEYWORDS:; indirect immunofluorescence reaction; *Neospora caninum*; *Neospora hughesi*; risk factors; serodiagnosis

INTRODUÇÃO

A neosporose é uma enfermidade reconhecida mundialmente por causar distúrbios reprodutivos e doença neonatal especialmente em bovinos. Essa doença é causada pelo *Neospora* spp. um protozoário intracelular obrigatório, que pertence ao filo apicomplexa, da família *Sarcocystidae*, caracterizado pela capacidade de formação de cistos nos tecidos dos seus hospedeiros (Dubey et al., 1988). Até o momento já foram descritas duas espécies desse gênero, o *N. caninum*, que foi isolado do encéfalo de cão (Dubey et al., 1988) e *N. hughesi* isolado de cérebro e medula espinhal de um equino (Marsh et al., 1998).

O *N. caninum* apresenta os canídeos como hospedeiros definitivos (McCallister et al., 1998; Lindsay et al., 1999; Gondim et al., 2004; King et al., 2010). No entanto como hospedeiros intermediários uma variedade de espécies já foram descritas, inclusive os equinos (Dubey et al. 2002). Já com relação ao *N. hughesi* hospedeiros definitivos não são conhecidos, sendo os equinos os únicos hospedeiros intermediários conhecidos (Dubey et al., 2001). Nos equinos a sintomatologia clínica pode variar, uma vez que a infecção causada pelo *N. caninum* apresenta um quadro de alterações reprodutivas e neurológicas semelhantes ao descrito em bovinos (Gray et al., 1996; Lindsay et al., 2001). Entretanto, quando se trata da infecção causada pelo *N. hughesi* observa-se um quadro neurológico de mieloencefalite característica da mieloencefalite protozoária equina - EPM (Daft et al., 1996; Marsh et al., 1996; Walsh et al., 2000).

A prevalência de anticorpos IgG anti-*Neospora* spp., tem sido verificada mundialmente, equinos soropositivos já foram detectados em diversos países (Bártová et al., 2015; Cheadle et al., 1999; Ciaramella et al. 2004; Finno et al., 2010; Grupta et al, 2002; Pitel et al., 2003), de forma que o conhecimento dos fatores considerados como de risco para o desenvolvimento da neosporose são cruciais para a compreensão da distribuição desse parasito. Acredita-se que a idade, o clima da região, a associação de espécies que estão relacionadas com o ciclo biológico do *Neospora* spp., o tipo de alimentação e fonte hídrica são pontos críticos, uma vez que aumentam as chances de contato dos hospedeiros com o parasito, e por conseguinte a infecção.

Dessa forma este estudo objetivou determinar a prevalência de anticorpos IgG anti-*Neospora sp.* e relacionar os fatores de risco com a soropositividade nos equinos do Recôncavo da Bahia.

MATERIAL E METODOS

2.1 Área de estudo

O território de identidade Recôncavo localiza-se em torno da Baía de Todos os Santos, estado da Bahia (Figura 1). A sua posição geográfica situa-se entre os meridianos 37 ° a 39° a Oeste de Greenwich e ao Sul do Equador no limite paralelos de 12° e 13°. Esse território de identidade é integrado por 20 municípios, com uma área total de 10.400 mil km² e possui uma população de 576.672 habitantes (IBGE, 2010b). Apresenta um clima tropical quente e úmido com temperaturas em torno de 25°C, entretanto existe variação entre os municípios. As chuvas são mais frequentes nos períodos de outono e inverno, registrando uma pluviosidade média de 2 mil milímetros anuais (SEI - BA, 2010).

2.2 Amostras

As amostras de sangue foram colhidas de equinos com idades variadas, de forma aleatória, sendo identificado o sexo, idade, local de origem, alimentação, tipo de oferta de água, presença de bovinos, caprinos, ovinos, aves. Neste estudo o número de animais foi determinado pela quantidade de animais presente no recôncavo da Bahia, através do cálculo amostral de população infinita. Utilizando uma quantidade de 10.831 equinos, IBGE (2010), uma frequência estimada de 2,5% e intervalo de confiança de 99%. Assim a amostra foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$n = \frac{N \cdot Z^2 \cdot p \cdot (1 - p)}{Z^2 \cdot p \cdot (1 - p) + e^2 \cdot (N - 1)}$$

Onde:

n - amostra calculada

N - população

Z - variável normal padronizada associada ao nível de confiança

p - verdadeira probabilidade do evento

e - erro amostral

As amostras de sangue de 234 animais foram colhidos por punção da veia jugular, em 14 municípios e de 52 propriedades do Recôncavo da Bahia. Neste estudo foram testados equinos hígidos e sem histórico de alterações neurológicas e reprodutivas do território de identidade Recôncavo, localizado na Bahia. Em cada propriedade foi aplicado um questionário com objetivo de realizar um inquérito epidemiológico. As amostras foram acondicionadas em tubos tipo vacutainer sem anticoagulante, refrigeradas e levadas ao laboratório onde foram centrifugadas a 675 x G por 10 minutos. O soro foi armazenado em eppendorfs a -20°C até a sua utilização.

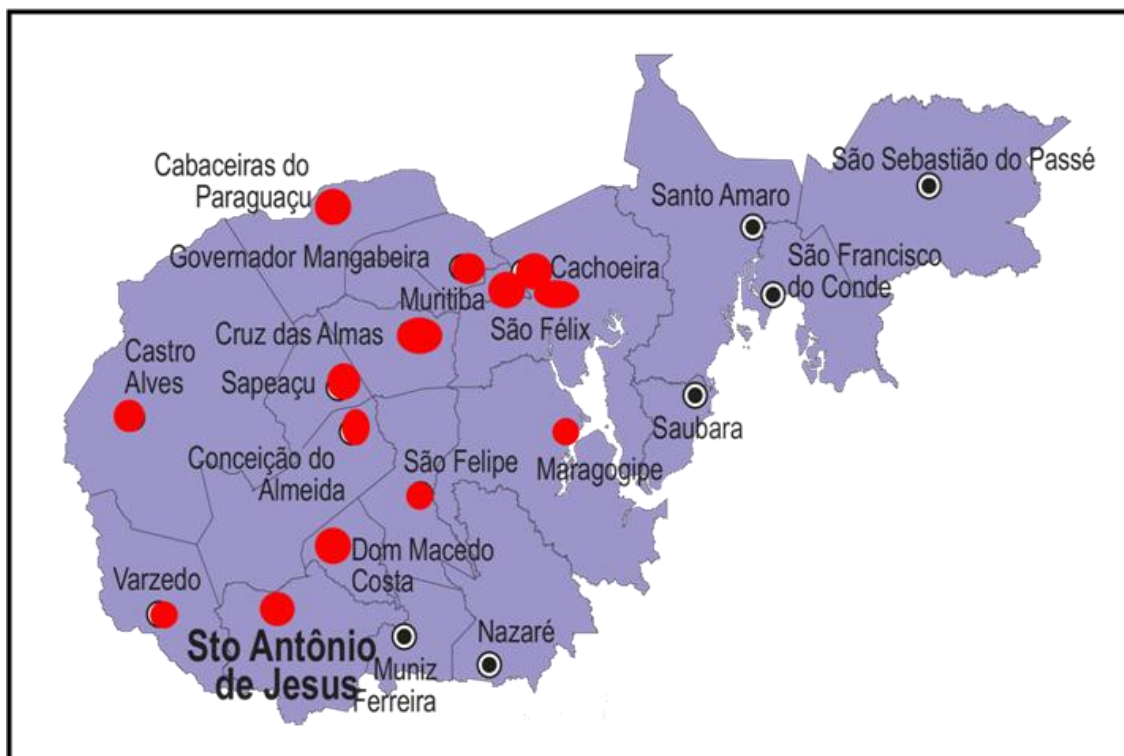


Figura 1: Mapa do território de identidade recôncavo (SEI- BA, 2010)

2.3 Preparo do Antígeno

Taquizoitos da cepa NC-Bahia (Gondim *et al.*, 2001) foram cultivados em monocamada de células Vero mantido em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e solução de antibiótico e antimicótico (10.000 unidades de penicilina, 10 mg estreptomicina e 25µg Anfotericina B por mL - Sigma – Aldrich Brasil Ltda) na concentração de 5ml/L. A cultura foi mantida em estufa a 37°C com atmosfera úmida com 5% de CO₂ e o meio de cultura trocado a cada 48h. Os taquizoitos foram purificados quando a monocamada de células apresentava um efeito citopático de aproximadamente 90%. O conteúdo do flask foi filtrado usando-se um filtro de seringa de 5,0 µm (Millex Gv, Brasil), o filtrado centrifugado e os taquizoitos contados no hemocítômetro.

2.4 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Os taquizoitos purificados foram diluídos em PBS para uma concentração final de 500 a 1000 taquizoitos/ μ L e utilizados para preparar as lâminas de RIFI, as quais foram estocadas a -20°C até o momento da sua utilização. As amostras séricas foram testadas inicialmente numa diluição de 1:50. As amostras foram adicionadas as lâminas (10 μ L por poço) e incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Essas foram lavadas cinco vezes em PBS por 5 minutos, e em seguida, foram adicionados 10 μ L de conjugado anti-IgG equino marcado com fluoresceína (Sigma – Aldrich Brasil Ltda), diluído em PBS (1:200) e azul de Evans numa concentração final de 0,005%. As lâminas foram novamente incubadas por 30 minutos e lavadas cinco vezes em PBS. Após a secagem, realizou-se montagem com glicerina tamponada a 90% e lidas em microscópio de epifluorescência (OLYMPUS, CKX41). As amostras positivas foram tituladas em diluições dobradas até não mais apresentarem reação.

2.5 Teste de hemoaglutinação indireta (HAI) para *Toxoplasma gondii*

A Sororreatividade para *T. gondii* foi analisada nas 234 amostras utilizando-se kit comercial (WAMA Diagnóstica). O teste foi realizado seguindo orientações do fabricante. Brevemente, os soros foram diluídos em um ponto de corte de 1:16 e distribuídos em placas de micro titulação em poliestireno com fundo em “V”. As amostras foram testadas até não mais apresentarem reação.

2.6 Análise estatística

A associação entre as variáveis explicativas (sexo, idade, alimentação, tipo de fonte de água) e a ocorrência da soropositividade foi realizada por uma Análise de Correspondências Múltiplas, conforme detalhado por Lebart et al. (2004), considerando as correlações das variáveis após a transformação. O estudo da frequência de ocorrência dos parasitos em função do sexo dos animais e das faixas etárias foi feito utilizando Modelos Lineares Generalizados - GLM, considerando uma distribuição *binomial* e função de ligação do tipo "logit", sendo a resposta estimada como a probabilidade de ocorrência da doença.

2.7 Declaração do Comitê de ética

Todos os protocolos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, protocolo: 23007023226/2015-17.

RESULTADOS

Anticorpos IgG anti-*Neospora sp.* foram detectados em 106 animais (106/234) representando uma soropositividade de 45,30%. Os títulos variaram de 1:50 a 1:800, sendo verificado que 38,03% (89/234) dos animais reagiram no título de 1:100; 21,79% (51/234) no título de 1:200; 4,70% (11/234) em 1:400 e 0,42% apresentou título de 1:800 (1/234) (Tabela 1).

Tabela 1: Títulos de anticorpos IgG anti-*Neospora sp.* em amostras séricas de equinos pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

Titulação	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
Prevalência	45,30% (106/234)	38,03% (89/234)	21,79% (51/234)	4,70% (11/234)	0,42% (1/234)

Dos animais considerados sororreagentes 34,90% (37/106) eram fêmeas e 65,09% (69/106) eram machos. Esses animais foram agrupados pela idade como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Prevalência de anticorpos IgG anti-*Neospora spp.* em amostras séricas de equinos por sexo/idade provenientes do Recôncavo da Bahia.

Sexo	Idades dos animais			
	0 – 5 anos	6 – 7 anos	8 – 12 anos	13 – Acima
Fêmeas reagentes	27,02% (10/37)	20,79% (11/37)	32,43% (12/37)	10,81% (4/37)
Machos reagentes	26,08% (18/69)	20,28% (14/69)	31,88% (22/69)	21,73% (15/69)

Os animais soropositivos foram agrupados de acordo com os municípios de origem no Recôncavo da Bahia (Tabela 3).

Tabela 3: Prevalência de anticorpos IgG anti-*Neospora* sp. em amostras séricas de equinos por município de coleta no Recôncavo da Bahia

Cidades	Total de animais	Positivos	Prevalência (%)
Cabaceiras do Paraguaçu	40	15	38
Cachoeira	23	12	52
Castro Alves	14	08	57
Conceição do Almeida	08	03	38
Cruz das Almas	30	11	37
Dom Macedo Costa	21	08	38
Governador Mangabeira	20	13	65
Maragogipe	01	01	100
Muritiba	21	08	38
Santo Antônio de Jesus	16	08	50
São Felipe	04	02	50
São Félix	05	03	60
Sapeaçu	27	11	41
Varzedo	04	03	75

De acordo com a análise estatística realizada na população de estudo não foi encontrada correlação entre a variável resposta e as variáveis explicativas (sexo, idade, alimentação, fonte de água). A análise de probabilidade de ocorrência da doença relacionada com os fatores de plausibilidade biológica associados a prevalência de anticorpos anti-*Neospora* spp. está descrito na tabela 4.

Tabela 4: Fatores com plausibilidade biológica associados à prevalência de anticorpos IgG anti-*Neospora* spp. em amostras séricas de equinos do Recôncavo da Bahia

Variáveis	Equídeos		Probabilidade de ocorrência (IC 95%)	Valor de <i>p</i>
	Positivos N	%		
Sexo				
Macho	69	65,09	51,0	
Fêmea	37	34,90	61,0	
Equídeo jovem (<5anos)	28	26,41	66,8	0,017
Equídeo jovem (6 - 7anos)	25	23,58	38,0	0,062
Equídeo jovem (8 - 11anos)	34	32,07	62,0	1,000
Equídeo jovem (>12anos)	19	17,92	56,0	0,421
Presença de pequenos ruminantes				
Sim	07	6,60	55,0	0,910
Não	99	93,40	56,0	
Presença de cães				
Sim	88	83,01	58,0	0,664
Não	18	16,98	54,0	
Tipo de fonte de hidratação				
Ingestão de água de açude	27	25,47	56,0	0,877
Ingestão de água tratada	79	74,52	55,0	
Tipo de alimentação				
Ingestão de pasto	15	14,15	62,0	0,352
Ingestão de feno e ração	91	85,85	54,0	
Raça				
Quarto de milha	42	39,62	42,0	
Mangalarga machador	50	47,16	58,0	0,039
Paint horse	03	2,83	0,00	
Sem raça definida	11	10,37	73,0	0,001
Utilidade				
Trabalho	08	7,55	70,0	0,064
Esporte	98	92,45	53	

No estudo das cinquenta e duas propriedades em apenas 3,84% (2/52) apresentavam criação concomitante de equinos com pequenos ruminantes, em nenhuma delas havia criação de bovinos. A presença de cães foi verificada em 75% (39/52) das propriedades, não sendo verificada a presença de felinos domésticos nessas. O manejo empregado nas propriedades 48,07% (25/52) dos criadores mantinha os animais em baias com acesso a piquetes 19,23% (10/52) eram mantidos em apenas em piquetes e 32,69% (17/52) eram

mantidos apenas em baias. Quanto à utilidade dos animais testados 9,82% (23/234) eram exclusivamente utilizados para trabalho nas propriedades em questão, enquanto que 90,17% (211/234) eram utilizados para esporte. Sendo esses animais destinados ao esporte participantes de eventos no estado da Bahia.

DISCUSSÃO

O presente estudo é uma avaliação pioneira da presença de anticorpos IgG anti- *Neospora* spp. em equinos na região do recôncavo da Bahia. Sendo encontrada uma prevalência de 45,30%, considerada elevada, entretanto dentro dos valores já encontrados em estudos no Brasil, que apresenta uma variação de 2,3 a 57,6% (Hoane et al., 2006; Locattelli-Dittrich et al., 2006; Stelmann et al., 2011).

A Prevalência encontrada nesse estudo realizado no Recôncavo da Bahia foi semelhante aquela detectada em 2006 por Locatelli-Dittrich et al., (2006) no Paraná, utilizando também a RIFI como técnica sorológica, onde foram testadas 36 éguas em três coletas distintas. Na primeira detectaram anticorpos IgG anti-*Neospora* spp. em 17 (47%) delas, enquanto que na segunda coleta 30% da éguas foram consideradas positivas. Já na terceira coleta, o sangue dos potros dessas éguas foi colhido antes da ingestão do colostro e 22% deles apresentaram anticorpos IgG anti-*Neospora* sp, evidenciando a transmissão vertical do agente.

O percentual mais elevado de prevalência de anticorpos IgG anti-*Neospora* spp. em equinos registrados até então no Brasil foi em um estudo realizado por Stelmann et al. (2011). Nesse foram testados 26 amostras de soro e líquido cefalorraquidiano (LCR) de equinos com histórico de alterações neurológicas, pertencentes ao estado de São Paulo, testados através RIFI. Foi constatado uma soropositividade de 57,6% (15/26) para *Neospora* sp. nas amostras analisadas, entretanto não foi encontrado anticorpos no LCR, concluindo que as manifestações neurológicas não estavam relacionadas com a infecção pelo parasito.

Os estudos de prevalência tem grande importância, auxiliam na compreensão da epidemiologia e dos fatores de risco associados ao agente. Observa-se uma variação na prevalência de anticorpos IgG anti-*Neospora* spp. nos diferentes países (Cheadle et al, 1999; Dubey, et al, 1999; Grupta et al., 2002; Dubey et al., 2003; Bártová et al., 2015). Na Itália em 2004 em um estudo realizado com 150 equinos assintomáticos testados através da RIFI, foi encontrada uma soropositividade de apenas 10,5% (16/150) no ponto de corte de 1:50 (Ciaramella et al. 2004). Já na Coreia do Sul, Grupta et al, (2002), examinaram 101 animais os quais não tinha histórico de alterações clínicas. Esses foram previamente avaliados para a presença de anticorpos IgG anti-*S. neurona*, realizando-se a RIFI a fim de testá-los para *N. hughesi* e apenas 2% (4/191) dos animais foram considerados positivos num ponto de corte de 1:100.

Na França em 2003 em um grupo de éguas com histórico de abortamento, a soropositividade foi de 50% no título de 1:40 (27/54), entretanto os animais foram testados através da técnica de soroaglutinação (Pitel et. al., 2003). Packham et al., (1998) realizou um estudo comparativo entre técnicas sorológicas, no qual foram testados 16 espécies animais com infecções por *Neospora* sp. Nesse foram utilizadas a RIFI, o ELISA com extrato bruto total de antígeno e N-MAT como técnicas sorológicas. A RIFI apresentou uma especificidade de 99% quando comparada aos outros métodos diagnósticos, enquanto que o ELISA e o N-MAT apresentaram, respectivamente, 94 e 97% de especificidade.

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI), a técnica sorológica escolhida para esse estudo de prevalência é considerada um teste de referência dentre os métodos diagnósticos, em virtude de apresentar sensibilidade e especificidade satisfatória e pouca possibilidade de reação cruzada com outros coccídeos (Hemphill e Gottstein 2000). As espécies do gênero *Neospora* apresentam grande similaridade antigênica, permitindo a possibilidade de reação cruzada entre os métodos sorológicos empregados (Packham et al., 2000). As comparações de estudos de prevalência devem ser bastante criteriosas, uma vez que as diferenças antigênicas de cepas de *Neospora* spp. assim como o ponto de corte e variações na técnica podem promover alterações nos resultados (Dubey et al., 2007).

A prevalência de 45,30% encontrada evidencia que o *Neospora* spp. está amplamente distribuído nas propriedades coletadas, entretanto sem provocar alteração clínica nos animais. Esse fato pode ser justificado pelas características climáticas da região do recôncavo que por sua vez promove um ambiente bastante favorável para a esporulação dos oocistos de *Neospora* spp, que representa a forma infectante do parasito. Segundo Dubey et al., (2007) os oocistos de *Neospora* spp. esporulam mais rapidamente sob condições de temperaturas mais elevadas, corroborando com o estudo realizado por Wouda et al., (1999) que observaram surtos de abortamentos em vacas leiteiras numa maior proporção durante o verão, onde o clima torna-se mais quente e úmido. Da mesma forma, Moura et al. (2013) verificaram que os animais da região costeira de Santa Catarina apresentaram uma prevalência 2,2 vezes maior do que a observada entre os cavalos da região serrana. Sugerindo que regiões frias tendem a reduzir a soropositividade para *Neospora* spp..

Os resultados demonstram uma maior positividade na população de animais acima de cinco anos de idade, dado esse corroborado por Duarte et al. (2004) e Klingler et al., (2007). Esses autores constataram que quanto mais jovem o animal menor o risco de contrair a infecção por *N. hughesi*. Sugerindo assim que a transmissão dos equinos no Recôncavo da Bahia seja na sua maioria originada por uma transmissão horizontal. Além disso, a maioria dos animais estudados transita por eventos regionais, o que favorece o contato dos animais com o coccídeo, e, por conseguinte a aquisição da infecção (Moura et al, 2013; Sangioni et al., 2011).

A análise de probabilidade de ocorrência da doença evidencia que os animais abaixo de cinco anos tem uma maior probabilidade de contrair a infecção quando comparada com as outras idades. Sugerindo que essa porção da população de equinos analisada está mais propensa à transmissão transplacentária ou no início de sua vida. A infecção congênita por *Neospora* spp. em equinos é pouco relatada (Dubey e Porterfield, 1990; Lindsay et al., 1996), uma vez que as características placentárias dessa espécie apresenta um efeito protetor devido a sua melhor eficiência contra a infecção pelo *Neospora* spp. quando comparadas com as fêmeas bovinas (Pitel et al., 2003). A probabilidade de ocorrência da doença também apresentou diferença significativa com relação aos animais sem raça definida quando comparada as

outras raças, sendo mais elevada, verificando que esses animais podem estar possivelmente mais expostos ao *Neospora* spp. Esse fato pode ser justificado pelo manejo extensivo empregado, possibilitando um maior risco de infecção do que aqueles animais que ficam em baias ou criados em manejo semi-intensivo (Abreu et al., 2014; Villalobos et al., 2012).

Alguns fatores são considerados como de risco dentre eles, a presença de cães, de felinos, de ruminantes, uma vez que esses animais estão intimamente relacionados com a manutenção da infecção nos criatórios, participando direta ou indiretamente do ciclo do *Neospora* spp. (Wouda et al., 1999). O tipo de fonte hídrica e a alimentar são pontos críticos que estão relacionados com a presença dessas espécies, principalmente os cães e os felinos domésticos (Dubey et al., 2007). Uma vez que o local de armazenamento e a forma como são fornecidas para os animais, podem promover o fácil acesso de espécies domésticas, como os próprios cães ou até mesmo os gatos. Os cães podem ofertar risco, pois atuam como hospedeiros definitivos do parasito e uma vez nas pastagens têm acesso a restos placentários promovendo a manutenção do agente nas propriedades (Abreu et al., 2014; Moura et al., 2013). Sabe-se que gatos domésticos têm o hábito de rolar-se na areia e posteriormente nas pastagens, feno promovem a carregamento de oocistos presos ao pelo e conseqüentemente contaminação das fontes de alimentação destinadas aos animais (Frenkel e Parker, 1996). Em 75% das propriedades onde foram realizadas as coletas possuíam cães de forma que não foi possível verificar correlação entre esses fatores com a soropositividade a *Neospora* spp. nos equinos do Recôncavo da Bahia, uma vez que a espécie estava distribuída na maioria das propriedades.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados encontrados nesse primeiro estudo de soroprevalência com equinos realizados na região do Recôncavo da Bahia verifica-se que existe uma elevada prevalência de anticorpos anti-*Neospora* spp. nos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bártová, E, Machacova, T, Sedlak , K, Budikova, M, Mariani ,U, Veneziano, V, 2015. Seroprevalence of antibodies of *Neospora* spp. and *Toxoplasma gondii* in horses from southern Italy. *Folia Parasitology*, 6, 62.
- Ciaramella, P Corona, M, Cortese, L, Piantedosi, D, Santoro, D, Di Loria, A, Rigato, R, 2004. Seroprevalence of *Neospora* sp. in assymptomatic horses in Italy. *Veterinary Parasitology*, 123, p.11-15.
- Daft, BM, Barr, BC, Collins, N, Sverlow, K, 1996. *Neospora* encephalomyelitis and polyradiculoneuritis in an aged mare with Cushing's disease. *E. Vet. J.* 29, 240-243.
- Duarte, PC, Conrad, PA, Wilson, WD, Ferraro, GL, Packham, AE, Bowers-Lepore, J, Carpenter, TE, Gardner, IA, 2004. Risk of postnatal exposure to *Sarcocystis neurona* and *Neospora hughesi* in horses. *Am. J. Vet. Res.*, v.3, n.65, p.1047-52.
- Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A, 1988. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association* 192: 1269-1285.
- Dubey JP, Kerber, CE, Granstrom, DE, 1999. Serologic prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in horses from Brazil. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 215, 970-972.
- Dubey, JP, Liddel, S, Mattson, D, Speer, CA, Howe, DK, Jenkins, MC, 2001. Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. *J. Parasitol.*, 87, 345-353.
- Dubey, JP, Barr, BC, R, Bjerkås, I, Björkman, C, Blagburn, BL, Bowman, DD, Buxton, D, T, Gottstein, B, Hemphill, A, Hill, DE, Howe, DK, Jenkins, MC, Kobayashi, Y, Koudela, B, Marsh, AE, Mattsson, JG, Mcallister, MM, Modrý, D, Omata, Y, Sibley, LD, Speer, CA, Trees, AJ, Uggla, A, Upton, SJ, Williams, DJ, Lindsay, DS, 2002. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Inter. J. Parasitol.*, 32: 929-46.
- Dubey JP, Mitchell SM, Morrow JK, Rhyan JC, Stewart LM, Granstrom DE, Romand S, Thulliez P, Saville WJ, Lindsay DS. 2003c. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Toxoplasma gondii* in wild horses from central Wyoming. *J. Parasitol.*, 89:716-20.
- Dubey, JP, Schares, G, Ortega-Mora, LM, 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum* . *Clinical Microbiology Reviews* 20: 323-67.
- Finno,CJ,Aleman, M,Pusterla, N, 2007. Equine Protozoal Myeloencephalitis Associated with Neosporosis in 3 Horses. *J. Vet. Internal Med.*, 21, 1165–1423.
- Gondim, LFP, Pinheiro, AM, Santos, POM, Jesus, EEV, Ribeiro, MB, Fernandes, HS, Almeida, MAO, Freire, SM, Meyer, R, Mcallister, MM, 2001. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. *Vet. Parasitol.*, 101, 1-7.
- Gondim, LFP, Mcallister, MM, Pitt, WC, Zemlicka, DE, 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are the definitive host of *Neospora caninum* . *Inter. J. Parasitol.*, 34, 159-161.
- Gray, ML, Harmon, BG, Sales, L, Dubey, JP, 1996. Visceral neosporosis in a 10-years-old horse. *J. Vet. Diagnostic Investigation*, 8, 130-133.

- Gupta, GD, Lakritz, J, Kim, JH, Kim, DY, Kim, JK, Marsh, A E, 2002. Seroprevalence of *Neospora*, *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from Jeju island, South Korea. *Vet. Parasitol.*, v. 106, n. 3, p. 193-201.
- Hamir, NA, Tornquist, SJ, Gerros, TC, Topper, MJ, Dubey, JP, 1998. *Neospora caninum* - associated equine protozoal myeloencephalitis. *Vet. Parasitol.*, 79, 69-74.
- Hemphill, A, Gottstein, B. 2000. An European perspective on *Neospora caninum*. *Inter. J. Parasitol.*, 30, 877-924.
- Hoane, JS, Gennari, SM, Dubey, JP, Ribeiro, MG, Borges, AS, Yai, LE, Aguiar, DM, Cavalcante, GT, Bonesi, GL, Howe, DK, 2006. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora* spp. infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. *Vet. Parasitol.*, 136, 155-9.
- IGBE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo demográfico 2010a. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/tabelas_pdf/tab12.pdf>. Acesso em: 12 de maio de 2014.
- IGBE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo demográfico 2010 b. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=cd&o=5&i=P&c=608>>. Acesso em: 14 de maio de 2014.
- King, JS, Slapeta, J, Jenkins, DJ, Al-Qassab, SE, Ellis, JT, Windsor, PA, 2010. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Inter. J. Parasitol.*, 40, 945-950.
- Kligler, EB, Shkap, V, Baneth, G, Mildenberg Z, Steinman, A, 2007. Seroprevalence of *Neospora* sp. among asymptomatic horses, aborted mares and horses demonstrating neurological signs in Israel. *Vet. Parasitol.*, v.148, n.2, p.109-113.
- Kormann, DC, Locatelli-Dittrich, R, Richartz, RR, Antunes, J, Dittrich, JR, Patricio, LF, 2008. Seroprevalence and month dynamic of *Neospora* sp. antibodies in pregnant mares. *Revta. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 11, n.1, p. 335-338.
- NAHMS. 2001. Equine Protozoal Myeloencephalitis (EPM) in the U.S., USDA, APHIS, VS, Editors. Fort Collins, CO: Centers for Epidemiology and Animal Health.
- Lebart, L.; Salem, A. *Statistique textuelle*. Dunod (3ed): Paris, 2004. pp 108 - 135.
- Lindsay, DS, Dubey, JP, Duncan, RB, 1999. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.*, 82, 327-333.
- Lindsay DS. 2001. Neosporosis: an emerging protozoal disease of horses. *Equine Vet J.*, 33, 116-8.
- Locatelli-Dittrich, R, Dittrich, JR, Richartz, RR, Gasino Joineau, ME, Antunes, J, Pinckney, RD, Deconto, I, Hoffmann, DC, Thomaz-Soccol, V, 2006b. Investigation of *Neospora* sp. and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Parana State, Southern Brazil. *Vet. Parasitol.*, 135, 215-21
- Marsh, AE, Barr, BC, Packham, AE, Conrad, PA, 1998. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: *Apicomplexa*: *Sarcocystidae*). *J. Parasitol.*, 84, 983-991.
- Mcallister, MM, Dubey, JP, Lindsay, DS, Jolley, WR, Wills, RA, Mcguire, AM, 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Inter. J. Parasitol.*, 28, 1473-1478.
- Moura, AB, Silva, MO, Farias, JA, Neto, AV, Souza, AP, Sartor, AA, Fontequê, JH, Bunn, S, 2013. Anticorpos contra *Neospora* sp em equinos de duas regiões geográficas do Estado de Santa Catarina, Brasil. *Revt. Bras. de Parasitol. Vet.*, 22, 443-456.

Pitel PH, Pronost S, Romand S, Thulliez P, Fortier G, Ballet JJ, 2001. Reactivity against *Sarcocystis neurona* and *Neospora sp.* by serum antibodies in healthy French horses from two farms with previous equine protozoal myeloencephalitis-like cases. *Veterinary Parasitology*, v.111, n.1, p. 1-7.

Pitel, PH, Romand, S, Pronost, S, Foucher, N, Gargala, G, Maillard, K, Thulliez, P, Collobert-Laugier, C, Tainturier, D, Fortier, G, Ballet, JJ, 2003. Investigation of *Neospora sp.* antibodies in aborted mares from Normandy, France. *Vet. Parasitol.*, 118: 1-6

Sangioni, LA, Botton, SA, Cargnelutti, JF, Cadore, GC, Cezar, AS, Weiblen, R, Weiblen, R, Lopes, STA, Vogel, FSF, 2011. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora spp.* e anti-herpesvirus equino em cavalos de tração no município de Santa Maria, RS, Brasil. *Ciê. Rural*, v. 41, n. 2, p. 321-323.

Superintendência de Estudos Econômicos e Sociais da Bahia. Estatística dos municípios baianos. Salvador: SEI, 2010. v. 13; 382 p.

Stelmann, UJP, Ullmann, LS, Langoni, H, Amorim, RM, 2011. Equine neosporosis: search for antibodies in cerebrospinal fluid and sera from animals with history of ataxia. *Rev. Bras. Med. Vet.* 33: 99-102.

Wouda, W.; Dijkstra, T.H.; Kramer, A.M.H.; Van Maanen, C.; Brinkhof, J.M.A. 1999. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infection in dogs and cattle. *Intern. J. Parasitol.*, 29, 1677-1682.

Walsh CP, Duncan RB, Zajac AM, Blagburn BL, Lindsay DS, 2000. *Neospora hughesi*: Experimental infections in mice, gerbils and dogs. *Vet. Parasitol.*, 98, 119-129.

Yeargan MR, Alvarado-Esquível C, Dubey, JP, Howe DK, 2013. Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* and *Neospora hughesi* in horses from Mexico. *Parasite* 20:29.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A elevada prevalência verificada nos equinos do recôncavo da Bahia indica provavelmente, que exista contaminação ambiental por oocistos, favorecendo a transmissão horizontal da doença;
- Os animais de até cinco anos tem uma maior probabilidade de desenvolvimento da doença. Isso indica, possivelmente, que os animais desse estudo podem se infectarem com o *Neospora* spp. ainda na vida uterina ou no início da vida. Assim também como os animais sem raça definida tem uma maior probabilidade de adquirir a infecção, sugerindo que essa significativa probabilidade se deva ao fato do manejo destinado a esses animais.
- Mais estudos a respeito do *Neospora* spp. são necessários para conhecer melhor esse protozoário, as diferenças de suas espécies e as implicações na sanidade equina.

REFERÊNCIAS

- ABREU, R.A., WEISS, R.R., THOMAZ-SOCCOL, V., LOCATELLI-DITTRICH, R., LASKOSKI, L.M., BERTOL, M.A.F., KOCH, M.O., ALBAN, S.M., GREEN, K.T. 2014. Association of Antibodies against *Neospora caninum* in Mares with Reproductive Problems and Presence of Seropositive Dogs as a Risk Factor. **Veterinary Parasitology** 202:128-131.
- ALMERÍA, S.; VIDAL, D.; FERRER, D.; PABÓN, M.; FERNÁNDEZ-DE-MERA, M.I.G.; RUIZ-FONS, F.; ALZAGA, V.; MARCO, I.; CALVETE, C.; LAVIN, S.; GORTAZAR, C.; LÓPEZ-GATIUS, F.; DUBEY, J.P. 2007. Seroprevalence of *Neospora caninum* in non-carnivorous wildlife from Spain. **Veterinary Parasitology** 143: 21-28.
- ANDERSON, M.L.; ANDRIANARIVO, A.G.; CONRAD, P.A. 2000. Neosporosis in cattle. *Animal Reproduction Science* 60-61: 417-431.
- ANDREOTTI, R.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V. T.; PAIVA, F. 2003. Diagnóstico e Controle da Neosporose em bovinos. **EMBRAPA** 51: 1517-3747.
- ANTONELLO, A. M.; PIVOTO, F. L.; CAMILLO, G.; BRAUNIG, P.; SANGIONI, L. A.; POMPERMAYER, E.; VOGEL, F. S. The importance of vertical transmission of *Neospora spp.* in naturally infected horses. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 3-4, p. 367-70, 2012.
- ATKINSON, R.; HARPER, P.A.; REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. 2000. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. **Parasitology Today** 16: 110-114.
- BARR, B.C.; ROWE, J.D.; SVERLOW, K.W.; BONDURANT, R.H.; ARDANS, A.A.; OLIVER, M.N.; CONRAD, P.A. 1994. Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 6: 207-215.
- BARTELS, C. J.; ARNAIZ-SECO, J. I.; RUIZ-SANTA-QUITERA, A.; BJORKMAN, C.; FROSSLING, J.; VON BLUMRODER, D.; CONRATHS, F. J.; SCHARES, G.; VAN MAANEN, C.; WOUDA, W.; ORTEGA-MORA, L. M. 2006. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. **Veterinary Parasitology** 137: 17-27,
- BÁRTOVÁ, E.; SEDLÁK, K.; LITERÁK, I. 2006. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in wild boars in the Czech Republic. **Veterinary Parasitology** 142: 150-153.
- BÁRTOVÁ, E.; MACHACOVA, T.; SEDLAK, K.; BUDIKOVA, M.; MARIANI, U.; VENEZIANO, V. 2015. Seroprevalence of antibodies of *Neospora spp.* and *Toxoplasma gondii* in horses from southern Italy. **Folia Parasitology (Praha)** 6: 62.
- BIELSA, J.M.; ROMERO, J.J.; HEUER, C. 2004. Controle de Neosporose em bovinos com Bovilis Neoguard: a experiência de campo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**: 13.
- BJERKAS, L.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. 1984. Unidentified cyst-forming Sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde** 70: 271-274.
- BJORKMAN, C.; LUNDEN A.; HOLMDAHL, J.; BARBER, J.; TREES, A.J.; UGGLA, A. 1994. *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. **Parasite Immunology** 16: 643-648.
- BJÖRKMAN, C.; JOHANSSON, O.; STENLUND, S. 1996. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 208: 1441-1444.

- BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. 1999. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology** 29: 1497-1507.
- BJÖRKMAN, C.; JAKUBEK, E. –B.; ARNEMO, J. M.; MALMSTEN, J. 2010. Seroprevalence of *Neospora caninum* in gray wolves in Scandinavia. **Veterinary Parasitology** 173: 139-142.
- BRAUTIGAM, C. P.; HIETALA, S. K.; GLASS, R. 1996. Resultados de levantamento sorológico para espécie *Neospora* em bovinos de corte e leite. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15. Campo Grande. **Associação Panamericana de Ciências Veterinária**: 284.
- BUXTON, D.; MCALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P. 2002. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology** 18: 546-52.
- CABAJ, W.; MOSKWA, B.; PASTUSIAK, K.; GILL, J. 2005. Antibodies to *Neospora caninum* in the blood of European bison (*Bison bonasus bonasus* L.) living in Poland. **Veterinary Parasitology** 128: 163-168.
- CHEADLE, M.A.; LINDSAY, D.S.; ROWE, S.; DYKSTRA, C.C.; WILLIAMS, M.A.; SPENCER, J.A.; TOIVIOKINNUCAN, M.A.; LENZ, S.D.; NEWTON, J.C.; ROLSMA, M.D.; BLAGBURN, B.L. 1999. Prevalence of antibodies to *Neospora* sp. in horses from Alabama and characterization of an isolate recovered from a naturally infected horse. **International Journal for Parasitology** 29: 537-1543.
- CIARAMELLA, P.; CORONA, M.; CORTESE, L.; PIANTEDOSI, D.; SANTORO, D.; Di LORIA, A.; RIGATO, R. 2004. Seroprevalence of *Neospora* spp. in asymptomatic horses in Italy. **Veterinary Parasitology** 123: 11-15.
- Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil – Brasília: CNA 2006. Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalo no Brasil - **Coletânea Estudos Gleba** 40: 68.
- COLE, R.A.; LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; SORJONEN, D.C.; DUBEY, J.P. 1995. Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. **The Journal of Parasitology** 81: 208-211.
- DAFT, B.M.; BARR, B.C.; COLLINS, N.; SVERLOW, K. 1996. *Neospora* encephalomyelitis and polyradiculoneuritis in an aged mare with Cushing's disease. **Equine Veterinary Journal** 29: 240-243.
- DARWICH, L.; CABEZÓN, O.; ECHEVERRIA, I.; PABÓN, M.; MARCO, I.; MOLINA-LÓPEZ, R.; ALARCIA-ALEJOS, O.; LÓPEZ-GATIUS, F.; LAVÍN, S.; ALMERÍA S. 2011. Presence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* DNA in the brain of wild birds. **Veterinary Parasitology** 183: 377-381.
- DAVIDSON, H.C.; OTTER, A.; TREES, A.J. 1999. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. **International Journal for Parasitology** 29:1683-1689.
- DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H. W.; EYSKER, M.; WOUDA, W. 2001. Evidence of postnatal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. **International Journal for Parasitology** 31: 209-215.
- DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. 1988a. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association** 192: 1269-1285.
- DUBEY, J.P.; HATTEL, A.L.; LINDSAY, D.S.; TOPPER, M.J. 1988b. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 193:1259-1263.

- DUBEY, J.P.; PORTERFIELD, M.L. 1990. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. **International Journal for Parasitology** 76: 732-734.
- DUBEY, J.P.; DE LAHUNTA, A. 1993. Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf. **Applied Parasitology** 34: 229-233.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology** 67: 1-59.
- DUBEY, J.P.; DOROUGH, K.R.; JENKINS, M.C.; LIDDEL, S.; SPEER, C.A.; KWOK, O.C.H.; SHEN, S.K. 1998. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. **International Journal for Parasitology** 28: 1293-1304.
- DUBEY, J.P.; VENTURINI, M.C.; VENTURINI, L.; MCKINNEY J.; PECORARO M. 1999a. Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses from Argentina. **Veterinary Parasitology** 86: 59-62.
- DUBEY J.P.; KERBER, C.E.; GRANSTROM. D.E. 1999b. Serologic prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in horses from Brazil. **Journal of American Veterinary Medicine Association** 215: 970-972.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; KERBER, C.E.; KASAI, N.; PENA, H.F.; GENNARI, S.M.; KWOK, O.C.; SHEN, S.K.; ROSENTHAL, B.M. 2001a. First isolation of *Sarcocystis neurona* from the South American opossum, *Didelphis albiventris*, from Brazil. **Veterinary Parasitology** 95: 295-304.
- DUBEY, J.P., LIDDEL, S., MATTSON, D., SPEER, C.A., HOWE, D.K., JENKINS, M.C. 2001b. Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. **The Journal of Parasitology** 87: 345-353.
- DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R.; BJERKÅS, I.; BJÖRKMAN, C.; BLAGBURN, B.L.; BOWMAN, D.D.; BUXTON, D.; ELLIS, J.T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D.E.; HOWE, D.K.; JENKINS, M.C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A.E.; MATTSSON, J.G.; MCALLISTER, M.M.; MODRÝ, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L.D.; SPEER, C.A.; TREES, A.J.; UGGLA, A.; UPTON, S.J.; WILLIAMS, D.J.; LINDSAY, D.S. 2002. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology** 32: 929-46.
- DUBEY, J. P. 2003a. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology** 41: 1-16.
- DUBEY, J. P.; ZARNKE, R.; THOMAS, N. J.; WONG, S. K.; VAN BONN, W.; BRIGGS, M.; DAVIS, J. W.; EWING, R.; MENSE, M.; KWOK, O. C. H.; ROMAND, S.; THULLIE, P. 2003b. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. **Veterinary Parasitology** 116: 275-296.
- DUBEY JP, MITCHELL SM, MORROW JK, RHYAN JC, STEWART LM, GRANSTROM DE, ROMAND S, THULLIEZ P, SAVILLE WJ, LINDSAY DS. 2003c. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Toxoplasma gondii* in wild horses from central Wyoming. **Jornal Parasitol**, 89:716-20.
- DUBEY, J. P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. 2006. Pathogenesis of Bovine Neosporosis. **Jornal of Comparative Pathology** 134: 267-289.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews** 20: 323-67.

DUBEY, J.P. JENKINS, M.C.; RAJENDRAN, C.; MISKA, K.; FERREIRA, L.R.; MARTINS, J.; KWOK, O.C.; CHOUDHARY, S. 2011a. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology** 18: 456- 62.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. 2011b Neosporosis in animals-The last five years. **Veterinary Parasitology**.

FINNO, C.J.; ALEMAN, M.; PUSTERLA, N. 2007. Equine Protozoal Myeloencephalitis Associated with Neosporosis in 3 Horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 21: 1165–1423.

FINNO, C. J.; EATON, S. J.; ALEMAN, M.; HOLLINGSWORTH, S. R. 2010. Equine protozoal myeloencephalitis due to *Neospora hughesi* and equine motor neuron disease in a mule. **Veterinary Ophthalmology** 13:259-265.

FRENKEL, J. K.; PARKER, B. B. 1996. An apparent role of dogs in the transmission of *Toxoplasma gondii*. The probable importance of xenosmophilia. **Academy of Science** 791: 402- 407.

FUEHRER, H. P.; BLÖSCHL, I.; SIEHS, C.; HASSL, A. 2010. Detection of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Encephalitozoon cuniculi* in the brains of common voles (*Microtus arvalis*) and water voles (*Arvicola terrestris*) by gene amplification techniques in western Austria (Vorarlberg). **Parasitology Research** 107: 469-473.

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

GONDIM, L.F.; SARTOR, I.F.; HASEGAWA, M.; YAMANE, I. 1999. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology** 86: 71–75.

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

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

GRAY, M.L., HARMON, B.G., SALES, L., DUBEY, J.P. 1996. Visceral neosporosis in a 10-years-old horse. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 8: 130-133.

GUPTA, G.D.; LAKRITZ, J.; KIM, J.H.; KIM, D.Y.; KIM, J.K.; MARSH, A.E. 2002. Seroprevalence of *Neospora*, *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from Jeju island, South Korea. **Veterinary Parasitology** 106: 193-201.

HAMIR, A. N.; TORNQUIST, S. J.; GERROS, T. C.; TOPPER, M. J.; DUBEY, J. P. 1998. *Neospora caninum* -associated equine protozoal myeloencephalitis. **Veterinary Parasitology** 79: 69-74.

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B. 2000. An European perspective on *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology** 30: 877-924.

HOANE, J.S.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; RIBEIRO, M.G.; BORGES, A.S.; YAI, L.E.; AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; BONESI, G.L.; HOWE, D.K. 2006. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora* spp. infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. **Veterinary Parasitology** 136: 155-9

- IGBE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010. <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/tabelas_pdf/tab12.pdf>. Acesso em: 12 de maio de 2014.
- JAKUBEK, E. –B.; BRÖJER, C.; REGNERSEN, C.; UGGLA, A.; SCHARES, G.; BJÖRKMAN, C. 2001. Seroprevalences of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Swedish red foxes (*Vulpes vulpes*). **Veterinary Parasitology** 102: 167-172.
- JENKINS, M.C.; BASZLER, T.; BJORKMAN, C.; SCHARES, G.; WILLIAMS, D. 2002. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum* -associated abortion. **International Journal for Parasitology** 32: 631-636.
- JENKINS, M.C.; PARKER, C.; HILL, D.; PINCKNEY, R.D.; DYER, R.; DUBEY, J.P. 2007. *Neospora caninum* detected in feral rodents. **Veterinary Parasitology** 143: 161-165.
- KAUFMANN H.; YAMAGE M.; RODITI I.; DOBBELAERE D.; DUBEY J.P.; HOLMDAHL, O.J.; TREES A.; GOTTSTEIN B. 1996. Discrimination of *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites by hybridization and PCR. **Molecular and Cellular Probes** 10: 289-297.
- KING, J. S.; SLAPETA, J.; JENKINS, D. J.; AL-QASSAB, S. E.; ELLIS, J. T.; WINDSOR, P. A. 2010. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum* . **International Journal for Parasitology** 40: 945-950.
- LINDSAY, D.S.; DUBEY J.P. 1989. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **American Journal of Veterinary Research** 50:1981-3.
- LINDSAY, D.S., STEINBERG, H., DUBIELZIG, R.R., SEMRAD, S.D., KONKLE, D.M., MILLER, P.E., BLAGBORN, B.L. 1996. Central nervous system neosporosis in a foal. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 8: 507-510.
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. 1999. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum* . **Veterinary Parasitology** 82: 327-333.
- LINDSAY DS. Neosporosis: an emerging protozoal disease of horses. 2001. **Equine Veterinary Journal** : 33: 116-8.
- LINDSAY, D. S.; WESTON, J. L.; LITTLE, S. E. 2001. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) from South Carolina. **Veterinary Parasitology** 97: 159-164.
- LYONS, R. E.; McLEOD, R.; ROBERTS, C. W. 2002. *Toxoplasma gondii* tachyzoitebradyzoite interconversion. **Trends Parasitology** 18:198-201.
- LOCATELLI-DITTRICH, R.; HOFFMANN, D.C.S.; DITTRICH, J.R. . 2006a NEOSPOROSE EQUINA – REVISÃO. **Archives of Veterinary Science** 11: 1-10.
- LOCATELLI-DITTRICH, R.; DITTRICH, J. R.; RICHARTZ, R. R.; GASINO JOINEAU, M. E.; ANTUNES, J.; PINCKNEY, R. D.; DECONTO, I.; HOFFMANN, D. C.; THOMAZ-SOCCOL, V. 2006b. Investigation of *Neospora* sp. and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Parana State, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology** 135: 215-21.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2015 <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>. Acesso em: 10 de novembro de 2015.
- MARSH, A.E.; BARR, B.C.; PACKHAM, A.E.; CONRAD, P.A. 1998. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **The Journal of Parasitology** 84: 983-991.

- MARSH, A.E.; HOWE, D.K.; WANG, G.; BARR, B.C.; CANNON, N.; CONRAD, P.A. 1999. Differentiation of *Neospora hughesi* from *Neospora caninum* based on their immunodominant surface antigen, SAG1 and SRS2. **International Journal for Parasitology** 29: 1575- 1582.
- MCALLISTER, M.M., DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., JOLLEY, W.R., WILLS, R.A., McGUIRE, A.M. 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum* . **International Journal of Parasitology** 28: 1473-1478.
- MOURA, A. B.; SILVA, M. O.; FARIAS, J. A.; NETO, A. V.; SOUZA, A. P.; SARTOR, A. A.; FONTEQUE, J. H.; BUNN, S. 2013. Anticorpos contra *Neospora* spp em equinos de duas regiões geográficas do Estado de Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 22: 443-456.
- MULLER, N.; VONLAUFEN, N.; GIANINAZZI, C.; LEIB, S. L.; HEMPHIL, A. 2002. Application of real-time fluorescent PCR for quantitative assessment of *Neospora caninum* infections in organotypic slice cultures of rat central nervous system tissue. **Journal of Clinical Microbiology** 40: 252-255.
- OSHIRO, L. M.; SILVA, D. C.; REIS, F. A.; ANDREOTTI, R. 2013. Neosporose: alerta para um possível problema reprodutivo em ovinos e caprino. **Embrapa Gado de Corte** 26: 195.
- O'TOOLE, D.; JEFFREY, M. 1987. Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. **The Veterinary Record** 121: 563-566.
- PACKHAM, A.E.; SVERLOW, K.W.; CONRAD, P.A.; LOOMIS, E.F.; ROWE, J.D.; ANDERSON, M.L.; MARSH, A.E.; CRAY, C.; BARR, B.C. 1998. A modified agglutination test for *Neospora caninum* : development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology** 5: 467-473.
- PACKHAM, A.E.; CONRAD, P.A.; WILSON, W.D.; JEANES, L.V.; SVERLOW, K.W.; GARDNER, I.A.; DAFT, B.M.; MARSH, A.E.; BLAGBURN, B.L.; FERRARO, G.L.; BARR, B.C. 2002. Qualitative evaluation of selective tests for detection of *Neospora hughesi* antibodies in serum and cerebrospinal fluid of experimentally infected horses. **Veterinary Parasitology** 88: 1239-46.
- PETERS, M.; WOHLSEIN, P.; KNIERIEM, A.; SCHARES, G. 2001. *Neospora caninum* infection associated with stillbirths in captive antelopes (*Tragelaphus imberbis*). **Veterinary Parasitology** 97: 153-157.
- PITEL, P. H.; ROMAND, S.; PRONOST, S.; FOUCHER, N.; GARGALA, G.; MAILLARD, K.; THULLIEZ, P.; COLLOBERT-LAUGIER, C.; TAINTURIER, D.; FORTIER, G.; BALLEZ, J.J. 2003. Investigation of *Neospora* sp. antibodies in aborted mares from Normandy, France. **Veterinary Parasitology** 118: 1-6.
- PRONOST, S.; PITEL, P.H.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; COLLOBERT, C.; FORTIER, G. 1999. *Neospora caninum* : first case in France in an aborted equine fetus. **Pratique Veterinaire Equine** 31: 111-114.
- PUSTERLA, N.; CONRAD, P.A.; PACKHAM, A. E.; MAPES, S.M.; FINNO, C.J.; GARDNER, I. A.; BARR, B.C.; FERRARO, G.L.; WILSON, W.D. 2011. Endogenous transplacental transmission of *Neospora hughesi* in naturally infected horses. **Journal of Parasitology** 97: 281-285.
- QUEVEDO, P. S.; AVILA, L.F.C.; SAGGIN, A.; SILVEIRA, R. T.; FEIJÓ, S.L.; FREY, F.J.; CURCIO, B.R.; FARIAS, N.A.R. 2015. Verificação da transmissão vertical de *Neospora* spp. em equinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 35: 1678-5150.

- REICHEL, M.P.; AYANEGUI-ALCÉRRECA, M.A.; GONDIM, L.F.P.; ELLIS, J.T. 2013. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – The billion dollar question. **International Journal for Parasitology** 43:133–142
- SANGSTER, C.; BRYANT, B.; CAMPBELL-WARD, M.; KING, J. S.; ŠLAPETA, J. 2010. Neosporosis in an Aborted Southern White Rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) Fetus. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine** 41: 725-728.
- SOBRINO, R.; DUBEY, J. P.; PABÓN, M.; LINAREZ, N.; KWOK, O. C.; MILLÁN, J.; ARNAL, M. C.; LUCO, D. F.; LÓPEZ-GATIUS, F.; THULLIEZ, P.; GORTÁZAR, C.; ALMERÍA, S. 2008. *Neospora caninum* antibodies in wild carnivores from Spain. **Veterinary Parasitology** 155: 190-194.
- SPENCER, J.A.; WITHEROW, A.K.; BLAGBURN, B.L. 2000. A random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction technique that differentiates between *Neospora* species. **Journal of Parasitology** 86: 1366-1368.
- STELMANN, U. J. P.; AMORIM, R.M. 2010. Mieloencefalite protozoária equina. **Veterinária e Zootecnia** 17: 163-176.
- STELMANN, U. J. P.; ULLMANN, L. S.; LANGONI, H.; AMORIM, R.M. 2011. Equine neosporosis: search for antibodies in cerebrospinal fluid and sera from animals with history of ataxia. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** 33: 99-102.
- TALAFHA A.Q.; ABUTARBUSH S.M.; RUTLEY D.L. 2015. Seroprevalence and Potential Risk Factors Associated with *Neospora* spp. Infection among Asymptomatic Horses in Jordan. **Korean Journal Parasitology** 53:163-7
- THILSTED, J.P.; DUBEY, J.P. 1989. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation** 1: 205-209.
- TIEMANN, J. C. H.; SOUZA, S. L. P.; RODRIGUES, A. A. R.; DUARTE, J. M. B.; GENNARI, S. M. 2005. Environmental effect on the occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in pampas-deer (*Ozotoceros bezoarticus*). **Veterinary Parasitology** 134: 73-76.
- TOSCAN G.; CADORE G.C.; PEREIRA R.C. F.; SILVA G. B.; CEZAR A. S.; SANGIONI L. A.; OLIVEIRA, L.S. S.; VOGEL, F.S.F. 2010. Equine neosporosis: occurrence of antibodies against *Neospora* spp. and association between the serological status of the mares and of their offspring. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 30: 641-64.
- TRUPPEL, J. H.; MONTIANI-FERREIRA, F.; LANGE, R. R.; VILANI, R. G. D'O. C.; REIFUR, L.; BOERGER, W.; COSTA-RIBEIRO, C. V.; THOMAZ-SOCCOL, V. 2010. Detection of *Neospora caninum* DNA in capybaras and phylogenetic analysis. **Parasitology International** 59: 376-379.
- VAN MAANEN, C.; WOUDA, W.; SCHARES, G.; VON BLUMRODER, D.; CONRATHS, F. J.; NORTON, R.; WILLIAMS, D. J.; ESTEBAN-REDONDO, I.; INNES, E. A.; MATTSSON, J. G.; BJORKMAN, C.; FERNANDEZ-GARCIA, A.; ORTEGA-MORA, L. M.; MULLER, N.; SAGER, H.; HEMPHILL, A. 2004. An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. **Veterinary Parasitology** 126:351-64
- VARDELEON, D., MARSH, A.E., THORNE, J.G., LOCH, W., YOUNG, R., JOHNSON, P.J. 2001. Prevalence of *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from various geographical locations. **Veterinary Parasitology** 95: 273-282.
- VILLALOBOS, E.M.C.; UENO, T.E.H.; SOUZA, S.L.P.; CUNHA, E.M.S.; LARA, M.C.C.S.H.; GENNARI, S.M.; SOARES, R.M. 2006. Association between the presence of serum antibodies against *Neospora* spp. and fetal loss in equines. **Veterinary Parasitology** 142: 372-375.

- WALSH C.P.; DUNCAN R.B.; ZAJAC A.M.; BLAGBURN B.L.; LINDSAY D.S. 2000. *Neospora hughesi*: Experimental infections in mice, gerbils and dogs. **Veterinary Parasitology** 98: 119-129.
- WALSH, C. P.; VEMULAPALLI, R.; SRIRANGANATHAN, N.; ZAJAC, A. M.; JENKINS, M. C.; LINDSAY, D. S. 2001. Molecular comparison of the dense granule proteins GRA6 and GRA7 of *Neospora hughesi* and *Neospora caninum* . **International Journal for Parasitology** 31: 253-8.
- WOBESER, B. K.; GODSON, D. L.; REJMANEK, D.; DOWLING, P. 2009 Equine protozoal myeloencephalitis caused by *Neospora hughesi* in an adult horse in Saskatchewan. **The Canadian Veterinary Journal** 50: 851-3.
- WOLF, D.; SCHARES, G.; CARDENAS, O.; HUANCA, W.; CORDERO, A.; BÄRWALD, A.; CONRATHS, F. J.; GAULY, M.; ZAHNER, H.; BAUER, C. 2005. Detection of specific antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in naturally infected alpacas (*Lama pacos*), llamas (*Lama glama*) and vicuñas (*Lama vicugna*) from Peru and Germany. **Veterinary Parasitology** 130: 81-87.
- WOUDA, W.; MOEN, A.R.; VISSER, I.J.R.; VAN KNAPPEN, F. 1997. Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different ge classes with regards to lesion severity and immunohistochemical identification in brain, heart and liver. **Journal of Veterinary Diagnosis and Investigations** 9: 180-185.
- WOUDA, W.; DIJKSTRA, T.H.; KRAMER, A.M.H.; van MAANEN, C.; BRINKHOF, J.M.A. 1999. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infection in dogs and cattle. **International Journal for Parasitology** 29: 1677-1682.
- YAI, L. E.; CAÑÓN-FRANCO, W. A.; GERALDI, V. C.; SUMMA, M. E.; CAMARGO, M. C.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. 2003. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) from the city of São Paulo, Brazil. **The Journal of Parasitology** 89: 870-87.
- YEARGAN, M. R.; ALVARADO-ESQUIVEL, C.; DUBEY, J. P.; HOWE, D. K. 2013. Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* and *Neospora hughesi* in horses from Mexico. **Parasite** 20:29.

APÊNDICES

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

Questionário epidemiológico para neosporose em equinos

QUESTIONÁRIO RESPONDIDO: () PROPRIETÁRIO () GERENTE

INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO PARA NEOSPOROSE EM EQUINOS

I. Identificação do animal

Nome do animal: _____

Raça: _____ Idade: _____

Sexo: _____

Utilidade: () Lazer () Serviço () Reprodução () Esporte
() outra Qual? _____

Proprietário: _____ Telefone: _____

Município: _____

II. Propriedade

Nome da propriedade: _____

Tipo de propriedade: () Haras () Rancho () Fazenda () Outros

Número total de equinos: _____

Predomínio de raça: _____

III. Aquisição dos animais

Local onde compra os equinos: () Feiras () Comerciantes locais

() Leilões () Outros

IV. Manejo

Manejo: () Pasto () Baia () Baia/Piquete ou pasto

Alimentação: () Ração () Pastagem () Feno

() Outra, qual? _____

Doença recente? () Sim () Não

Qual? _____

Tratamento: _____

V. Sanidade

Foi observado casos de alteração neurológica nos equinos da propriedade?

() Sim () Não

Qual? _____

Foi observado casos de abortos nos equinos da propriedade?

() Sim () Não

Já foi notado cios recorrente? () Sim () Não

VI. Associação com outros animais

Tem outros animais na propriedade?

 Sim Não

Quais?

 Bovinos Caprinos Ovinos Felinos Cães

Galinhas

Os equinos tem contato com esses outros animais?

 Sim Não Quais? _____Em relação aos cães, eles têm contato com os equinos? Sim NãoQuantos? _____ Sexo dos cães: F MSe fêmea, já ficou gestante alguma vez? Sim NãoNotou-se alguma alteração nos filhotes? Sim Não

Qual? _____

Procedência do(s) cão(s): Canil Errante DomiciliadoRelação de parentesco com os outros cães do ambiente: Sim Não

Qual? _____

Ambiente dos cães: Selas individuais Selas coletivas SoltosVacinação: Nunca Atrasadas Em diasVermifugação: Sim Não

Frequência: _____

Doenças recentes: Sim Não

Tratamento realizado: _____

VII. Armazenamento dos alimentos e reserva hídrica

Em relação ao local de armazenamento do alimento do equino é fechado?

 Sim Não

Tem possibilidade de o cão ter acesso ao local do alimento do equino?

 Sim Não

Em relação à água para os equinos beberem, é proveniente de?

 Rios Lagos Água encanada de poço artesiano

E os outros animais também bebem dessa mesma água?

VIII. Observações:
