



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

PAULO CESAR GONÇALVES DE AZEVEDO FILHO

**SOROEPIDEMIOLOGIA DA NEOSPOROSE E TOXOPLASMOSE BOVINANO
ESTADO DO AMAZONAS, BRASIL**

RECIFE

2019

PAULO CESAR GONÇALVES DE AZEVEDO FILHO

**SOROEPIDEMIOLOGIA DA NEOSPOROSE E TOXOPLASMOSE BOVINA NO
ESTADO DO AMAZONAS, BRASIL**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal Tropical, como parte dos
requisitos para obtenção do título de doutor em
Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota
Co-orientadora: Prof^a. Dra^a Sandra Regina Fonseca
de Araújo Valença

RECIFE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A994s Azevedo Filho, Paulo Cesar Gonçalves de Azevedo Filho
SOROEPIDEMIOLOGIA DA NEOSPOROSE E TOXOPLASMOSE BOVINA NO ESTADO DO AMAZONAS,
BRASIL / Paulo Cesar Gonçalves de Azevedo Filho Azevedo Filho. - 2019.
99 f. : il.
- Orientador: Rinaldo Aparecido Mota.
Coorientador: Sandra Regina Fonseca de Araújo Valen Valença.
Inclui referências, apêndice(s) e anexo(s).
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Recife, 2019.
1. Toxoplasma gondii. 2. Neospora caninum. 3. Saúde Pública. 4. Floresta Amazônica.. 5. Perdas econômicas. I. Mota, Rinaldo Aparecido, orient. II. Valença, Sandra Regina Fonseca de Araújo Valen, coorient. III. Título

CDD 636.089

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas as normas de ética científica.

Paulo Cesar Gonçalves de Azevedo Filho

Aprovada em 20 de dezembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota (Orientador)
Departamento de Medicina Veterinária (DMV/UFRPE)

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior
Departamento de Medicina Veterinária (DMV/UFRPE)

Prof. Dr. Muller Ribeiro Andrade
Departamento de Medicina Veterinária (DMV/UFRR)

Prof. Dr. Júnior Mário Baltazar de Oliveira
Departamento de Medicina Veterinária (UNIFAVIP)

Prof^ª. Dr^ª. Érika Fernanda Torres Samico Fernandes Cavalcanti
Departamento de Medicina Veterinária (DMV/UFRPE)

*Dedico esta tese a meus
Avós, Joaquim, Maria,
Zezito e Eulina,
por todos os ensinamento,
valores e dedicação a família*

*Aos meus familiares,
por todo amor, compreensão,
apoio e incentivo a mim dedicados,
em todos os anos da minha vida.
Com amor, carinho e orgulho, dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me concedido o dom da vida, saúde e força para superar todas as dificuldades até chegar aqui!

Às grandes mulheres da minha vida, Ana Margareth Azevedo, Natalia Azevedo e Alyane, partilho a alegria deste momento, pois sou imensamente grato por todas as palavras de apoio, incentivo e otimismo. Obrigado por sempre me incentivar, mesmo nos momentos difíceis onde pensei até em desistir, a alcançar caminhos cada vez mais distantes.

Aos meus irmãos Paulo Henrique, Paulo Vitor, que nos momentos de minha ausência dedicados aos trabalhos e estudos, sempre me fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente. Vocês mais do que ninguém, sabem a importância deste doutorado para mim.

Aos meus avôs, avós, tios e tias, primos e primas, que sempre me incentivaram e me deram carinho para continuar seguindo em frente na constante busca pelo conhecimento.

Ao pai que Deus colocou em minha vida, Paulo Cesar Gonçalves de Azevedo. Nem mesmo a grande distância nos separou, pois, seus ensinamentos sempre estarão comigo. Obrigado por ter me ensinado a acreditar mais em mim!

À família Azevedo, Neves, Connolly e tantas outras que me ensinaram a dar valor as coisas mínimas da vida e a acreditar nos nossos sonhos, mesmo perante as dificuldades encontradas nos nossos caminhos nunca deixaram de me dar apoio, força, paciência, amizade e amor. Jamais me esquecerei de vocês.

À professora e mãe Sônia Fulco que sempre se fez presente e uma das maiores incentivadoras do meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Professor Leonildo Galiza da Silva que me mostrou os primeiros passos da pesquisa científica.

Ao meu grande orientador, educador e pai Rinaldo Aparecido Mota, obrigado por me mostrar o caminho da ciência, sempre ter acreditado em mim, por seu apoio, além de sua dedicação e competência. O considero um exemplo a ser seguido, um excelente pesquisador, professor, orientador e acima de tudo, um grande amigo!

Aos companheiros de trabalhos e irmãos na amizade que sempre continuarão presentes em minha vida, Müller Ribeiro, Jomel, Navarro, Eduardo, Renata, Givanildo, Gabi, Breno, Bruno e tantos outros que se dedicaram a realização deste trabalho e que tanto me ajudaram nessa jornada, sem vocês eu não teria conseguido; meus sinceros votos de agradecimento.

Aos meus amigos Jurandir, Zé Carneiro, Theyguinho, Wesley, Willian e tantos outros que fazem parte do STUD AZEVEDO, pelas inúmeras horas de alegria, felicidade e trabalho.

"A verdadeira motivação vem da realização, desenvolvimento pessoal, satisfação no trabalho e reconhecimento."

Frederick Herzberg

SUMÁRIO

1 QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 <i>Neospora caninum</i>	16
2.2 <i>Toxoplasma gondii</i>	26
3 OBJETIVOS	35
3.1 Geral.....	35
3.2 Específicos	35
4 RESULTADOS	36
4.1 ARTIGO 1	36
Serological survey and risk factors for <i>toxoplasma gondii</i> in cattle from Amazonas, Brazil.....	36
Submetido ao periódico Preventive Veterinary Medicine – ISSN 0167-5877.....	36
(Qualis A1 – Fator de impacto: 2.302 - Área de avaliação: Medicina Veterinária)	36
4.2 ARTIGO 2	57
<i>Neospora caninum</i> infection in cattle in the state of Amazonas, Brazil: seroprevalence, spatial distribution and risk factors	57
Artigo submetido ao periódico Parasite Epidemiology and Control– ISSN 2405-6731	57
(Qualis A1 – Fator de impacto: 2.629 - Área de avaliação: Medicina Veterinária)	57
4.3 ARTIGO 3	75
Submetido a Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária – ISSN 0103-846X	75
(Qualis A2 – Fator de impacto: 1.013 - Área de avaliação: Medicina Veterinária)	75
5 CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS	87
ANEXO A–PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	98

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1. Processo de invasão celular de um taquizoíto de <i>Neospora caninum</i>	18
Figura 2. Ultra-estrutura de taquizoíto, bradizoíto, cisto, oocisto não-esporulado e oocistos.....	19
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Neospora caninum</i>	20
Figura 4. Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i>	28

Artigo 1

Figura 1. Prevalence of <i>Toxoplasma gondii</i> antibodies per farm in the state of Amazonas, Brazil.....	53
Figura 2. Prevalence of <i>Toxoplasma gondii</i> antibodies in cattle for municipalities from state of Amazonas, Brazil.....	54

Artigo 2

Figura 1. Map of the subpopulations 1, 2, 3 and 4 of the state of Amazonas, according to the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply.....	69
Figura 2. Prevalence of <i>Toxoplasma gondii</i> antibodies in cattle for municipalities from state of Amazonas, Brazil.....	70
Figura 3. Kernel density estimation of the prevalence of <i>Neospora caninum</i> infection in cattle in the state of Amazonas, Brazil.....	71

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1. Estudos de prevalência de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> em bovinos, em diferentes estados brasileiros realizados nos últimos anos.....	22
Tabela 2. Estudos de prevalência de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> realizados em diferentes estados brasileiros.....	31

Artigo 1

Tabela 1. Prevalence of anti- <i>Toxoplasma gondii</i> antibodies per farm in the state of Amazonas, Brazil.....	55
Tabela 2. Univariate analysis and logistic regression of risk factors associated with <i>Toxoplasma gondii</i> infection in cattle in the state of Amazonas, Brazil.....	56

Artigo 2

Tabela 1. Prevalence of anti- <i>Neospora caninum</i> antibodies per farm in the state of Amazonas, Brazil.....	72
Tabela 2. Univariate analysis and logistic regression of risk factors associated with <i>Neospora caninum</i>	75

Artigo 3

Tabela 1. Propriedades acompanhadas e prevalência inicial da infecção por <i>Neospora caninum</i> na RIFI.....	77
Tabela 2. Prevalência da infecção por <i>N. caninum</i> em cinco rebanhos bovinos naturalmente infectados.....	78
Tabela 3. Resultados da sorologia e título de anticorpos para <i>Neospora caninum</i> dos recém-nascidos na RIFI.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
>	Maior que
ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AM	Amazonas
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ENG	Ecology Global Network
et al.	E outros, e colegas, e colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
HAI	Hemaglutinação Indireta
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulinas G
IgM	Imunoglobulinas M
IHQ	Imunohistoquímica
km ²	Quilômetro quadrado
MAD	Aglutinação Direta
MAT	Aglutinação Modificada
<i>N. caninum</i>	<i>Neospora caninum</i>
OR	Odds ratio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PI	Persistentemente infectado
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
SNC	Sistema nervoso central
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Th2	T helper 2
µL	Microlitros

µm	Micrômetros
US\$	Dólar dos Estados Unidos
VP	Vacúolo parasitóforo

RESUMO

Objetivou-se neste estudo determinar a prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* em bovinos e os fatores de risco associados à infecção por esses protozoários no estado do Amazonas, Brasil. Além disso, realizou-se o monitoramento sorológico para neosporose bovina em rebanhos soropositivos em cinco propriedades que apresentaram prevalência da infecção por *Neospora caninum* $\geq 40\%$. Para o estudo de transmissão vertical de *N. caninum* realizou-se a sorologia pré-colostral. Foram coletados amostras de 1073 animais de 47 propriedades, distribuídos em 33 municípios nas quatro subpopulações (1, 2, 3 e 4) estaduais. A prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* foi de 30,94% (332/1073) e foram identificados animais soropositivos em 93,62% (44/47) das propriedades pesquisadas. A prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* foi de 30,19% (324/1073) e foram identificados animais soropositivos em 91,49% (43/47) das propriedades. Os fatores de risco associados à infecção por *T. gondii* foram: número de animais (OR=4,43) e a presença de gatos domésticos (OR=1,98). Já para a infecção por *N. caninum*, os fatores de risco foram: exploração com finalidade leiteira (OR=2,71), rebanhos criados em sistemas de associação entre terra firme e várzea (OR =1,54), fonte de água corrente em associação com água parada, presença de cães (OR= 1,80), ocorrência de aborto na propriedade (OR = 2,35), mortalidade de recém-nascidos (OR=2,46) e nascimento de bezerros fracos (OR=1,88). No monitoramento sorológico para neosporose, obteve-se uma prevalência inicial nas cinco propriedades de 53,74% (43/80) e prevalência final de 63,75% (51/80) com taxa de transmissão vertical de 8,70%. Rebanhos soropositivos para *T. gondii* estão presentes em todas as subpopulações estudadas no estado do Amazonas. Este é o primeiro estudo soroepidemiológico da infecção por *N. caninum* em bovinos no estado do Amazonas, Brasil. Além disso, este estudo demonstrou uma elevação na taxa de soroconversão de vacas em rebanhos monitorados sorologicamente para *Neospora caninum* e uma menor taxa de transmissão vertical do parasito nas condições de manejo dos bovinos na região Amazônica do Brasil.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; *Neospora caninum*; Saúde Pública; Floresta Amazônica; Reprodução.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and the risk factors associated with infection by these protozoans in the state of Amazonas, Brazil. In addition to performing serological monitoring for bovine neosporosis in seropositive herds, in five properties with prevalence of *Neospora caninum* infection $\geq 40\%$. In the study of vertical transmission of *N. caninum*, pre-colostral serology was performed. Samples were collected from 1073 animals from 47 farms, distributed in 33 municipalities in the four subpopulations (1, 2, 3 and 4). The prevalence of anti-T antibodies.gondii was 30.94% (332/1073) and seropositive animals were identified in 93.62% (44/47) of the surveyed properties. The prevalence of anti-N antibodies.caninum was 30.19% (324/1073) and seropositive animals were identified in 91.49% (43/47) of the properties. The risk factors associated with T. gondii infection were: number of animals (OR = 4.43) and the presence of domestic cats (OR = 1.98). The risk factors for *N. caninum* infection were: dairy farming (OR = 2.71), herds raised in terra firme and floodplain association systems (OR = 1.54), running water source in association with standing water, presence of dogs (OR = 1.80), occurrence of abortion on property (OR = 2.35), newborn mortality (OR = 2.46) and birth of weak calves (OR = 1 , 88).The initial prevalence in the five properties was 53.74% (43/80) and the final prevalence was 63.75% (51/80). A vertical transmission rate of 8.70% was observed. Seropositive herds for *T. gondii* are present in all subpopulations studied in the state of Amazonas. This is the first seroepidemiological study of *N. caninum* infection in cattle in the state of Amazonas, Brazil. In addition, this study demonstrated an increase in the seroconversion rate of cows in serologically monitored herds for *Neospora caninum* and a lower rate of vertical parasite transmission under cattle management conditions in the Amazon region of Brazil.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; *Neospora caninum*; Public health; Amazon Rainforest; Reproduction.

1 QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA

A pecuária brasileira possui um rebanho crescente com projeção de aumento de 20% para os próximos dez anos. No ano de 2018 a pecuária nacional foi responsável por 8,7% do produto interno bruto total brasileiro (ABIEC, 2019). Atualmente, o rebanho bovino do estado do Amazonas conta com aproximadamente 1,48 milhões de animais (BRASIL, 2019). No período de 2002 a 2016 houve um crescimento do rebanho na região Norte do Brasil de aproximadamente 60%, cerca de três vezes maior do que a média do restante do Brasil que foi de 24% (IBGE, 2017).

De acordo com um levantamento realizado pelo Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE, 2011), o crescimento do setor agropecuário é considerado a principal causa do desmatamento da região amazônica onde se constatou que 62,2% dos quase 720 mil km² desmatados foram ocupados por pastagens. Segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC, 2019), houve um acréscimo de 176% da produtividade nos últimos anos (1990 a 2018), passando de 1,6 arrobas por hectare para 4,5 arrobas e uma redução da área destinada ao uso de pastagens em 15%, demonstrando ser possível aumentar a produtividade utilizando as áreas já existentes. Mais de 90% da carne produzida na Amazônia é consumida no mercado nacional, principalmente, nas regiões de maior poder econômico como Sul e Sudeste (RIBEIRO, 2007).

Fatores ambientais e enfermidades prejudicam os índices zootécnicos tornando as taxas produtivas e econômicas inexpressivas no estado do Amazonas (ARIMA et al., 2005). As doenças infectocontagiosas são consideradas importantes causas de prejuízos nos rebanhos bovinos (PINHEIRO et al., 2000; REICHEL et al., 2013). As perdas econômicas relacionadas à neosporose em rebanhos bovinos estão relacionadas às falhas reprodutivas, especialmente os casos de aborto, retenção de placenta, retorno ao cio e aumento do intervalo entre partos. Estima-se que até 20% de todos os abortos que ocorrem no Brasil, Holanda e Estados Unidos estão associados à neosporose (DUBEY et al., 2007), levando a um prejuízo estimado em mais de US\$ 1 bilhão ao redor do mundo, e no Brasil as perdas ultrapassam os 150 milhões de dólares por ano (REICHEL et al., 2013). De acordo com Stenlund et al. (1999) e Boas et al. (2015), o aborto é o principal sinal clínico em vacas infectadas por *N. caninum*, além do nascimento de bezerros fracos e mortalidade do recém-nascido. A morte fetal ocorre geralmente entre o terceiro e oitavo mês de gestação e o feto abortado apresenta moderado

grau de autólise (BARR, 1991). Os fetos mortos antes do quinto mês de gestação podem estar mumificados e ficarem retidos no útero por vários meses.

Além disso, a carne bovina pode atuar como um importante veiculador de patógenos para humanos (BARIL et al., 1999; OPSTEEGH et al., 2011), principalmente quando as condições higiênicas-sanitárias das criações são inadequadas, como no caso da toxoplasmose causada por *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) que é um parasito unicelular, amplamente distribuído no mundo. Estima-se que até um terço da população humana do mundo esteja infectada por *T. gondii*. A toxoplasmose normalmente não causa sintomas graves em pacientes saudáveis, mas em pessoas com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), transplantados e imunossuprimidos, sem tratamento, pode provocar manifestações clínicas graves (SAADATINIA; GOLKAR, 2012). O principal grupo de risco de toxoplasmose grave, além das pessoas imunocomprometidas, são as gestantes, pois o parasito pode infectar o feto pela via transplacentária, resultando na toxoplasmose congênita e levando ao desenvolvimento de severas complicações (TENTER, HECKEROTH e WEISS, 2000; MONTOYA e LIESENFELD, 2004; DUBEY, 2010).

Os humanos podem se infectar por meio da ingestão de bradizoítos por meio do consumo de carne mal cozida. Embora o bovino tenha sido considerado um hospedeiro resistente para este parasito, este pode se infectar com *T. gondii* e carrear cistos teciduais (DUBEY, 1986; 1992; ESTEBAN-REDONDO et al., 1999). Existem relatos de surtos de toxoplasmose humana associados ao consumo de alimentos crus ou carne bovina mal cozida (DUBEY, 2010; FAO / WHO, 2014). No geral, os bovinos são considerados resistentes à infecção (KIJLSTRA e JONGERT, 2008; DUBEY, 2010). Apesar deste protozoário não ser uma causa importante de abortamento em bovinos, existem estudos que já reportaram distúrbios reprodutivos, inclusive aborto devido à infecção congênita por *T. gondii* (GOTTSTEIN et al., 1998; ORTEGA-MORA et al., 2007; GHAREKHANI, 2014).

Devido à carência de informações epidemiológicas sobre a infecção por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em bovinos na região Amazônica, objetivou-se determinar a prevalência e os fatores de riscos associados à infecção por estes parasitos nos rebanhos bovinos do estado do Amazonas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Neospora caninum*

2.1.1 Histórico

Neospora caninum (*N. caninum*) é um protozoário coccídeo intracelular e a neosporose, é a principal enfermidade associada a danos reprodutivos em vacas em diferentes regiões do mundo (DUBEY et al., 2007; SCHARES, 2011; MCALLISTER, 2016). Em 1984, na Noruega, foi feita a primeira descrição deste protozoário causando quadro de miosite e encefalomielite, resultando em paresia do membro posterior e alterações neurológicas em seis filhotes da raça Boxer. Esses filhotes apresentaram cistos teciduais no sistema nervoso e muscular, no entanto, não foram detectados anticorpos no soro como também não se obteve sucesso no bioensaio para *Toxoplasma gondii* (BJERKAS, MOHN e PRESTHUS, 1984).

Os cães e canídeos selvagens são considerados hospedeiros definitivos de *N. caninum* enquanto uma grande variedade de espécies domésticas são hospedeiros intermediários (GONDIM et al., 2004; DUBEY et al., 2007). Mcallister et al. (1998) identificaram que os cães (*Canis familiaris*) são capazes de eliminar oocistos após ingerir tecidos de camundongos infectados experimentalmente com o protozoário. Posteriormente, três outros canídeos foram identificados como hospedeiros definitivos de *N. caninum*: o coiote (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004c); o dingo australiano (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e o lobo cinza (*Canis lupus*) (DUBEY et al., 2011).

O primeiro trabalho relacionado a esse coccídeo no Brasil foi um inquérito sorológico realizado em rebanhos bovinos leiteiros e de corte nos estados do Mato Grosso do Sul e São Paulo (BRAUTIGAM et al., 1996). Em seguida, vários estudos foram realizados para a detecção de anticorpos IgG-anti *N. caninum* em bovinos, em todas as regiões do Brasil, demonstrando uma variação de prevalência de 9,1% a 97,2% (HASEGAWA et al., 2004; VIANNA et al., 2008; ANDREOTTI et al., 2010; AMARAL et al., 2012; SILVA et al., 2017). Gondim et al. (1999a) relataram a presença do parasito por imunohistoquímica (IHQ) em um feto bovino abortado de uma propriedade com histórico de aborto. Os primeiros isolados de *N. caninum* em bovinos no Brasil foi realizado por Melo (2008) a partir do cérebro de um bezerro de um rebanho leiteiro da raça Holandesa, em Nerópolis, Goiás, sendo denominado de NC-Goiás 1 e NC-Goiás 2.

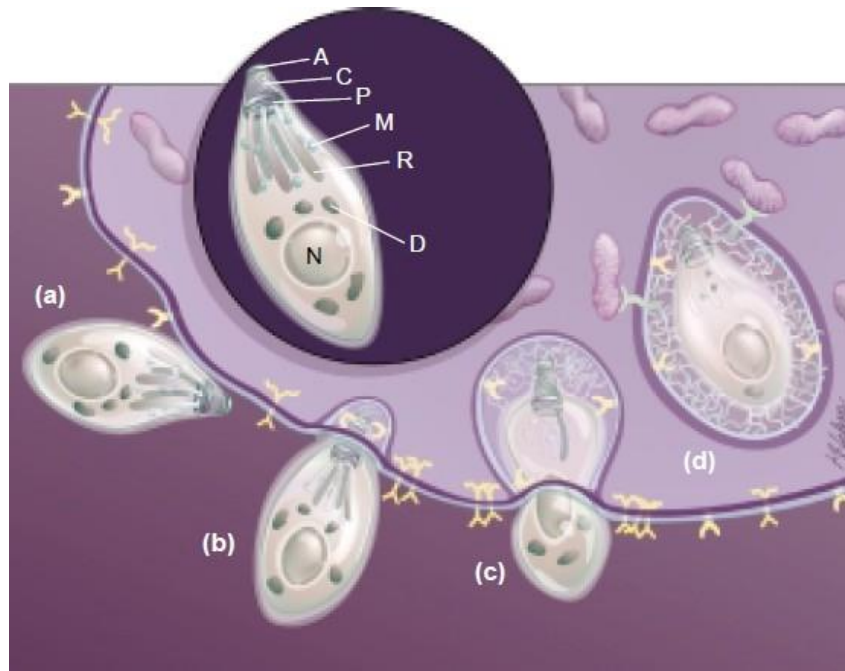
2.1.2 Biologia e ciclo biológico de *Neospora caninum*

Neospora caninum é um parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidiorida, subordem Eimeriose, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae (OSHIRO, 2006). A taxonomia proposta por Adl et al. (2012) e reforçada por Ruggiero et al. (2015) sugere que o parasito pertence ao reino Chromista, sub-reino Harosa, superfilo Alveolata, filo Miozoa, subfilo Myzozoa, infrafilo Apicomplexa, superclasse Sporozoa, classe Coccidiomorpha, sub-classe Coccidia e ordem Eimeira.

Neospora caninum necessita reconhecer a célula hospedeira para invadir e se multiplicar (BUXTON; MCALLISTER; DUBEY, 2002). Hemphill, Gottstein e Kaufmann (1996) relataram que os taquizoítos penetram na célula mediante invasão ativa em menos de cinco minutos, ficando localizado no interior de um vacúolo parasitóforo no citoplasma. O fenômeno de invasão foi estudado em cultivos celulares e consiste em um prévio reconhecimento e adesão à célula hospedeira, sendo que no interior do vacúolo parasitóforo (VP), os taquizoítos se multiplicam mediante endodiogenia, podendo uma célula conter mais de 100 taquizoítos. Após a ruptura celular, os taquizoítos saem para o meio extracelular e em poucas horas iniciarão os mecanismos de adesão e invasão de novas células (HEMPHILL; GOTTSTEIN; KAUFMANN, 1996) (Figura 1).

Após esse primeiro contato, o parasito reorienta sua extremidade anterior com a célula para a extrusão do conóide, onde várias proteínas do micronema são secretadas servindo como adesinas, responsáveis por uma espessa zona de adesão de forma irreversível; o movimento de invasão vai invaginando a membrana da célula hospedeira formando o VP e envolvendo dentro dele antígenos de superfície imunodominantes. Em seguida, uma segunda etapa acontece por meio da secreção de proteínas das roptrias que são liberadas dentro do vacúolo e se estendem ao micronema para formar associação com organelas do hospedeiro, de modo que as mitocôndrias e retículo endoplasmático são posicionados adjacentes ao vacúolo parasitóforo e assim, proteínas de grânulos densos modificam as proteínas do micronema e contribuem para a remodelação e maturação do vacúolo parasitóforo, com a formação de uma rede de membrana intravacuolar metabolicamente ativa para o crescimento e sobrevivência do parasito como descrito por Buxton, Mcallister e Dubey (2002) (Figura 1).

Figura 1 - Processo de invasão celular de um taquizoíto de *Neospora caninum*. (a) adesão; (b) invasão; (c) penetração; (d) estabelecimento do vacúolo parasitóforo; (A) anel apical; (C) conoíde; (D) grânulo denso; (M) micronema; (núcleo); (P) anel polar; (R) roptria.



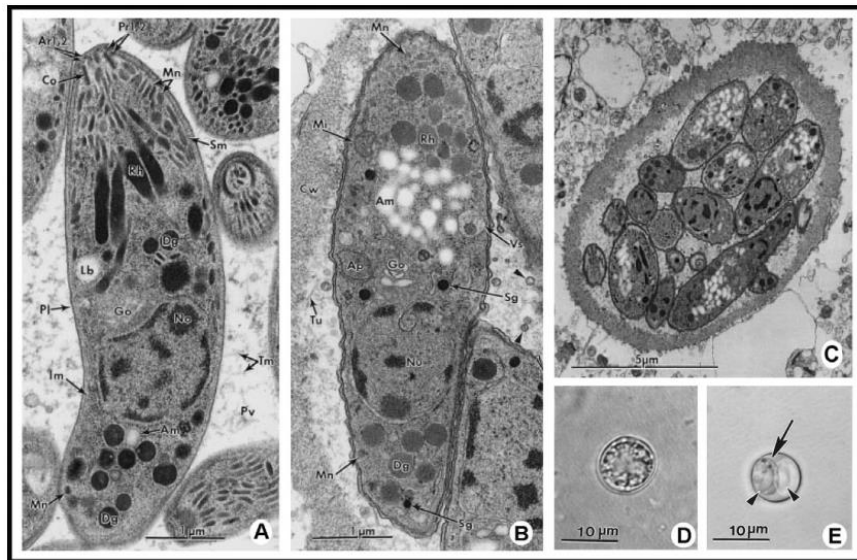
Fonte: Buxton, Mcallister e Dubey (2002).

Existem duas formas de reprodução do parasito: a sexuada, que ocorre exclusivamente no epitélio intestinal dos hospedeiros definitivos, resultando na formação de oocistos não esporulados que são excretados nas fezes (McALLISTER et al., 1998; DUBEY, 2003; GONDIM et al., 2004c; DUBEY et al., 2007; KING et al., 2010; DUBEY et al., 2011) e a assexuada, que ocorre em vários hospedeiros intermediários, incluindo animais domésticos e silvestres como: gatos, porcos, galinhas, carneiros, cavalos, bovinos, búfalos, raposas, coiotes, lobos, alpacas, veados, camelos e psitacídeos (MINEO et al., 2011; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013).

Em relação à multiplicação, Cardoso (2010) relata que o parasito ao invadir as células uterinas se multiplica causando uma destruição dos tecidos fetais e maternos, iniciando uma resposta inflamatória intensa. A partir daí as lesões se estendem para a região corioalantóide entre os cotilédones. Concomitantemente, o parasito, via corrente sanguínea, invade outros tecidos, com predileção pelo SNC onde se localiza preferencialmente na periferia dos vasos sanguíneos. O ciclo biológico foi elucidado por Macllister et al. (1998) que observaram a eliminação de oocistos nas fezes de cães que ingeriram cistos contidos em cérebro de camundongo infectado e demonstraram que este possui três formas infecciosas: taquizoíto

(livres ou em grupos), bradizoítos (em cistos teciduais) e esporozoítos (em oocistos) (Figura 2), sendo que todas as formas estão envolvidas na transmissão do parasito (GOODSWEN;KENNEDY;ELLIS, 2013; DONAHOE et al., 2015).

Figura 2-Ultra-estrutura de (A) taquizoíto, (B) bradizoíto, (C) cisto, (D) oocisto não-esporulado e (E) oocistos esporulados com dois esporocistos (seta) e dois esporozoítos (cabeça da seta) do parasito *N. caninum*.



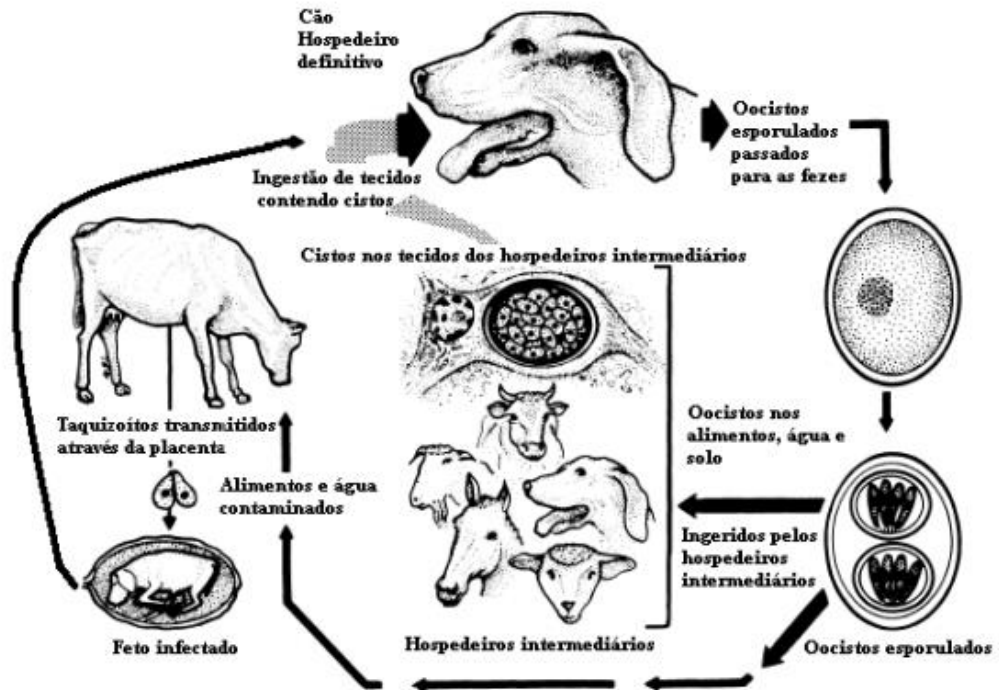
Fonte: Goodswen, Kennedy e Ellis (2013).

A morfologia dos estágios é variada e possui particularidades: os taquizoítos são a forma de multiplicação celular rápida, são ovóides, semilunares ou globulares dependendo do estágio da divisão; medem entre 1-5 x 3-7µm e estão localizados dentro de um VP no citoplasma da célula hospedeira (DUBEY, 2002). São detectados em células cerebrais, macrófagos, fibroblastos, células do endotélio vascular, células renais, miócitos e hepatócitos, enquanto os bradizoítos apresentam multiplicação celular lenta e estão localizados dentro dos cistos teciduais, são alongados e medem aproximadamente 2 x 8µm. Podem persistir no transcurso de toda a vida do hospedeiro sem causar sinais clínicos (DUBEY; LIN, 1996).

De acordo com Dubey (2002), os integrantes da família Sarcocystidae se caracterizam por apresentarem ciclo biológico heteroxeno e formarem cistos no hospedeiro intermediário. Todos eles têm como hospedeiros intermediários diferentes espécies de herbívoros ou onívoros e como hospedeiros definitivos, os carnívoros que eliminam os oocistos não

esporulados nas fezes e após esporular no ambiente apresentam em seu interior dois esporocistos com quatro esporozoítos cada um (Figura 3).

Figura 3 -Ciclo biológico de *Neospora caninum*.



Fonte: Adaptado de Dubey (2002).

2.1.3 Aspectos patológicos da Neosporose

A neosporose bovina é uma doença que acomete o feto e a placenta da vaca infectada. O início da infecção pode ocorrer por meio de uma parasitemia materna, desencadeada por uma infecção materna primária (exógena) ou uma recrudescência de uma infecção persistente (endógena) durante o quarto e sexto mês de prenhez, momento de maior deficiência imunológica da vaca (ANDERSON et al., 2000; DUBEY et al., 2007; ALMERÍA e LOPEZ-GATIUS, 2013).

De acordo com Stenlund et al. (1999) e Boas et al. (2015), o aborto é o principal sinal clínico em vacas infectadas por *N. caninum*, além do nascimento de bezerros fracos e mortalidade do recém-nascido. A morte fetal ocorre geralmente entre o terceiro e oitavo mês de gestação e o feto abortado apresenta moderado grau de autólise (BARR, 1991). Os fetos mortos antes do quinto mês de gestação podem ser mumificados e ficam retidos no útero por vários meses. A morte fetal no estágio inicial de desenvolvimento pode produzir a sua

absorção fazendo com que a vaca apresente ou não um novo cio. O pico de anticorpos é observado entre o quarto e quinto mês antes do parto e tende a declinar em até dois meses pós-parto ou aborto (STENLUND et al., 1999).

Os bezerros nascidos infectados podem se apresentar clinicamente normais ou com sinais neurológicos como dificuldade de movimentação e prostração (THURMOND; HIETALA, 1997; TREES; WILLIAMS, 2005; DUBEY et al., 2007; ALMERÍA; LOPEZ-GATIUS, 2013). A neosporose em bovinos também pode determinar o nascimento de animais sadios, mas congenitamente infectados que terão uma menor taxa de crescimento e poderão manter o parasito na propriedade por meio de infecção vertical (STENLUND et al., 1999). A prevalência de *N. caninum* é mais elevada em animais com histórico de aborto do que naqueles aparentemente normais, o que demonstra a relação da neosporose com a perda fetal (IBRAHIM;ELFAHAL;EL HUSSEIN, 2012).

No início da gestação há baixa produção de progesterona e conseqüentemente baixa produção de Th2 e nessa fase, o risco de aborto é mais elevado, mas a transmissão é baixa. Entretanto, quando a infecção ocorre durante o terceiro trimestre da gestação, período em que o Th2 e a progesterona se apresentam elevados, o risco de aborto é menor, mas a transmissão placentária é maior, sugerindo a transmissão congênita (QUINN;ELLIS;SMITH, 2002).

2.1.4 Aspectos epidemiológicos da Neosporose

Existem relatos de ocorrência da infecção por *N. caninum* em bovinos em todos os continentes, com exceção da Antártida (DUBEY e SHCARES, 2011; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013; REICHEL et al., 2014). Existe grande variação nos dados de prevalência nos rebanhos, dependendo de fatores como sistemas de produção, presença dos hospedeiros definitivos, manejo sanitário, entre outros (GHALMI et al., 2012; SUN et al., 2015). A infecção pode ocorrer de forma esporádica, endêmica ou com padrões epidêmicos na forma de surtos, sendo este o padrão considerado mais importante por ocasionar taxa de aborto superior a 10% (DUBEY et al., 2007; REICHEL et al., 2014).

O Brasil é o país com maior número de estudos sorológicos da infecção por *N. caninum* em animais em comparação ao resto do mundo (CERQUEIRA-CÉZAR et al., 2017). Porém, a comparação dos resultados é difícil devido aos diferentes métodos de diagnóstico, aos diferentes pontos de cortes empregados e aos diferentes antígenos utilizados nos testes (DUBEY et al., 2017). Na região Amazônica, a infecção por *N. caninum* em bovinos já foi

descrita. No estado do Pará, Minervino et al. (2008) pesquisaram amostras de 40 bovinos leiteiros e 120 de corte, utilizando reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com ponto de corte 100, detectando uma prevalência de 17,5% e 19,2%, respectivamente.

No mesmo estado, Silva et al. (2017) encontraram uma prevalência de 52% (260/500) de positividade para rebanhos bovinos de corte. Em Rondônia, Aguiar et al. (2006) analisaram amostras de 1011 animais com aptidão para produção de leite, 584 animais de corte e 514 animais de dupla aptidão encontrando uma prevalência de 11,2%, 9,5% e 9,7%, respectivamente, na RIFI com ponto de corte 25. No entanto, Boas et al. (2015), na mesma região, encontraram frequência de positividade de 10,6% na RIFI com um ponto de corte 100.

No estado de Tocantins, Martins et al. (2011) testaram 192 soros de animais de propriedades leiteiras, utilizando a técnica de RIFI, com ponto de corte 200, obtendo uma prevalência de 25%. Entretanto, no estado do Amazonas não há estudos soropidemiológicos sobre a infecção por *N. caninum*, deixando uma lacuna de informações sobre a sanidade dos rebanhos e os fatores associados à infecção por este parasito nesta região do país. Também, são relatadas prevalências de infecção por *N. caninum* em bovinos, em outras regiões brasileiras (Tabela 1).

Tabela 1 - Estudos de prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos em diferentes estados brasileiros nos últimos dez anos.

Estado	Amostras Analisadas	Prevalência (%)	Técnica	Autor(es)
Pará	500	52	RIFI	Silva et. al. (2017)
Rondônia	621	10,6	RIFI	Boas et al. (2015)
Tocantins	192	25,0	RIFI	Martins et al. (2011)
Alagoas	1004	7,67	RIFI	Sousa et al. (2012)
Maranhão	812	50,7	RIFI	Teixeira et al. (2010)
Pernambuco	306	12,6	RIFI	Amaral et al. (2012)
Pernambuco	316	19,6	RIFI	Ramos et al. (2016)
Mato Grosso	205	37,5	RIFI	Justo et al. (2013)
Mato Grosso	2452	25,4	RIFI	Schmidt et al. (2018)
Mato Grasso do Sul	1098	62,5	RIFI	Andreotti et al. (2010)
Minas Gerais	1204	21,6	RIFI	Bruhn et al. (2013)
São Paulo	1104	10,9	RIFI	Aguiar et al. (2011)

São Paulo	1027	10,4	RIFI	Cardoso et al. (2012)
São Paulo	70	12,9	RIFI	Diniz et al. (2019)
Paraná	159	15,1	ELISA	Marques et al. (2011)
Paraná	309	20,4	RIFI	Martins et al. (2012)
Paraná	76	30,3	ELISA	Nascimento et al. (2014)
Paraná	600	23,6	RIFI	Snak et al. (2018)
Santa Catarina	373	23,1	RIFI	Moura et al. (2012)
Santa Catarina	130	43,8	RIFI	Klauck et al. (2016)

Os abortos nas propriedades podem ser endêmicos ou epidêmicos (CORBELLINI et al., 2000; TIWARI; BAGHEL; SINGH, 2005; TREES; WILLIAMS, 2005; BARTELS et al., 2006b). Os animais soropositivos possuem chances mais elevadas de apresentar casos de aborto; entre as vacas soropositivas, a chance é de duas a sete vezes maiores em relação aos animais soronegativos (DUBEY; SCHARES, 2011); e entre as novilhas, o risco é 7,4 vezes maior (THURMOND; HIETALA, 1997). Em uma meta-análise realizada no Canadá em 2005, foi relatada uma diferença de 18% no risco de vacas soropositivas abortarem em relação as soronegativas (HADDAD; DOHOO; VANLEEWEN, 2005). Reichel et al. (2013) estimaram o prejuízo da enfermidade em mais de US\$ 1 bilhão de dólares anuais. Estudo conduzido por Moore et al. (2013) em rebanhos leiteiros da Argentina reportaram uma diferença no risco de aborto por *N. caninum* de 16% (12 – 36%).

A transmissão vertical é considerada a principal forma de manutenção do agente no rebanho, mas existe também a transmissão horizontal e sem esta última via de transmissão, a infecção por *N. caninum* não seria sustentada pois, a via vertical não é 100% eficaz (FRENCH et al., 1999). Visto isso, nem todos os bezerros de mães soropositivas são infectados congenitamente e isto faz com que a prevalência da infecção no rebanho diminua e eventualmente, com o passar do tempo desapareça (LLANO, 2013).

O principal fator de risco para neosporose clínica no rebanho é a presença de cães na propriedade (HOBSON et al., 2005; RINALDI et al., 2005; CORBELLINI et al., 2006; BARTELS et al., 2007; GONZÁLES-WARLETA et al., 2008; VANLEEUWEN et al., 2010). Independente dos cães se alimentarem ou não de restos de placentas e fetos abortados, a infecção também foi relacionada à probabilidade de ingestão de oocistos pelos animais por meio da contaminação ambiental (GHALMI et al., 2012). Outro fator importante é a

localização da propriedade, fazendas localizadas próximas a centros urbanos têm uma maior probabilidade de apresentarem animais infectados devido provavelmente ao grande número de animais errantes nessas regiões (SANCHEZ et al., 2003).

O tamanho da propriedade, a utilização de silagem e alimentos no cocho, além da presença de aves domésticas em contato com rebanhos bovinos pode ter uma relação com a ocorrência de abortos associados a *N. caninum* nessa espécie (CHIEBAO, 2010). A aptidão do animal também influencia na infecção. Moré et al. (2009) verificaram que vacas leiteiras tem mais chances de se infectarem, e resultado semelhante foi obtido por Romero-Salas et al. (2010) que constataram que vacas leiteiras acima de cinco anos de idade e com histórico de aborto tinham maior probabilidade de estarem infectados.

Outro fator que eleva a probabilidade de infecção é a criação de bovinos em áreas alagadiças, concluindo que a umidade contribui para a sobrevivência de *N. caninum*, favorecendo a persistência do agente no ambiente (KATZ, 1982; SILVA et al., 2008). O destino errôneo dos fetos abortados também são potenciais focos de contaminação do ambiente. Animais de propriedades onde os fetos abortados não são adequadamente enterrados têm risco de 3,04 vezes maior de infecção do que animais de propriedades onde é realizado o destino adequado (SOUSA et al., 2012).

2.1.5 Diagnóstico da Neosporose

Para o diagnóstico da neosporose deve-se associar os sinais clínicos e dados epidemiológicos com exames sorológicos, histopatológicos, moleculares e isolamento do protozoário (DUBEY, 1993). O diagnóstico definitivo de *N. caninum* é feito por meio da identificação do parasito nos tecidos, especialmente no feto bovino abortado e placenta (CAETANO DA SILVA, 2004). O feto inteiro deve ser transportado imediatamente ao laboratório, mesmo quando tiver algum grau de autólise. Se não for possível, amostras de cérebro, coração, fígado, timo, baço, rins, músculo e placenta devem ser examinadas por teste histopatológico, após fixados em formol a 10%. Fluídos corporais e sangue fetal devem ser avaliados por sorologia (ALVARES-GARCIA, 2003). A ocorrência de abortos sempre deve estar associada às pesquisas sorológicas, para que se possa obter diagnóstico preciso da doença e desta forma lançar mão das medidas de controle e prevenção (PAZ; LEITE; ROCHA, 2007).

A infecção por *N. caninum* pode ser demonstrada por técnicas histopatológicas, moleculares, pelo isolamento em cultivo celular ou em camundongos, ou ainda por técnicas sorológicas como imunofluorescência indireta (RIFI), ELISA e aglutinação direta (DUBEY; SCHARES, 2011). A RIFI é o teste mais comumente utilizado, considerado um padrão, que se baseia na pesquisa de anticorpos IgG em soro sanguíneo (GHALMI et al., 2014), além de apresentar boa especificidade e sensibilidade (CAMILLO et al., 2010).

2.1.6 Aspectos profiláticos e medidas de controle

O controle da neosporose deve visar ações para interromper as vias de transmissão do parasito, assim como identificar animais positivos para posterior eliminação e prevenção do ingresso de novos animais infectados ao rebanho podendo com isso diminuir a transmissão vertical (ÁLVARES-GARCIA, 2003). O controle da população canina sem procedência em torno de fazendas também é importante, visto que é um fator de risco e pode contribuir para novas infecções (SÁNCHEZ et al., 2003; SUN et al., 2015). O descarte dos envoltórios fetais ou dos fetos abortados deve ser realizado de forma adequada, impedindo o acesso aos hospedeiros definitivos (BRUHN et al., 2013), e evitar o contato destes animais com a água e comida fornecidos aos bovinos (GHALMI et al., 2012; IMRE et al., 2012).

Segundo Dubey(2007), para que ocorra um controle eficaz é importante observar primeiramente os pontos relevantes para instalação e manutenção da enfermidade no rebanho, abrangendo informações relativas da principal via de transmissão, a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* de animais soropositivos na população e fatores de risco associados ao parasito. Desse modo, os programas de controle devem ser estabelecidos de modo que seja calculado e avaliado o custo-benefício destas ações, abrangendo as despesas de testes e medidas de controle comparando-as com as perdas econômicas ocasionadas pela infecção.

De acordo com Moore et al. (2011), existe uma probabilidade que as vacinas inativadas possam prevenir a transmissão vertical do agente, contudo, Weston, Heuer e Williamson (2012) estudaram a eficácia da vacina Bovilis[®] Neoguard (Intervet International B.V., Boxmeer, The Netherlands), e constataram que esta preveniu 61% dos abortos em uma de cinco fazendas estudadas e não se mostrou eficaz na prevenção da transmissão vertical em nenhuma das propriedades participantes da pesquisa. Foi relatado que uma vacina eficaz deve reduzir em torno de 90% as perdas econômicas decorrentes desse agente (REICHEL e ELLIS,

2009). Estes dados denotam a importância do desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a neosporose (MOORE et al., 2011).

2.2 *Toxoplasma gondii*

2.2.1 Histórico

T. gondii é um protozoário intracelular obrigatório descrito pela primeira vez em coelhos, no Instituto Biológico de São Paulo, por Splendore (1908) e no Instituto Pasteur da Tunísia, por Nicolle e Manceux (1909), em um roedor do norte da África (*Ctenodactylus gondii*). Este coccídió é considerado um dos parasitos mais bem sucedidos do mundo devido ao seu elevado número de espécies hospedeiras e inúmeros padrões de transmissão que permitem uma ampla propagação na natureza (DUBEY, 2010). Anteriormente, acreditava-se que *Toxoplasma gondii* se tratava de uma forma particular de *Leishmania*, sendo denominado pelos cientistas como *Leishmania gondii* (NICOLLE; MANCEAUX, 1909).

A toxoplasmose humana foi descrita pela primeira vez por Castellani, em 1913, em um menino com quadro febril e esplenomegalia. No final da década de 30, este parasito foi isolado pela primeira vez em animais (SABIN; OLITSKY, 1937) e em 1939, nos Estados Unidos, foi relatado o primeiro caso de toxoplasmose congênita em um recém-nascido que morreu aos 30 dias de vida e que apresentava encefalite, mielite e meningite (SIMÕES, 2015). No ano de 1942, Sabin descreveu os sinais clínicos típicos da toxoplasmose congênita (hidrocefalia, microcefalia, coriorretinite e calcificação intracraniana), conhecidos como tríade de Sabin.

A toxoplasmose também foi relatada em diversas espécies de animais domésticos como: cães por Melo (1910) em Turin, Itália (DUBEY; BEATTIE, 1988); ovinos em 1942 por Olason e Monlux (ULON, 1996) e suínos em 1952, ambos nos EUA (FARREL et al., 1952). Em 1956, Feldman e Miller observaram as primeiras evidências de infecção em caprinos em um rebanho do estado de Nova York e a primeira ocorrência natural em bovinos foi feita por Houersdorf e Holtz no ano de 1952 (OLIVEIRA, et al., 2000). No estudo realizado por Httchison (1965) foram encontradas formas do parasito em fezes de gatos e no ano de 1970 o ciclo biológico foi concluído, quando Frenkel, Dubey e Miller (1970) identificaram os estágios sexuais do *T. gondii* no intestino delgado de gatos e os oocistos nas fezes, confirmando o gato como hospedeiro definitivo.

Segundo dados da Ecology Global Network (ENG) no mundo existem cerca de 600 milhões de gatos, e no Brasil de acordo com o IBGE (2013) estima-se um total de 22,1 milhões de gatos domésticos, o que representa aproximadamente 1,9 gatos por domicílio que tem esse animal. Desta forma, *T. gondii* também é encontrado em todo o mundo e em todas as regiões do Brasil, no ambiente e nos hospedeiros (CHANG, 1996; TENTER, HECKEROTH e WEISS, 2000).

2.2.2 Biologia e ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*

T. gondii pertence ao filo Apicomplexa, subclasse Coccidiasina, ordem Eimeriorina, e há apenas uma espécie conhecida no gênero *Toxoplasma* (DUBEY, 2010). Após a descoberta do seu ciclo de vida em 1970, este parasito mudou a definição de que os parasitos coccídios possuíam apenas um único hospedeiro, incluindo esse patógeno na classificação de multi-hospedeiros com importância na saúde pública (DUBEY et al., 2009). Nos hospedeiros definitivos, felídeos selvagens e gatos domésticos, ocorre o estágio de multiplicação rápida e a formação de oocistos nos intestinos. Milhões de oocistos são eliminados nas fezes e se espalham e contaminam o meio ambiente (WOUDET, 1990; DUBEY, 2010).

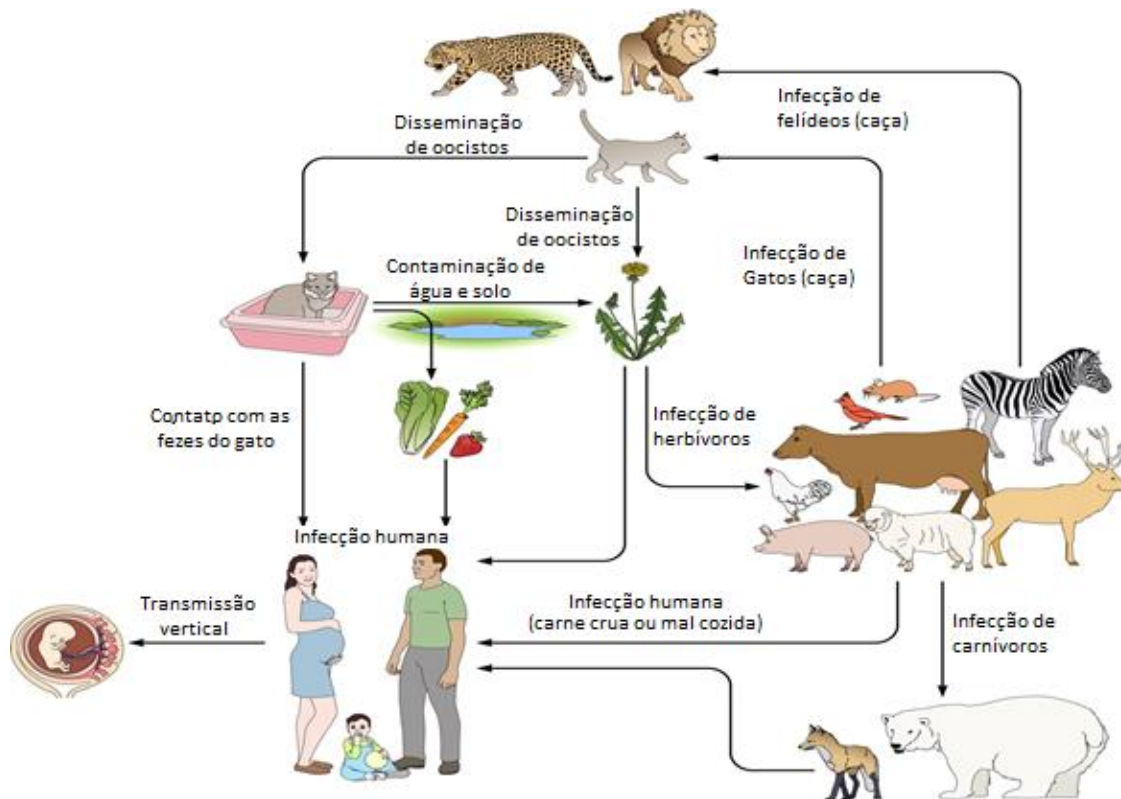
O parasito apresenta três estágios infecciosos que formam um ciclo de vida complexo com fases de reprodução sexuada e assexuada (GILOT-FROMONT et al., 2012), podendo ser encontrado em três estágios como: taquizoíto, bradizoíto e esporozoíto. O taquizoíto de *T. gondii* tem uma região alongada de aproximadamente 8µm de comprimento por 2µm de largura, e é caracterizado por apresentar o conóide, as roptrias, os micronemas, o núcleo, o complexo de Golgi, o apicoplasto e o retículo endoplasmático. Por fim, observa-se uma película que envolve todo o conjunto que parte do anel polar posterior (SOUZA et al., 2010). Os taquizoítos caracterizam a infecção aguda de *T. gondii*, mesmo que já tenha instalada a resposta imune protetora (COSTA-SILVA e CHIOCCOLA, 2010).

As funções do conóide, roptrias, microporos e micronemas são relacionadas à penetração e criação de um ambiente intracelular adequado para sobrevivência do parasito (HU et al., 2002; DUBEY, 2010). Os bradizoítos são parecidos com os taquizoítos, porém, são menores e possuem um núcleo situado na parte superior, o que o diferencia dos taquizoítos que possuem o núcleo mais central. Estes podem ser encontrados dentro dos cistos teciduais que podem variar de 5-70µm de tamanho e podem conter de um a centenas de bradizoítos no seu interior (VELARDE; MONTENEGRO; CANTO, 2009).

O oocisto mede aproximadamente 10-12µm. Neste se encontra um par de esporocistos cada qual com quatro esporozoítos, que se formam unicamente nos felinos. Ao ingerir qualquer das três formas morfológicas de *T. gondii*, os gatos podem desenvolver e eliminar os oocistos. Os gatos são considerados os hospedeiros mais importantes do parasito, pois são altamente amplificantes e responsáveis pela reprodução sexuada do parasito (DABRITZ; CONRAD, 2010). Os gatos podem contaminar o ambiente com cerca de 100.000 oocistos por grama de fezes (DUBEY, 2010). Os oocistos são excretados por apenas uma ou duas semanas, mas podem permanecer viáveis por até dois anos em condições de temperatura e umidade favoráveis (FREYRE et al., 1997)(Figura 4).

Os oocistos não esporulados quando expostos ao ambiente encontram condições ideais de oxigenação, temperatura e umidade podendo esporular entre 1 a 5 dias, tornando-se infectantes para os hospedeiros (DUBEY, 2010). Os oocistos esporulados contaminam o solo, água e alimentos e quando os hospedeiros intermediários consomem esse material contaminado, este alcança a luz intestinal e se encistam, liberando os esporozoítos que invadem os enterócitos iniciando-se, assim, um novo ciclo (BLACK; BOOTHROYD, 2000).

Figura 4: Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*.



Fonte: Adaptado de Dardé (2012).

2.2.3 Aspectos patológicos de toxoplasmose

Embora os bovinos sejam suscetíveis à infecção por *T. gondii*, estes parecem apresentar uma maior resistência à toxoplasmose e geralmente não apresentam quadro clínico (KIJLSTRA; JONGERT, 2008; MILLAR et al., 2008; DUBEY, 2010). Estudos de casos naturais e induzidos da infecção em bovinos não demonstraram a ocorrência de aborto ou mortalidade neonatal (DUBEY, 1986). Existem poucos estudos relacionando sinais clínicos em bovinos com toxoplasmose. Em geral, os sinais são inespecíficos e considerados leves. No entanto, em algumas situações, *T. gondii* pode causar sintomatologia grave em bovinos jovens (ESTEBAN-REDONDO et al., 1999; CANADÁ et al., 2002; COSTA et al., 1977; 2011).

Apesar de *T. gondii* não ser considerado uma das principais causas responsáveis por abortos em bovinos, existem estudos relatando distúrbios reprodutivos nessa espécie como aborto devido à infecção e toxoplasmose congênita em bezerros (GOTTSTEIN et al., 1998; CANADÁ et al., 2002; ORTEGA-MORA et al., 2007; GHAREKHANI, 2014). A transmissão transplacentária de *T. gondii* em bovinos foi descrita pela primeira vez por Stalheim et al. (1980), enquanto estudavam a infecção por *T. gondii* em vacas gestantes infectadas experimentalmente, isolaram *T. gondii* do cérebro e fígado de quatro vacas, de placenta de duas vacas e de conteúdo gástrico em dois fetos. Gottstein et al. (1998) detectaram o DNA de *T. gondii* em 5% dos fetos bovinos e um feto foi positivo para os anticorpos anti- *N. caninum* e *T. gondii*.

Os sinais clínicos da toxoplasmose em bovinos geralmente são inespecíficos e brandos (DUBEY; JONES, 2008), sendo estes considerados resistentes à infecção (KIJLSTRA; JONGERT, 2008; DUBEY, 2010). No entanto, *T. gondii* pode causar infecção grave, principalmente em bezerros (COSTA et al., 1977; ESTEBAN-REDONDO et al., 1999; CANADÁ et al., 2002; COSTA et al., 2011). Apesar deste protozoário não ser uma causa importante de abortamento na espécie bovina, existem estudos relatando distúrbios reprodutivos, inclusive o aborto devido à infecção congênita (GOTTSTEIN et al., 1998; ORTEGA-MORA et al., 2007; GHAREKHANI, 2014). Alguns estudos demonstraram que o consumo de carne bovina malpassada ou crua pode contribuir para a disseminação do parasito na população humana, visto que os cistos se mantêm viáveis nos tecidos musculares até a idade do abate (DUBEY, 1983; COOK et al., 2000). Alguns estudos têm evidenciado a possível contribuição do leite cru ou não pasteurizado como via de transmissão do parasito (SACKS et al., 1982; DA SILVA et al., 2015).

Estima-se que até um terço da população humana do mundo tenha tido contato em alguma fase da vida com esse parasito. *T. gondii* pode causar sinais clínicos severos, tanto em pessoas imunocomprometidas quanto em mulheres gestantes que são os principais grupos de risco para desenvolverem a toxoplasmose grave, além de poderem infectar o feto via transplacentária, resultando em toxoplasmose congênita (TENTER;HECKEROTH;WEISS, 2000; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; DUBEY, 2010).

2.2.4 Aspectos epidemiológicos da toxoplasmose

T. gondii apresenta ampla distribuição geográfica, sendo um agente zoonótico cosmopolita com importantes repercussões na Saúde Pública, principalmente quando associado a doenças congênitas ou patologias em indivíduos imunocomprometidos (COURA, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Apresenta alta prevalência sorológica, podendo atingir mais de 60% da população em determinados países, variando de região para região, conforme hábitos socioculturais, fatores geográficos e climáticos (MELO et al., 2007)sendo muito prevalente em regiões de clima tropical úmido (TENTER;HECKEROTH;WEISS, 2000).

O risco de se infectar a infecção é maior em regiões quentes e/ou úmidas é menor em clima seco e frio e depende em grande parte do contato com gatos e outros felinos infectados, do consumo de carne crua ou mal cozidos e da má higienização dos alimentos (OLIVA, 2016). As diferentes taxas de infecção humana e animal obtido nos diversos países do mundo se devem a diferentes fatores como localização geográfica, condições ambientais, hábitos culturais principalmente no tocante à alimentação, tipo de fauna, grau de desenvolvimento do país, infraestrutura hídrica e sanitária (REMINGTON; MCLEOD; DESMONTS, 1995).

Pode-se classificar a transmissão de *T. gondii* como horizontal ou vertical. A transmissão horizontal ocorre entre as diferentes espécies hospedeiras podendo ocorrer por via alimentar, via láctea, pelo solo contaminado através do pastejo, ocupacional ou iatrogênica. A transmissão vertical do parasito pode resultar em toxoplasmose congênita (DUBEY, 2004; 2010; JONES; DUBEY, 2012). As três principais formas de transmissão na espécie bovina são: transplacentária, ingestão de água e pasto contaminados com oocistos (DUBEY, 1994).

A primeira infecção natural em bovinos foi relatada por Sanger et al. (1953) com grandes perdas e até mesmo morte em animais jovens. Esteban-redondo et al.(1999) detectaram sinais clínicos em bezerros com idade de 6-7 meses na primeira semana após a

infecção por *T. gondii*. Animais herbívoros adultos (> 18 meses de idade), provavelmente se infectam por meio dos oocistos presentes no ambiente, ingerindo ração ou água contaminada. Também podem se infectar acidentalmente ingerindo roedores ou outros hospedeiros carregando cistos teciduais presentes em silagens ou triturados nas forrageiras. A infecção é possível também via sêmen em hospedeiros infectados (SCARPELLI et al., 2009). Os bezerros podem adquirir a infecção por via placentária (CANADA et al., 2002; COSTA et al., 2011), ou via leite (DUBEY, 1986; EFSA, 2015), água ou ambiente contaminado. Animais jovens, a partir da idade de 7 a 18 meses, provavelmente adquirem a infecção das mesmas fontes como alimentos, água ou ambiente (ESTEBAN-REDONDO et al., 1999).

Anticorpos anti-*T. gondii* foram encontrados de 0 a 99% dos bovinos estudados ao redor do mundo (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; COOK et al., 2000; KLUN et al., 2006; MOREÉ et al., 2007; SANTOS et al., 2009; DUBEY, 2010; LOPEZ et al., 2013; MATSUO et al., 2014). No Brasil, a variação da prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em bovinos é de 1% a 71% (GONDIM et al., 1999; DAGUER et al., 2004; SANTOS et al., 2009; LUCIANO et al., 2011). No estado do Amazonas, Ferraroni e Marzochi (1978) pesquisaram anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de 25 bovinos do município de Manaus, utilizando a Reação de Hemaglutinação Indireta (RHAI), obtendo uma prevalência de 60%.

No Pará, Oliveira (2015) testou 358 amostras de soros de bovinos, utilizando a técnica de RIFI e ELISA, obtendo uma prevalência de 38,83% e 26,26%, respectivamente e Carmo et al. (2017) obtiveram um percentual de 40,6% positividade na RIFI ao analisar a frequência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em bovinos de corte abatidos na Região Metropolitana de Belém. Benigno et al. (2009) detectaram por meio da técnica de RHAI uma prevalência em bovinos de 53,45% e em bubalinos de 57,14% na ilha de Marajó. Em Rondônia, Souza et al. (2015) examinaram 1000 amostras de soro sanguíneo por RIFI e encontraram uma positividade de 5,3%.

Existe um grande interesse no estudo da ocorrência de infecção por *T. gondii* em bovinos principalmente por uma perspectiva de saúde pública, pois a ingestão de cistos teciduais presentes na carne bovina pode ser uma via de transmissão para humanos (ENGLISH et al., 2015). Também são relatados estudos sorológicos em outras regiões brasileiras como descrito na Tabela 2. Os fatores de risco envolvidos na infecção por *T. gondii* na espécie bovina identificados são: contaminação das pastagens, água contaminada com oocistos e presença de hospedeiros definitivos nas propriedades (ALBUQUERQUE et al., 2011; FAJARDO et al., 2013).

Tabela 2 - Estudos de ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* realizados em diferentes estados brasileiros nos últimos quinze anos.

Estado	Amostras Analisadas	Ocorrência (%)	Técnica	Autor(es)
Pará	500	40,6	RIFI	Carmo et al. (2017)
Pará	2070	35,78	ELISA	Oliveira (2015)
Pará	2070	45,12	RIFI	Oliveira (2015)
Rondônia	1000	5,3	RIFI	Souza et al. (2015)
Mato Grosso do Sul	2000	71	RIFI	Santos (2008)
Bahia	600	11,83	RIFI	Spagnol et al. (2009)
Rio de Janeiro	77	49,4	ELISA	Frazão-Teixeira et al. (2006)
Paraná	250	30,8	RIFI	Moura et al. (2010)
Paraná	385	26	RIFI	Ogawa et al. (2005)

2.2.5 Diagnóstico da Toxoplasmose

Existe uma grande dificuldade no diagnóstico da toxoplasmose bovina, sobretudo devido a inespecificidade dos sinais clínicos nessa espécie fazendo com que, muitas vezes, não se consiga obter um histórico clínico detalhado dos animais. Portanto, torna-se muito importante realizar exames laboratoriais para o diagnóstico final (HILL; DUBEY, 2002). Podem ser realizados testes sorológicos, biológicos, moleculares, histológicos e/ou imunohistoquímicos para detecção dos patógenos ou ainda uma combinação destes (DUBEY, 2010). Os testes diretos confirmam a presença do agente nos tecidos, excreções ou fluídos corporais (VELARDE; MONTENEGRO; CANTO, 2009) e os indiretos realizam a pesquisa de anticorpos anti- *T. gondii* no soro dos animais (RAGOZA et al., 2008; SOCCOL et al., 2009; SILVA et al., 2010; PEREIRA et al., 2012).

Para testes diretos, as amostras devem ser colhidas de órgãos onde o protozoário possa ser recuperado como os linfonodos mesentéricos, intestinos, fígado, coração, músculos esqueléticos, cérebro, rins e diafragma (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; DUBEY, 2010). Pode-se também utilizar a inoculação do material suspeito em camundongos (bioprova) visando avaliar amostras individuais de tecidos de cada animal, detectando o parasito em órgãos como estômago, olhos, pulmão, cérebro, rim, útero, língua, baço, coração e linfonodos (DUBEY, 1997).

Os testes indiretos detectam a presença de anticorpos IgG e IgM anti-*T. gondii* (DUBEY, 2010). São vários testes indicados como: o Sabin-Feldman ou teste do corante (GARCIA-VARQUEZ et al., 1993), aglutinação modificada (DUBEY, 2010), hemaglutinação indireta (HAI) (HASHEMI-FESHARKI, 1996; LANGONI et al., 1999; GORMAN et al., 1999; VITOR; FERREIRA; FUX, 1999), imunofluorescência indireta (MAINARDI et al., 2003; FIGLIUOLO et al., 2004; UZÊDA et al., 2004), aglutinação em látex (HASHEMI-FESHARKI, 1996; GONDIN et al., 1999; JITTAPALAPONG et al., 2008), aglutinação direta (KLUN et al., 2006), ELISA (SKJERVE et al., 1998; CAVALCANTE, 2004; SAWADOGO et al., 2005) e dot-ELISA (BAHIA et al., 1993).

Com os avanços no conhecimento do genoma de *T. gondii* foi possível a utilização da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do DNA do parasito na amostra. Esta técnica se fundamenta na amplificação específica de determinados genes ou fragmentos de genes, detectando com segurança, rapidez e precisão o parasito em qualquer amostra do animal infectado. Por ser uma técnica muito sensível, é capaz de detectar infecções por um único taquizoíto (WONG; REMINGTON, 1994; BASTIEN, 2002). Segundo Dehkordi et al. (2013), a PCR é um método de diagnóstico preciso, seguro, sensível, específico e rápido para ser utilizado no monitoramento do parasito no leite. Além disso, a PCR possui a vantagem de maior sensibilidade quando comparado ao isolamento do parasito em culturas de tecido (MEIRELES, 2001).

2.2.6 Aspectos profiláticos e medidas de controle

Nos bovinos, a principal via de transmissão são os oocistos que podem ser encontrados no ambiente onde os gatos infectados estão presentes. Estudos epidemiológicos concluíram que as pastagens podem ser a fonte mais comum da infecção (ORTEGA-MORA et al., 2007), principalmente devido a presença de gatos domésticos das propriedades. Para prevenir a infecção em bovinos, deve-se evitar a contaminação fecal felina na ração, cama, água e pastagens. Além disso, o controle de roedores ajuda a prevenir a infecção, devido ao fato de os gatos serem atraídos pela presença desses animais, podendo assim se contaminar pela ingestão de tecidos de animais infectados, completando o ciclo e contaminando o meio com suas fezes (JONES; DUBEY, 2012).

Outras medidas de controle incluem a manutenção dos animais domésticos fora da área de criação, o correto armazenamento de grãos e feno, a remoção imediata seguida de

incineração de fetos abortados e membranas fetais e evitar a exposição de animais recém-introduzidos nas propriedades ao ambiente contaminado (WATSON; BEVERLEY, 1971; BLEWETT; TREES, 1987; BUXTON, 1998; DUBEY; LINDSAY, 1994; PERDONCINI et al., 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Realizar um estudo soroepidemiológico da infecção por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em bovinos no estado do Amazonas, região Norte do Brasil.

3.2 Específicos

- Determinar a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* em bovinos nas diferentes regiões do estado do Amazonas.
- Identificar os fatores de risco associados à ocorrência da infecção por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em bovinos.
- Realizar o monitoramento sorológico em propriedades positivas para *Neospora caninum* e calcular a taxa de transmissão vertical da infecção em bovinos.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO 1

Serological survey and risk factors for *toxoplasma gondii* in cattle from Amazonas, Brazil

Submetido ao periódico Preventive Veterinary Medicine – ISSN 0167-5877

(Qualis A1 – Fator de impacto: 2.302 - Área de avaliação: Medicina Veterinária)

SEROLOGICAL SURVEY AND RISK FACTORS FOR *TOXOPLASMA GONDII* INFECTION IN CATTLE FROM AMAZONAS, BRAZIL

Paulo Cesar Gonçalves de Azevedo Filho^{1,2}; Müller Ribeiro-Andrade²; Jomel Francisco dos Santos¹; Arthêmio Coelho dos Reis³; Sandra Regina Fonseca de Araújo Valença²; Erika Fernanda Torres Samico Fernandes²; José Wilton Pinheiro Junior²; Rinaldo Aparecido Mota²

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Campus Manaus Zona Leste – IFAM, Manaus, AM, Brasil

² Laboratório de Doenças Infectocontagiosas dos Animais, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, Recife, PE, Brasil

³ Agência de Defesa Agropecuária e Florestal do Amazonas – ADAF, Manaus, AM, Brasil

Abstract

Beef cattle farming in the Amazon region has expanded rapidly, but information on herd health is still scanty. The purpose of this study was to determine the presence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in cattle, its spatial distribution and the risk factors associated with the infection in the state of Amazonas, Brazil. Blood samples were collected from 1073

animals on 47 farms, located in 33 municipalities in the four state subpopulations. Anti-*T.gondii* IgG antibodies were detected by means of the indirect fluorescent antibody test (IFAT). The overall prevalence was 30.9% (332/1073), and seropositive animals were identified at 93.6% farms (44/47). All the subpopulations studied in the state of Amazonas had cattle herds seropositive for *T. gondii*, with some areas showing higher prevalence rates. The risk factors identified in the logistic regression were number of animals (OR=4.43) and presence of domestic cats (OR=1.98). It is advisable to correct identified risk factors, particularly insofar as the definitive hosts of *T. gondii* are concerned. Attention should also focus on beef consumption, given the prevalence of *T. gondii* infection among cattle and the widespread clandestine slaughtering that occurs in this state.

Keywords: Amazon rainforest; Seroepidemiology; Toxoplasmosis.

Introduction

Cattle herds in the Amazon region have grown rapidly since the 1990s (WWF, 2015). The state of Amazonas today has approximately 1.48 million head of cattle (Brasil, 2019), and this inordinate growth is seen by many as the main cause of the expansion of deforestation in the Amazon, since about 80% of deforested areas are occupied by pastures (Brasil, 2004). Despite this population expansion, there is still a paucity of data on cattle herd sanitation, production and management in the Amazon region. Such information could contribute towards livestock development aimed at improving productivity in the areas already in use, thereby avoiding the deforestation of new areas.

Most of the beef produced in this state is consumed in Brazil, especially in the country's more affluent regions, such as the south and southeast (Ribeiro, 2007; Terraclass, 2010). Beef is considered a major source of human infections (Baril et al., 1999; Opsteegh et

al., 2011) when the sanitary conditions in beef cattle farming are inadequate, as when *T. gondii* infection is present.

Toxoplasmosis, one of the most important zoonotic diseases in the world, is caused by the protozoan *T. gondii*. It is prevalent in different regions and its medical and veterinary importance is significant because it causes abortion or congenital disease in some of its intermediate hosts (Tenter et al., 2000). In humans, it can cause severe neurological complications in immunocompromised individuals (Tenter et al., 2000; Weis and Dubey, 2009). Felines are responsible for most of the elimination and dissemination of *T. gondii* oocysts and the maintenance of this parasite's life cycle because they are its definitive hosts (Dubey and Jones, 2008).

T. gondii is one of the most successful parasites in the world due to its adaptability and numerous transmission patterns and hosts, which enable its wide dissemination in nature (Dubey, 2010). *T. gondii* has three infective forms, namely, tachyzoites, bradyzoites and sporozoites (Dubey et al., 2004; Montoya and Liesenfeld, 2004). Bradyzoites, which are asexual forms in tissue cysts (Gross et al., 1996; Dubey 1998), are the main ones responsible for transmission through the ingestion of raw or undercooked meat (Dubey 1998; Tenter et al., 2000; El-On and Peiser 2003).

Few studies have focused on the clinical signs of toxoplasmosis in cattle, which usually are non-specific and mild in this species (Dubey and Jones, 2008). Cattle are generally considered resistant to this infection (Kijlstra and Jongert, 2008; Dubey, 2010), but *T. gondii* can cause severe infection, especially in calves (Costa et al., 1977; Esteban-Redondo et al., 1999; Canad a et al., 2002; Costa et al., 2011). Although this protozoan is not a major cause of abortion in cattle, studies have reported reproductive disorders, including abortion, due to congenital infection (Gottstein et al., 1998; Ortega-Mora et al., 2007; Gharekhani, 2014). Some studies have shown that eating undercooked or raw beef can contribute to the spread of

the agent among humans, since its cysts remain viable in muscle tissues of infected animals until they are slaughtered (Dubey 1983; Cook et al., 2000).

Given the lack of epidemiological information on *Toxoplasma gondii* infection in cattle in the Amazon region, our aim was to determine the prevalence, spatial distribution and risk factors associated with *T. gondii* infection in cattle herds in the state of Amazonas.

Material and Methods

Farms and sampling

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), under protocol no. 80/2018.

To compose the sample of this study, farms were selected for convenience in the four subpopulations in the state of Amazonas, which were divided as follows. Subpopulation 1 – comprising the municipalities of the state of Amazonas surrounding the Rio Negro river and its tributaries, in the direction of the Amazon River, up to the borders of the municipality of Barcelos (Barcelos, Maraã, Santa Isabel do Rio Negro and Tonantins). Subpopulation 2 – composed of the municipalities of the state of Amazonas surrounding the Solimões River and its tributaries, in the direction of the Amazon River, up to the borders of the municipality of Anamã (Amaturá, Benjamin Constant, Beruri, Carauari, Coari, Codajás, Fonte Boa, Itamarati, São Paulo de Olivença). Subpopulation 3 – comprising the municipality of Apuí and other municipalities in the state of Amazonas surrounding the Madeira River and its tributaries, in the direction of the Amazon River, up to the borders of the municipality of Autazes (Canutama, Eirunepé, Envira, Humaitá, Ipixuna, Lábrea, Manicoré). Subpopulation 4 – comprising the remaining municipalities of the state of Amazonas surrounding the Amazon River, and the municipalities or parts of them bordering the state of Pará (Autazes, Boa Vista

do Ramos, Borba, Caeriranga, Careiro, Careiro da Várzea, Itacoatiara, Itapiranga, Manaus, Maués, Nhamundá, Parintins, Urucará) (Figure 1).

Blood serum was collected of 64 animals of subpopulations 1; 174 animals of subpopulations 2; 467 animals of subpopulations 3 and 368 animals of subpopulations 4, totalizing 1073 animals of state of Amazonas. Were selected animals older than 2 years, at 47 farms with ten or more cattle (primary sampling units) located in 33 municipalities. A 50% prevalence rate, 95% confidence interval and 5% statistical error (α) were considered to make up the sample (Thrusfield, 2004). The animals were identified individually by an ear tag attached to the left ear. The tag number was recorded on the label of the vacutainer tube and on the sample collection form.

Sample collection

The blood samples were drawn by venipuncture of the external jugular vein into sterile and tagged vacutainer tubes. Ten mL of blood without anticoagulant were drawn into individual test tubes after prior skin antiseptis with 3.0% iodinated alcohol. The samples were centrifuged at 1000 x g for five minutes to obtain serum. The blood sera were aliquoted and stored at -20°C until serological tests were performed.

Preparation of antigen for the Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT)

Tachyzoites of the ME-49 strain of *T. gondii* were kept in a culture of MARC-145 cells under the conditions specified by Regidor-Cerrillo et al. (2010). The number of viable tachyzoites was determined by counting in a Neubauer chamber using trypan blue. The purified tachyzoites were resuspended in 0.2% (v/v) formalin solution in PBS, adjusted to a concentration of 1200-1500 parasites/ μ L. The microscope slides were sensitized with 10 μ L of the suspension of tachyzoites per well for the IFAT.

Survey of anti-*T.gondii* IgG antibodies

The IFAT was performed as described by Camargo (1974), with slight modifications. Each serum was diluted 1:64 (cutoff), distributed in the wells of the *T. gondii* antigen-sensitized slides, and incubated at 37°C for 30 minutes in a humidifying chamber.

The slides were washed and incubated with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-bovine IgG serum (Sigma Chemical, USA) containing 0.02% Evans blue (Sigma Chemical, USA) under the above described conditions. They were then washed again, dried, coated with buffered glycerol, covered with coverslips, and examined under a fluorescence microscope (Nikon Eclipse 40x objective lens). All the slides included positive and negative controls. Samples were considered positive when 50% of the tachyzoites in the wells presented total peripheral fluorescence.

Risk factors associated with *T. gondii* infection

The risk factors associated with *T. gondii* infection were studied based on an analysis of the variables using Pearson's chi-square test or Fisher's exact test, when necessary. Pre-structured questionnaires were applied to assess the risk factors associated with *N. caninum* infection, variables included in the analysis final model were: type of farming system (suitability; rearing system; farm size; herd size) and management-related (water source; presence of other domestic and wild animals).

. A logistic regression analysis was then performed, considering the IFAT results (positive or negative) as the dependent variable. The independent or explanatory variables considered in the final model were those with a statistical significance of <0.05. The statistical calculations were made using Epi Info version 3.5.1 software.

Results

The *T. gondii* antibody prevalence rate was 30.9% (332/1073, 95% CI, 28.2% – 33.8%) in state of Amazonas, with at least one positive animal in 93.63% (44/47) of farms. The prevalence of the infection in subpopulations and by property is shown in Table 1. No significant differences ($p>0,05$) were observed between the prevalence of subpopulations 1, 2, 3 and 4. The spatial distribution of prevalence by municipality in state of Amazonas is demonstrates Figure 2.

A univariate analysis revealed a significant association between *T. gondii* infection and the following variables: type of farming system ($p=0,024$); farm size ($p=0,030$); number of animals ($p=0,012$); water source ($p=0,008$); and presence of domestic cats ($p < 0,001$). The risk factors identified in the logistic regression were number of animals (OR=4.43) and presence of domestic cats (OR=1.98), as described in Table 2.

Discussion

In this study, a comprehensive epidemiological survey of anti-*T.gondii* antibodies in cattle was conducted in all the regions of the state of Amazonas. The impact of this survey is relevant for this state, since the first and only other serological survey of *T. gondii* infection in cattle in the Amazon, which was conducted by Ferraroni & Marzochi, dates back to 1980. The 1980 survey, which involved an analysis of only 25 cattle in a neighborhood of the city of Manaus, used the indirect hemagglutination assay (IHA) with a frequency of 60% positivity. However, the results of these two surveys are difficult to compare, since different techniques were used and the first survey involved only a few animals at a single site in the state of Amazonas.

In our study, the overall prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cattle in the state of Amazonas (30.9%, 332/1073) was lower than the prevalence rates reported in other states in the northern region of the country, such as the states of Pará (87.45%, 669/765) and Tocantins (87.79%, 446/508) (da Silva et al., 2015). However, it was similar to the results reported by Daguer et al. (2004) and Moura et al. (2010) in Paraná, by Costa (2001) in São Paulo and Minas Gerais and by Ogawa et al. (2005) in Rio Grande do Sul.

The map of *T. gondii* infection in cattle in the state of Amazonas revealed the presence of seropositive animals distributed in different subpopulations, no statistical difference was verified in the prevalence between these subpopulations (Figure 2). The dispersion pattern is similar to that found in other studies conducted around the world, which found seropositive animals widely distributed in the regions under study (Tenter et al., 2000; Cook et al., 2000; Klun et al., 2006; Moré et al., 2007; Santos et al., 2009; Dubey, 2010; Lopez et al., 2013; Matsuo et al., 2014). Amazonas is a continental size state with environmental, sociocultural, economic and political differences, and each of its regions has its own distinctive geographic and ecological features, which may explain the dispersal of and variations among its subpopulations. This region is home to the world's largest nature reserve, and hence, the largest plant and animal biome, with huge numbers of wild animals. Within this biome are cattle ranches, where numerous wild felids go hunting. These felids often come into contact with the cattle herds since they drink water from the same sources, or even prey on cattle, frequently leading to close contact with these animals (Michalski et al., 2006; Sarvi et al., 2015). According to Santos et al. (2013), continuous exposure to oocysts excreted in feline feces increases the risk of infections during grazing. In our study, we found that the cattle on farms frequented by felids showed a 1.98-fold higher chance of becoming infected with *T. gondii*, a finding similar to that reported by Vesco et al. (2007), Dubey (2009), Albuquerque et al. (2011); and Fajardo et al. (2013). Felids are important in the *T. gondii* life cycle because

they are its definitive hosts and therefore the only ones that can contaminate the environment with oocysts (Dubey et al., 2004). They can eliminate large numbers of oocysts, which are highly resistant to environmental factors and can sporulate and survive in humid environments for several months (Dubey, 2002).

The number of animals per farm was also found to be a risk factor, and herds of 11 to 50 animals presented an odds ratio of OR=3.80, herds of 51 to 100 animals an OR=4.43 and herds of more than 100 animals an OR=2.84. These findings differ from those reported by Albuquerque et al. (2011) in Bahia, and by Fajardo et al. (2013) in Minas Gerais, Brazil, who found no association between seropositivity and herd size. Extensive livestock farming predominates in the Amazon region, where the animals remain in the pasture longer until they reach the slaughter weight, thus increasing the possibility of infection with oocysts shed into the environment by felids.

T. gondii was estimated to contribute 17.6% to the total burden of foodborne disease in Europe in 2010 (Havelaar et al., 2015). However, the role of beef as a source of human infection by *T. gondii* is still controversial. Serological studies have shown that *T. gondii* antibodies are prevalent in cattle (Tenter et al., 2000), but the parasite has rarely been isolated via bioassay from naturally infected cattle. The inspection of beef for toxoplasmosis in slaughterhouses is not a priority. Therefore, the consumption of beef with *T. gondii* in this and other regions of the country should be ample reason for further discussion, given that several studies have identified the consumption of beef as a risk factor for humans (Baril et al., 1999; Cook et al., 2000; Jones et al., 2009; Belluco et al., 2017; Said et al., 2017), and associated with toxoplasmosis outbreaks (Smith, 1993).

Deforestation in the Brazilian Amazon has as its main cause the expansion of livestock farming. The expansion of livestock farming in the Brazilian Amazon is the main cause of deforestation. According to FAO, the highest deforestation rate has occurred in Brazil

(Houghton, 2005). The diagnosis and the implementation of control measures for cattle diseases can increase animal productivity per area and reduce illegal deforestation in the Amazon region.

Conclusions

Cattle herds seropositive for *T. gondii* were identified in all the subpopulations under study in the state of Amazonas, with some areas showing a higher prevalence rates. It is advisable to correct the identified risk factors, particularly in terms of the parasite's definitive hosts. Attention should also focus on beef consumption, considering the prevalence of *T. gondii* infection found in cattle and the high rates of illegal slaughtering in the state of Amazonas.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the assistance of the staff at the Laboratory of Infectious Diseases of the Federal Rural University of Pernambuco and the Amazonas Agriculture and Forest Protection Agency (ADAF).

References

- Albuquerque, G.R., Munhoz, A.D., Teixeira, M., Flausino, W., Medeiros, S.M., Lopes, C.W.G. 2011. Risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in dairy cattle, State of Rio de Janeiro. *Pesq. Vet. Bras.* 31, 287-290. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2011000400003>.
- Baril, L., Ancelle, T., Goulet, V., Thulliez, P., Tirard-Fleury, V., Carne, B. 1999. Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy: a case-control study in France. – *Scand. J. Infect. Dis.* 31, 305-309.

- Bonametti, A.M., Passos, J.N., Silva, E.M.K., Bortoliero, A.L. 1997. Surto de Toxoplasmose Aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. Ver. Soc. Bras. Med. Trop. 30, 21–25. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86821997000100005>.
- Brasil - Presidência da República, Casa Civil. 2004. Plano de Ação para a Prevenção e Controle do Desmatamento na Amazônia Legal (PPCDAM). Grupo Permanente de Trabalho Interministerial para a redução dos índices de desmatamento na Amazônia Legal. Brasília-DF.
- Brasil. Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento. Calendário anual de vacinação Aftosa. 2019. <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidadeanimalevegetal/saudeanimal/programas-de-saude-animal/febre-aftosa/febre-aftosa-campanha>
- Camargo, M.E., 1974. Introdução às técnicas de imunofluorescência. Ver. Bras. Pat. Clín. 10, 143-171.
- Canada, N., Meireles, C.S., Rocha, A., da Costa, J.M.C., Erickson, M.W., Dubey, J.P. 2002. Isolation of Viable *Toxoplasma gondii* From Naturally Infected Aborted Bovine Fetuses. J. Parasitol. 88, 1247-1248. [http://10.1645/0022-3395\(2002\)088\[1247:IOVTGF\]2.0.CO;2](http://10.1645/0022-3395(2002)088[1247:IOVTGF]2.0.CO;2).
- Cook, A.J.C., Gilbert, R.E., Buffolano, W., Zuffrey, J., Petersen, E., Jenum, P.A., Foulon, W., Semprini, A.E., Dunn D.T. 2000. Sources of Toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre casecontrol study. Brit. Med. J. 321, 142 – 147. <http://10.1136/bmj.321.7254.142>.
- Costa, A.J., Araujo, F.G., Costa, J.O., Lima, J.D., Nascimento, E. 1977. Experimental infection of bovines with oocysts of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol. 63, 212-218. DOI: 10.2307/3280042.
- Costa, G.H.N., Cabral, D.D., Varandas, N.P., Sobral, E.A., Borges, F.A., Castagnolli KC. 2001. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em soros de

bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e de Minas Gerais. Semin. Cienc. Agrar; 22, 61-66.

Costa, G.H.N., da Costa, A.J., Lopes, W.D.Z., Bresciani, K.D.S., Rabelo dos Santos, T., Esper, C.R., Santana, A.E. 2011. *Toxoplasma gondii*: Infection natural congenital in cattle and an experimental inoculation of gestating cow with oocysts. Exp Parasitol. 127, 277-281. <http://doi:10.1016/j.exppara.2010.08.005>.

Daguer, H., Vicente, R.T., Costa, T., Virmond, M.P., Hamann, W., Amendoeira, M.R.R. 2004. Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos e funcionários de matadouros da microrregião de Pato Branco, Paraná, Brasil. Ciênc. Rural. 34, 1133-1137. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782004000400026>.

Defries, R. S., Houghto, R. A., Hansen, M. C., Field, C. B., Skole, D., Townshend, J. 2002. Carbon emissions from tropical deforestation and regrowth based on satellite observations for the 1980s and 1990s. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 99, 14256-14261.

Dubey, J.P. 1983. Distribution of cysts and tachyzoites in calves and pregnant cows inoculated with *Toxoplasma gondii* oocysts. Vet. Parasitol. 13, 199-211. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017\(83\)90057-2](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017(83)90057-2)

Dubey, J.P. 1998. Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. Parasitol. 116, 43-50. <http://dx.doi.org/10.1017/s0031182097001935>.

Dubey, J.P. 2002. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic cats from rural Ohio. J. Parasitol. 88, 802-803. <http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395>.

Dubey, J.P., Jones, J.L. 2008. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. Int. J. Parasitol. 38, 1257-1278. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.007>

- Dubey, J.P., Navarro, I.T., Sreekumar, C., Dahl, E., Freire, R.L., Kawabata, H.H., Vianna, M.C.B., Kwok, O.C.H., Shen, S.K., Thulliez, P., Lehmann, T. 2004. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *J. Parasitol.* 90, 721–726.<http://dx.doi.org/10.1645/GE-382R>
- Dubey, J.P. 2010. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*, 2nd Edition. Boca Raton: CRC Press. 313 pp.
- Dubey, J.P. 1986. A review of toxoplasmosis in cattle. *Vet. Parasitol.* 22, 177-202. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017\(86\)90106-8](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017(86)90106-8)
- Dubey, J.P. 2009. Toxoplasmosis in sheep: the last 20 years. *Vet. Parasitol.* 163, 1-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.02.026>. PMID:19395175.
- Dubey, J.P., Beattie, C.P. 1988. *Toxoplasmosis of Animals and Man*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1–220.
- El-On, J., Peiser, J. 2003. *Toxoplasma* and toxoplasmosis. *Harefuah.* 142, 48–55.
- Esteban, R.I., Maley, S.W., Thomson, K., Nicoll, S., Wright, S., Buxton, D., Innes, E.A. 1999. Detection of *T. gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. *Vet. Parasitol.* 86, 155-171. [http://dx.doi.org/10.1016/s0304-4017\(99\)00138-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-4017(99)00138-7).
- Fajardo, H.V., D’ávila, S., Bastos, R.R., Cyrino, C.D., Detoni, M.L., Garcia, J.L. 2013. Seroprevalence and risk factors of toxoplasmosis in cattle from extensive and semi-intensive rearing systems at Zona da Mata, Minas Gerais State, Southern Brazil. *Parasit. Vectors.* 6, 191. [http:// dx.doi.org/10.1186/1756-3305-6-191](http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-6-191). PMID:23800302.
- Ferraroni, J.J., Marzochi, M.C.L.A. 1980. Prevalência da infecção pelo *Toxoplasma Gondii* em animais domésticos, silvestres e grupamentos humanos da Amazônia. *Mem. Int. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro,* 75, 99-109. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761980000100010>.

- Filizola, N., Vicente, A.S., Santos, A.M.C., Oliveira, M.A. 2006. Cheias e secas na Amazônia: breve abordagem de um contraste na maior bacia hidrográfica do globo. *T & C Amazônia*; 9, 42-9.
- Gharekhani, J. 2014. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in aborted cattle in Hamedan, Iran. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* 1, 3235.
- Gottstein, B., Hentrich, B., Wyss, R., Thür, B., Busato, A., Stärk, K.D.C., Müller, N. 1998. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *Int. J. Parasitol.* 28, 679-691. [http://dx.doi.org/10.1016/s0020-7519\(98\)00006-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0020-7519(98)00006-x).
- Gross, U., Bohne, W., Soête, M., Dubremetz, J.F. 1996. Developmental Differentiation between Tachyzoites and Bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Tod.* 12, 30–33. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(96\)80642-9](https://doi.org/10.1016/0169-4758(96)80642-9).
- Houghton, R. Tropical deforestation as a source of greenhouse gas emissions. In: Moutinho, P.; Schwartzman, S. (Ed.) *Tropical deforestation and climate change - Belém - Pará - Brazil: IPAM - Instituto de Pesquisa Ambiental da Amazônia; Washington DC - USA: Environmental Defense*, 2005.
- Kijlstra, A., Jongert, E. 2008. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *Int. J. Parasitol.* 38, 1359-1370. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.06.002>
- Klun, I., Djurkovic-Djakovic, O., Katic-Radivojevic, S., Nikolic, A. 2006. Crosssectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: seroprevalence and risk factors. *Vet. Parasitol.* 135, 121-131. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.08.010>.
- Lopes, A.P, Dubey, J.P., Neto, F., Rodrigues, A., Martins, T., Rodrigues, M., Cardoso, L. 2013. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep, goats and pigs from the north of Portugal for human consumption. *Vet. Parasitol.* 193,266–269. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.001>.

- Matsuo, K., Kamai, R., Uetsu, H., Goto, H., Takashima, Y., Nagamune, K. 2014. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, horses, pigs and chickens in Japan. *Parasitol. Int.* 63, 638-639. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2014.04.003>.
- Michalski, F., Boulhosa, R.L.P., Faria, A., Peres, C.A. 2006. Human-wildlife conflicts in a fragmented amazonian forest landscape: determinants of large felid depredation on livestock. *Anim. Conserv.* 9, 179-188. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-1795.2006.00025.x>.
- Montoya, J.G. 2004. Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet.* 363, 1965–1976.
- Moré, G., Basso, W., Bacigalupe, D., Venturini, M.C., Venturini, L. 2008. Diagnosis of *Sarcocystis cruzi*, *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in cattle. *Parasitol. Res.* 102, 671-675. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-007-0810-6>.
- Moura, A.B., Osaki, S.C., Zulpo, D.L., Garcia, J.L., Teixeira, E.B. 2010. Detecção de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em bovinos de corte abatidos em Guarapuava, PR, Brasil. *Arch. Vet. Sci.* 15, 94-99. <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v15i2.14779>.
- Ogawa, L., Freire, R.L., Vidotto, O., Gondim, L.F.P., Navarro, I.T. 2005. Ocorrência de anticorpos contra *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em bovinos leiteiros da região norte do Estado do Paraná. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 57, 312-316. <http://dx.doi.org/10.1590/S010209352005000300006>.
- Opsteegh, M., Teunis, P., Züchner, L., Koets, A., Langelaar, M., van der Giessen, J. 2011. Low predictive value of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle for detection of parasite DNA. *Int. J. Parasitol.* 41, 343-354. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.10.006>.
- Ortega-Mora, L.M., Gottstein, B., Conraths, F.J., Buxton, D. 2007. Protozoal Abortions in Farm Ruminants: Guidelines for Diagnosis and Control. – CAB International, pp. 309.
- Regidor, C.J., Gómez, M.B., Pozo, I.D., Jiménez, E.R., Aduriz, G., Ortega, L.M.M. 2010. Influence of *Neospora caninum* intra-specific variability in the outcome of infection in a pregnant BALB/c mouse model. *Vet. Res.* 41, 52. <http://dx.doi.org/10.1051/vetres/2010024>.

- Santos, L.M.J., Damé, M.C.F., Cademartori, B.G., Cunha, N.A. Fo., Farias, N.A.R., Ruas, J.L. 2013. Occurrence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in water buffaloes and meat cattle in Rio Grande do Sul state, southern Brazil. *Acta.Parasitol.* 58, 334-336. <http://dx.doi.org/10.2478/s11686-013-0148-4>.
- Santos, T.R., Costa, A.J., Toniollo, G.H., Luvizotto, M.C., Benetti, A.H., Santos, R.R. 2009. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle, dogs, and humans from the Jauru micro-region, Mato Grosso state, Brazil. *Vet. Parasitol.* 161, 324-326. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.01.017>. PMID:19232473.
- Silva, J.B., Castro, G.N.S., Santos, P.N., Fonseca, A.H.D., Lima, D.H.S., Bomjardim, H.A., Reis, A.S.B., Soares, S.O., Barbosa, J.D. 2015. Detection of a high prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in cattle in Northern and Midwestern Brazil. *Rev. Salud. Anim.* 37, 52-56.
- Skjerve, E., Waldeland, H., Nesbakken, T., Kapperud, G. 1998. Risk factors for the presence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in Norwegian slaughter lambs. *Prev.Vet. Med.* 35, 219 – 227.[http://dx.doi.org/10.1016/S0167-5877\(98\)00057-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-5877(98)00057-9).
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M. 2000. *Toxoplasma gondii*: from Animals to Humans. *Int. J. Parasitol.* 30, 1217-1258.[http://dx.doi.org/10.1016/s0020-7519\(00\)00124-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00124-7).
- Terraclass. 2010. Classificação da cobertura vegetal da Amazônia. Centro Regional da Amazônia (INPE/CRA), Embrapa Amazônia Oriental (CPATU), Embrapa Informática Agropecuária (CNPTIA). Disponível em: http://www.inpe.br/cra/projetos_pesquisas/terraclass2010.php.
- Thrusfield, M.V. 2004. *Epidemiologia Veterinária*. 2ª ed. São Paulo: Roca.
- Vesco, G., Buffolano, W., La Chiusa, S., Mancuso, G., Caracappa, S., Chianca, A. 2007. *Toxoplasma gondii* infections in sheep in Sicily, southern Italy. *Vet. Parasitol.* 146, 3-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.02.019>. PMID:17383099.

Weiss, L.M., Dubey, J.P. 2009. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. *Int. J. Parasitol.* 39, 895-901. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.004>.

WWF-Brasil. 2015. Pecuária: em vinte anos, rebanho bovino do Amazonas cresceu três vezes mais que a média nacional. Disponível em:<https://www.wwf.org.br/?48362>.

Figure 1 - Map of the subpopulations 1, 2, 3 and 4 of the state of Amazonas, according to the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply.

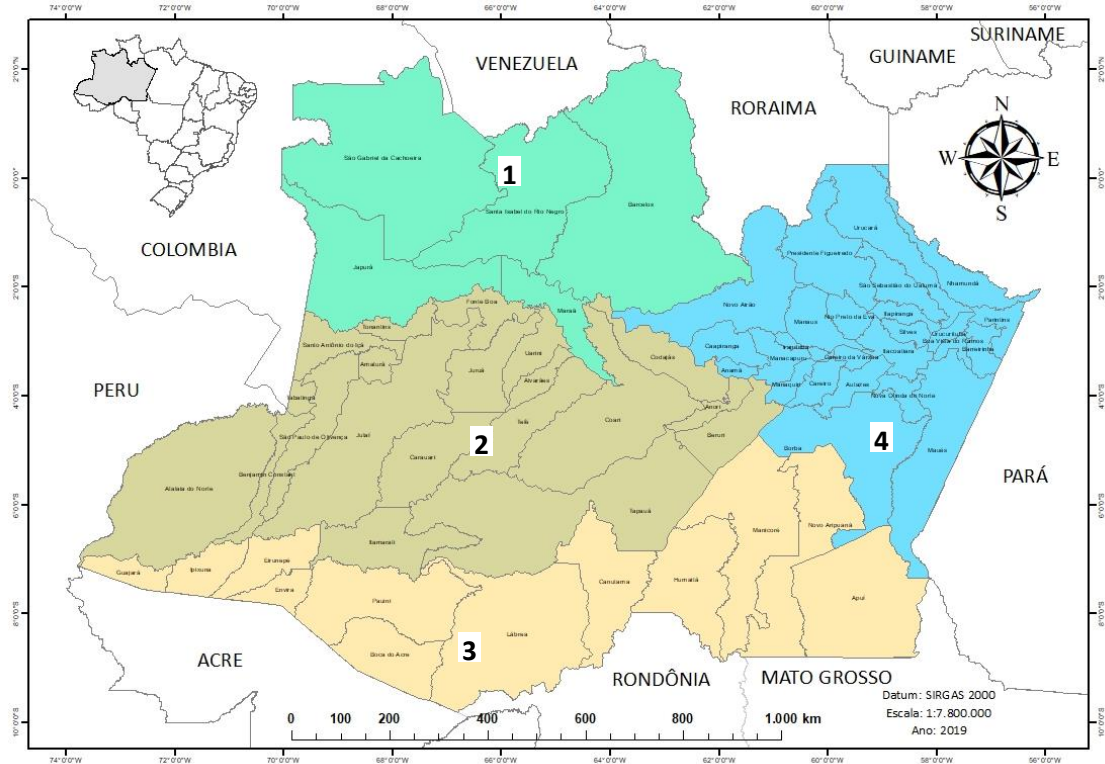


Figure 2 - Prevalence of *T. gondii* antibodies in cattle for municipalities from state of Amazonas, Brazil.

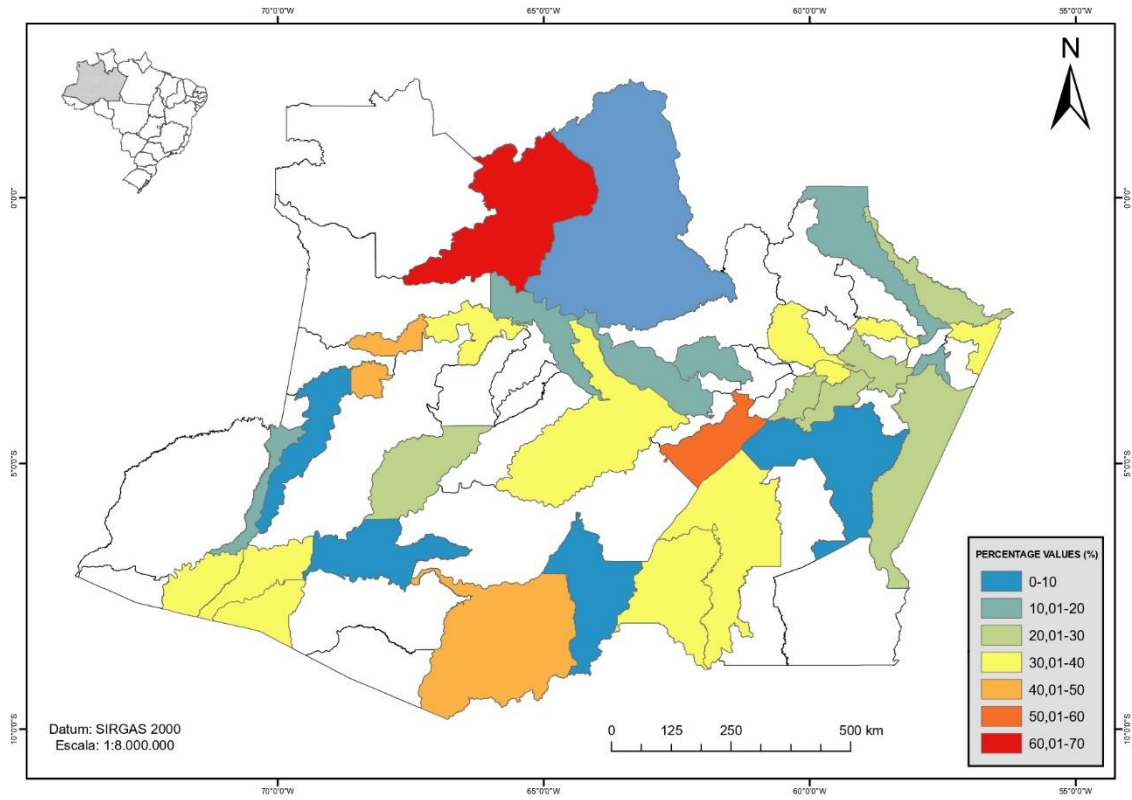


Table1 - The prevalence of the infection in subpopulations and by property is shown.

subpopulation	Total No. of animals	Positive animals	<i>Toxoplasma</i> infection frequence
1	64	22	34.4%
2	174	46	26.4%
3	467	169	36.2%
4	368	95	25.8%
Subtotal	1073	332	30.9%

Table 2: Univariate analysis and logistic regression of risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in cattle in the state of Amazonas, Brazil.

Variable	N	Positive (%)	Univariate Regression		
			<i>p</i> value	OR	<i>p</i> value
Type of herd					
Beef	834	260 (31.2%)	0.931		
Dairy	25	8 (32.0%)			
Mixed	214	64 (29.9%)			
Type of farming system					
Dry land	810	267 (32.9%)	0.024	-	
Wetland	10	4 (40.0%)		0.73 (0.20 – 2.63)	0.639
Dry land + Wetland	253	61 (24.1%)		0.47 (0.13 – 1.74)	0.262
Size of farm (Ha)					
< 50	170	60 (35.3%)	0.030	-	
51 to 500	626	174 (27.8%)		0.89 (0.53 – 1.44)	0.652
> 501	277	98 (35.4%)		1.38 (0.79 – 2.40)	0.256
Number of animals					
1 – 10	36	4 (11.1%)	0.012	-	
11 – 50	72	25 (34.7%)		3.80 (1.09 – 13.21)	0.035
51 – 100	236	86 (36.4%)		4.43 (1.49 – 13.08)	0.007
More than 100	729	217 (29.8%)		2.84 (0.98 – 8.20)	0.053
Source of water supply					
Running water	306	88 (28.8%)	0.008	-	
Still water	230	56 (24.4%)		0.79 (0.53 – 1.17)	0.254
Running + Still water	537	188 (35.0%)		1.33 (0.98 – 1.80)	0.063
Presence of domestic cats					
Cats	656	242 (36.9%)	0.000	1.98 (1.44 – 2.71)	0.000
Other animals	294	67 (22.8%)			
Presence of wild animals					
Yes	848	271 (31.9%)	0.093		
No	225	61 (27.1%)			

4.2 ARTIGO 2

Neospora caninum infection in cattle in the state of Amazonas, Brazil: seroprevalence, spatial distribution and risk factors

Artigo submetido ao periódico Parasite Epidemiology and Control– ISSN 2405-6731

(Qualis A1 – Fator de impacto: 2.629 - Área de avaliação: Medicina Veterinária)

NEOSPORA CANINUM INFECTION IN CATTLE IN THE STATE OF AMAZONAS, BRAZIL: SEROPREVALENCE, SPATIAL DISTRIBUTION AND RISK FACTORS

ABSTRACT

Livestock productivity in Brazil's Amazon region is lower in the state of Amazonas than in the states of Pará, Tocantins, Rondônia and Roraima. The aim of this study was to determine the prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle, its spatial distribution and the risk factors associated with *N. caninum* infection in the state of Amazonas. Blood samples were collected from 1073 animals on 47 farms, located in 33 municipalities in the four state subpopulations. Anti-*N. caninum* IgG antibodies were detected using the indirect fluorescent antibody test (IFAT). The overall prevalence was 30.2%, and seropositive animals were identified at 43 farms (91.5%), with a prevalence rate varying from 2.2% to 69.2%. All the subpopulations studied in the state of Amazonas had cattle herds seropositive for *N. caninum*, with the highest prevalence found in subpopulation 4. This is the first seroepidemiological study of *N. caninum* infection in cattle in the state of Amazonas, Brazil. This infection is attributed to the presence of dogs, the livestock farming system and water sources.

Keywords: Dog; Amazon rainforest; Neosporosis.

INTRODUCTION

In Brazil's Amazon region, livestock productivity is lower in the state of Amazonas than in the states of Pará, Tocantins and Roraima (Valentim and Andrade, 2009). Amazonas is estimated to have 1.48 million head of cattle, which corresponds to only 0.69% of the national herd (Brasil, 2019; Adaf, 2019). Several obstacles hinder the development of beef cattle in this state. Factors such as deforestation, pasture degradation, high rainfall indices, and lack of information about diseases that affect zootechnical indices all contribute to meager production and economic rates (Arima et al., 2005). Infectious diseases are considered an important etiological cause of losses in cattle herds (Pinheiro et al., 2000; Reichel et al., 2013), above all neosporosis, which is considered the main disease associated with reproductive impairment in cows in different regions around the world (Dubey et al., 2007; Dubey and Schares, 2011; Mcallister, 2016).

Neosporosis is caused by the coccidium *Neospora caninum*. The main pathways of transmission of this disease are transplacental and the ingestion of sporulated oocysts excreted in the environment by the definitive hosts, especially domestic dogs (Mcalister et al., 1998; Donahoe et al., 2015). The pathogenicity of *N. caninum* varies according to its host species. Cattle are the most susceptible hosts, and the disease causes abortions, stillbirths and the birth of weak calves (Cavalcante, 2010). *N. caninum* infection in cattle is reported in every continent where cattle are raised (Dubey and ShcareS, 2011). However, prevalence rates of the infection in cattle herds vary significantly, depending on factors such as production systems, the presence of definitive hosts, herd health management, etc. (Ghalmi et al., 2012; Sun et al., 2015).

Several studies have been conducted in different regions of Brazil to detect anti-*N. caninum* IgG antibodies in cattle, whose prevalence ranges from 9.1% to 97.2% (Hasegawa et al., 2004; Vianna et al., 2008; Andreotti et al., 2010; Amaral et al., 2012; Silva et al., 2017).

In the Amazon region, *N. caninum* infection has been described in the states of Pará (Minervino et al., 2008; Silva, et al., 2017), Rondônia (Aguiar, et al., 2006; Boas et al., 2015) and Tocantins (Martins et al., 2011), with prevalence rates varying from 10.6% to 52%. However, there are no seroepidemiological studies of *N. caninum* infection in the state of Amazonas, so there is a gap in information about herd health and factors associated with infection in this region of the country. Thus, our aim was to determine the seroprevalence, spatial distribution and risk factors associated with *Neospora caninum* infection in cattle herds in the state of Amazonas.

MATERIAL AND METHODS

Farms and sampling

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), under protocol no. 80/2018.

To make up the sample of this study, farms were selected in the four subpopulations in the state of Amazonas, defined by the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply – MAPA (Brasil, 2014) (see Figure 1). These subpopulations are as follows: Subpopulation 1 – comprising the municipalities of Rio Negro and its tributaries; Subpopulation 2 – composed of the municipalities of Rio Solimões and its tributaries; Subpopulation 3 – comprising the municipality of Apuí and the other municipalities of the Madeira River and its tributaries, and Subpopulation 4 – comprising the other municipalities of the state of Amazonas on its border with the state of Pará.

Blood samples were collected from 1073 reproductively mature cows (older than 24 months) on farms with more than 10 cattle (primary sampling units) in 33 municipalities. The animals were identified individually by an ear tag usually attached to the left ear. This tag number was recorded on the label of the vacutainer tube and on a sample collection form. For the study sample calculation, an expected prevalence of 50%, 95% confidence and 5%

statistical error were considered (Thrusfield, 2004). The sample size of the study was calculated considering a 50% prevalence rate, 95% confidence interval and 5% statistical error (Thrusfield, 2004).

Sample collection for serology

Blood samples were collected by venipuncture of the external jugular vein into sterile and tagged vacutainer tubes. Ten mL of blood without anticoagulant were drawn into individual test tubes after prior skin antisepsis with 3.0% iodinated alcohol. The samples were centrifuged at 1000 x g for five minutes to obtain serum. The blood sera were aliquoted and stored at -20°C until serological tests were performed.

Preparation of antigen for the IFAT

Neospora caninum antigen stored in a culture of MARC-145 cell monolayers was used, according to the conditions described by Regidor-Cerrillo et al. (2010). The number of viable tachyzoites was determined by counting in a Neubauer chamber using 0.2% trypan blue. The purified tachyzoites were suspended in 0.6% formalin solution in PBS, adjusted to a concentration of 1200-1500 parasites/ μ L, and each well of the slides for the indirect fluorescent antibody test (IFAT) was sensitized with 10 μ L of the tachyzoite suspension. All the microscope slides were fixed in acetone at -20°C and stored under refrigeration until use. Todas as lâminas foram fixadas em acetona a -20°C e estocadas sob refrigeração até o uso.

Survey of anti-*N. caninum* IgG antibodies

To begin with, serum samples were diluted 1:200 (cutoff) (Gondim et al., 1999) in 1X PBS, distributed in the wells of the sensitized slides and incubated in a humidifying chamber at 37°C for 30 min. The slides were then washed and reincubated with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-bovine IgG serum (Sigma Chemical, USA) containing 0.02% Evans blue (Sigma Chemical, USA). Lastly, the slides were washed again, covered with buffered glycerine and coverslips and examined under an epifluorescence microscope (Nikon

Eclipse 40x objective lens). Samples were considered positive when 50% of the tachyzoites in the wells presented total peripheral fluorescence. Serum samples known to be positive and negative were included as control samples.

Spatial distribution of *N. caninum* infection

The coordinates of each farm were determined by georeferencing, using a TrackMaker® PRO GPS to characterize the map of the state of Amazonas. The georeferenced data were entered into the ArcMap version 12.2.2 program, using the kernel density estimator, which is a non-parametric technique that allows the variability of a data set to be filtered while preserving the essential local characteristics of the data (Bailey and Gatrell, 1995).

Risk factors associated with *N. caninum* infection

The absolute and relative frequencies were subjected to dispersion. The risk factors associated with *Neospora caninum* infection were studied based on an analysis of the variables of interest using Pearson's chi-square test or Fisher's exact test, when necessary. A logistic regression analysis was then performed, considering the IFAT results (positive or negative) as the dependent variable. The independent or explanatory variables considered in the final model were those with a statistical significance of <0.05 . The statistical calculations were made using Epi Info version 3.5.1 software.

RESULTS

Survey of anti-*N. caninum* IgG antibodies

The prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle in the state of Amazonas was 30.2% (324/1073; CI 95% – 27.5% – 33.0). An analysis of the results per farm indicated that 43 of the farms (91.5%) had at least one positive animal, and that prevalence rates ranging from 2.2% to 69.2%. Figure 2 illustrates the prevalence rates by municipality. Subpopulations 1, 2, 3 and 4 showed average prevalence rates of 26.6, 24.1, 29.1 and 35.1%, respectively. Figure 3 illustrates the prevalence rates per farm.

Spatial distribution of *N. caninum* infection

The spatial distribution of the prevalence rates of anti-*N. caninum* antibodies on farms in the state of Amazonas indicated that these rates varied from 2.2 to 69.2%, with the highest seroprevalence found in subpopulation 4 (Figure 3), based on the kernel estimate.

Risk factors associated with *N. caninum* infection

A univariate analysis revealed a significant association between *N. caninum* infection in cattle and the following variables: livestock exploitation ($p=0.009$); type of farming system ($p=0.012$); water source ($p=0.000$); presence of dogs ($p=0.000$); occurrence of abortion ($p=0.000$); newborn mortality ($p=0.000$); and birth of weak calves ($p=0.000$) (see Table 2).

The following risk factors for cattle in this region were identified by logistic regression: dairy farming (OR=2.71), herds raised on a combination of dry and flooded lands (OR=1.54), source of running water in association with standing water, presence of dogs (OR=1.80), occurrence of abortion on the farm (OR=2.35), newborn mortality (OR=2.46), and birth of weak calves (OR=1.88) (see Table 2).

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first study on the epidemiology of *N. caninum* infection in cattle herds in the state of Amazonas, where a prevalence rate of 30.2% (324/1073) was found. In fact, reported prevalence rates of *N. caninum* infection in beef cattle in Brazil vary widely. For example, in the state of Pará, Silva et al. (2017) found 19.2% and Minervino (2008) reported 52% prevalence. In the state of Rondônia, prevalence rates of 9.5% (Aguiar et al., 2006) and 11.2% (Boas et al., 2015) were found, and in Tocantins the prevalence was 25% (Martins et al., 2011).

Subpopulation 4 showed a higher prevalence (35.1%) than did Subpopulations 1, 2 and 3 (26.6, 24.1 and 29.1%), although the statistical difference between was negligible. An analysis of the kernel density estimation map for *N. caninum* infection in cattle in the state of

Amazonas revealed the presence of seropositive animals distributed throughout the state (Figure 3). with at least one animal testing positive for the infection at 91.5% of the farms involved in this study.

In Brazil, the prevalence of anti-*N. caninum* antibodies varies widely, ranging from 9.1% to 97.2% (Hasegawa et al., 2004; Vianna et al., 2008; Andreotti et al., 2010; Amaral et al., 2012; Silva et al., 2017). Amazonas is a continental size state with environmental, sociocultural, economic and political differences, as well as geographical and ecological characteristics that may partly explain the widely varying prevalence rates among the farms.

Dairy farms were identified as a risk factor for *N. caninum* infection and were 2.71-fold more likely to have infected cattle. The animal farming system employed by these farms may increase the risk of infection because it is more intensive, thus facilitating the transmission of the parasite. Almeida et al. (2009) reported a similar finding, i.e., that dairy herds are more susceptible to *N. caninum* infection than beef cattle, because this livestock farming system is more intensive and the animals remain in this system for longer periods.

Raising herds on a combined system of dry and flooded lands, which is exclusively the case of Subpopulation 4, was also identified as a risk factor (OR=1.54). This mesoregion has two characteristic seasons: the dry season, from July to December, characterized by low water levels of the Amazon River, exposing the naturally fertilized floodplain lands, and the wet season, from January to June, characterized by the rising level of the river, whose waters flood the surrounding lowlands, forcing the riverine population and their livestock, including cattle, to move to higher ground (Filizola et al., 2006). This seasonal flooding causes cattle herds to concentrate on small areas of dry land, where they are in direct contact with dogs and other domestic animals in the surroundings, in livestock sheds and at feed troughs. Conversely, in the dry season, cattle are raised on the floodplains, in collective systems where several species of livestock occupy the same area. Dogs, which were previously raised on dry

land, move to the floodplains with the herds. We believe that this migration increases environmental contamination with oocysts, leading to a higher prevalence of *N. caninum* infection in this mesoregion. Similar findings were reported by Dubey et al. (2007), who demonstrated that husbandry management is a risk factor for environmental contamination by *N. caninum*.

The presence of dogs on the farms was also considered a risk factor in our study. Cattle raised on farms where dogs lived were 1.80-fold more likely to be infected with *N. caninum*. According to Dubey et al. (2007) and McAllister et al. (1998), the presence of dogs is considered a risk factor, since they are the definitive hosts of *N. caninum*. Oocysts, the environmentally resistant stage of the parasite, are excreted in dog feces, contaminating the environment and transmitting the parasite to cattle via horizontal transmission through the ingestion of sporulated *N. caninum*. Ghalmi et al. (2012) found that water sources on a farm are important reservoirs of *N. caninum* oocysts, because they can become contaminated by these infecting forms excreted in the feces of the definitive hosts. The findings of the aforementioned authors corroborate those of our study, which confirmed that animals that drink running water in association with standing water were 2.10-fold more likely to become infected.

A strong correlation was found between abortion, newborn mortality and the birth of weak calves on farms where cows tested positive for anti-*N. caninum* antibodies. This finding is similar to that reported by Boas et al. (2015), who stated that the birth of weak calves, abortions and newborn mortality and the presence of *N. caninum* are correlated, and that the occurrence of the disease is closely associated with production losses, as we found in our study. Other studies have demonstrated that the probability of abortion occurring among seropositive cows is two to seven times higher than among seronegative animals (Dubey

and Schares, 2011), and that this risk is 7.4-fold higher among congenitally infected heifers (Thurmond and Hietala, 1997).

CONCLUSIONS

This is the first seroepidemiological study of *N. caninum* infection in cattle in the state of Amazonas, Brazil. Infected animals were found in all the subpopulations of the state, and the infection was attributed to the presence of dogs, the livestock farming system and to water sources.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the assistance of the staff at the Laboratory of Infectious Diseases of the Federal Rural University of Pernambuco – UFRPE and the staff of the Amazonas Agriculture and Forest Protection Agency (ADAF).

REFERENCES

- ADAF. Agência de Defesa Agropecuária e Florestal do estado do Amazonas 2019. Available at: <http://www.adaf.am.gov.br/pnefa/>
- Aguiar, D.M., Cavalcante, G.T., Rodrigues, A.A.R., Labruna, M.B., Camargo, L.M.A., Camargo, E.P., 2006. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. *Vet. Parasitol.* 142(1-2): 71-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.06.014>.
- Almería, S., Lopez-Gatius, F., Garcia-Inpierto, I., Nogareda, C., Bech-Sabat, G., Serrano, B., Santolaria, P., Yaniz, J.L., 2009. Effects of crossbreed pregnancies on the abortion risk of *Neospora caninum* in dairy cows. *Vet. Parasitol.* 163, 323-329. [https://doi:10.1016/j.vetpar.2009.04.026](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.04.026).
- Andreotti, R., Barros, J.C., Pereira, A.R., Oshiro, L.M., Cunha, R.C., Figueiredo Neto, L.F., 2010. Association between seropositivity for *Neospora caninum* and reproductive

performance of beef heifers in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 19, 119-123. <http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01902010>.

Amaral, R.L.G., Silva, L.B.G., Pinheiro Junior, J.W., Souza Neto, O.L., Leal, C.A.S., Porto, W.J.N., Barbosa, J.M.P., Mota, R.A., 2012. *Neospora caninum* em bovinos em matadouros de Pernambuco e Alagoas. *Pesq. Vet. Bras.* 32,953-966.<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012001000002>.

Arima, E., Barreto, P., Brito, M., 2005. *Pecuária na Amazônia: tendências e implicações para a conservação ambiental*. Belém: Instituto do Homem e Meio Ambiente da Amazônia. Reference to a website:

Bailey, T.C., Gatrell, A.C., 1995. *Interactive spatial data analysis*. Essex: Longman.

Boas, R.V., Pacheco, T.A., Melo, A.L.T., Oliveira, A.C.S., Aguiar, D.M., Pacheco, R.C., 2015. Infection by *Neospora caninum* in dairy cattle belonging to family farmers in the northern region of Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 24, 204-208. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612015035>.

Brasil. 2019. Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento. Calendário anual de vacinação Aftosa.
<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidadeanimalevegetal/saudeanimal/programas-de-saude-animal/febre-aftosa/febre-aftosa-campanha/> (accessed 13 June 2019).

Dubey, J.P., Schares, G., Ortega-Mora, L.M., 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 323-367. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00031-06>. PMID:17428888.

Dubey, J.P., Schares, G., 2011. Neosporosis in animals: the last five years. *Vet. Parasitol.* 180, 90-108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.031>. PMID:21704458.

Donahoe, S.L., Lindsay, S.A., Krockenberger, M., Phalen, D., Slapeta, J., 2015. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. *Int.*

J.Parasitol. Parasites. Wildl. 4, 216-238. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.04.002>. PMID:25973393.

Ghalmi, F., China, B., Ghalmi, A., Hammitouche, D., Losson, B., 2012. Study of the risk factors associated with *Neospora caninum* seroprevalence in Algerian cattle populations. Res. Vet. Sci. 93, 655-661. <http://doi:10.1016/j.rvsc.2011.12.015>.

Gondim, L.F., Sartor, I.F., Hasegawa, M., Yamane, I., 1999. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Vet. Parasitol.* 86, 71-75. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00129-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00129-6).

Hasegawa, M.Y., Sartor, I.F., Canavessi, A.M.O., Pinckney, R.D., 2004. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos de corte e em cães rurais da região de Avaré, estado de São Paulo, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias.* 25, 45-50. <http://dx.doi.org/10.5433/16790359.2004v25n1p45>.

Martins, N.É.X., Freschi, C.R., Baptista, F., Machado, R.Z., Freitas, F.L.C., Almeida, K.S., 2011. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas lactantes do município de Araguaína, estado do Tocantins, Brasil. *Rev. Patol. Trop.* 40, 231-238. <http://dx.doi.org/10.5216/rpt.v40i3.15973>.

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*. *Int. J. Parasitol.* 28, 1473-1478. PMID: 9770635

McAllister, M.M., Diagnosis and control of bovine neosporosis. 2016. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 32, 443-463. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2016.01.012>. PMID:27161392.

Minervino, A.H.H., Ragozo, A.M.A., Monteiro, R.M., Ortolani, E.L., Gennari, S.M., 2008. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle from Santarém, Pará, Brazil. *Res. Vet. Sci.* 84, 254-256. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.05.003>.

- Pinheiro, R.R., Gouveia, A.M.G., Alves, F.S.F., Haddad, J.P.A., 2000. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 52, 534-543. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352000000500021>.
- Regidor-Cerrillo, J., Gómez-Bautista, M., Del Pozo I., Jiménez-Ruiz, E., Aduriz, G., Ortega-Mora, L.M., 2010. Influence of *Neospora caninum* intra-specific variability in the outcome of infection in a pregnant BALB/c mouse model. *Vet. Res.* 41, 52. <http://dx.doi.org/10.1051/vetres/2010024>.
- Reichel, M.P., Ayanegui-Alcérreca, M.A., Gondim, L.F., Ellis, J.T., 2013. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - The billion dollar question. *Int. J. Parasitol.* 43, 133-142. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.022>.
- Silva, J.B., Nicolino, R.R., Fagundes, G.M., Bomjardim, H.A, Dos Santos Belo Reis, A., da Silva Lima, D.H., Oliveira, C.M.C., Barbosa J.D., da Fonseca, A.H., 2017. Serological survey of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle (*Bos indicus*) and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in ten provinces of Brazil. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 52, 3035. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2017.05.005>
- Thrusfield, M.V., 2004. *Epidemiologia Veterinária*. 2nd ed. São Paulo: Roca.
- Thurmond, M., Hietala, S., 1997. Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210, 672-674. PMID: 9054999
- Valentim, J.F., Andrade, C.M.S., 2009. Tendências e Perspectivas da Pecuária Bovina na Amazônia Brasileira. *Amazônia: Ci. & Desenv.* Belém, 4, n. 8, jan/jun.
- Vianna, L.C., Sartor, I.F., Pituco, E.M., Okuda, H.L., Camargo, C.N., Kronka, S.N., 2008. Incidence and transplacental transmission of *Neospora caninum* in primiparous females from *Bos indicus* slaughtered in Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias.* 29, 387-392. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2008v29n2p387>.

Figure 1 - Map of the subpopulations 1, 2, 3 and 4 of the state of Amazonas, according to the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply.

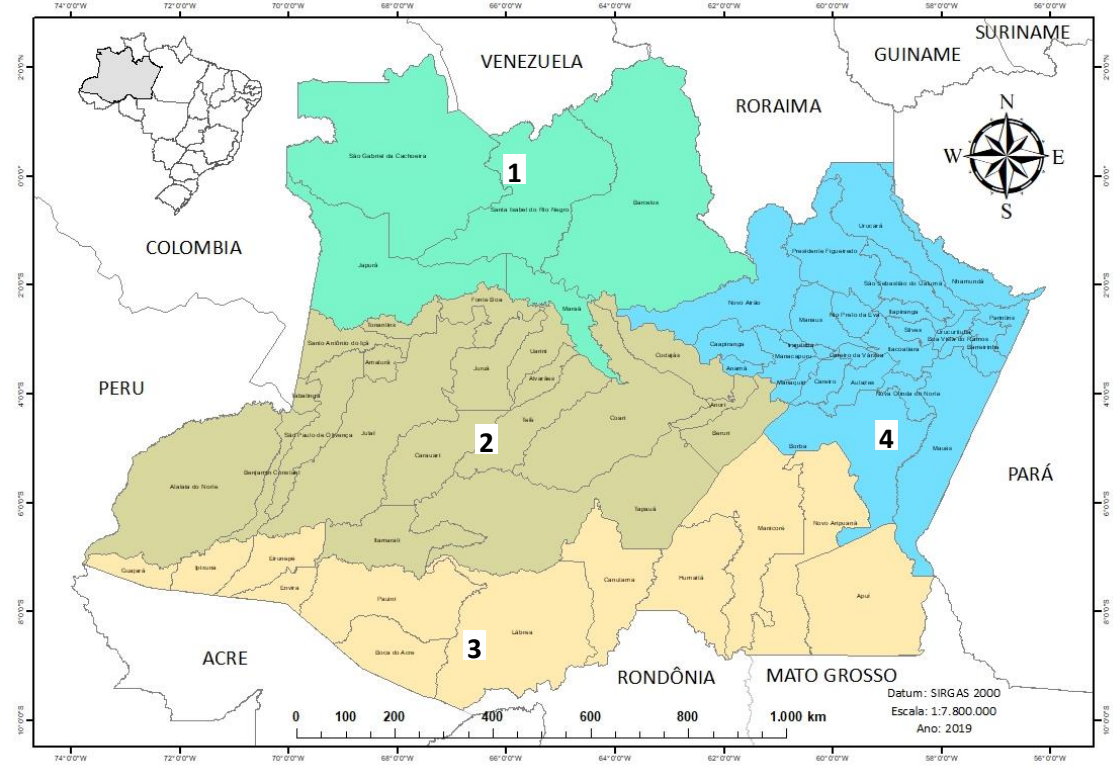


Figure 2 - Prevalence of anti-*T. gondii* antibodies in cattle for municipalities from state of Amazonas, Brazil.

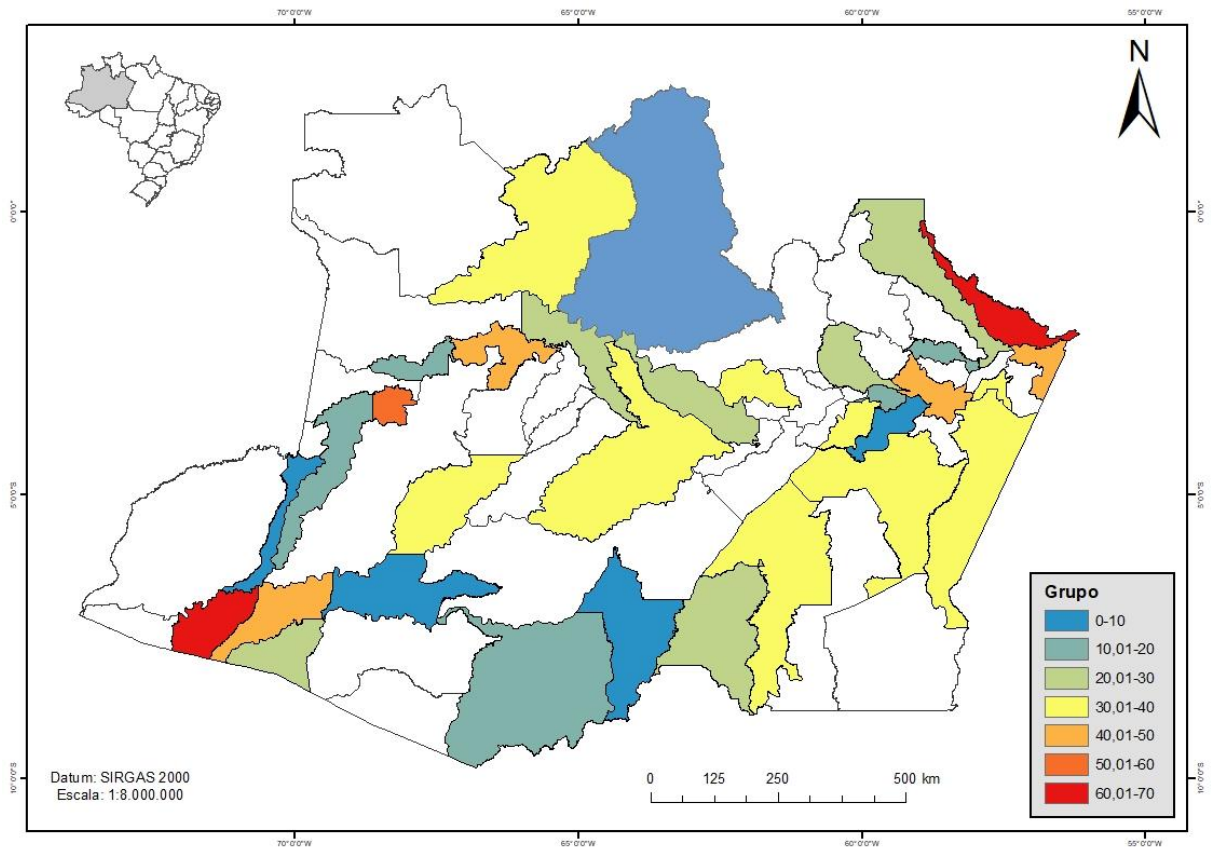


Figura 3: Kernel density estimation of the prevalence of *Neospora caninum* infection in cattle in the state of Amazonas, Brazil.

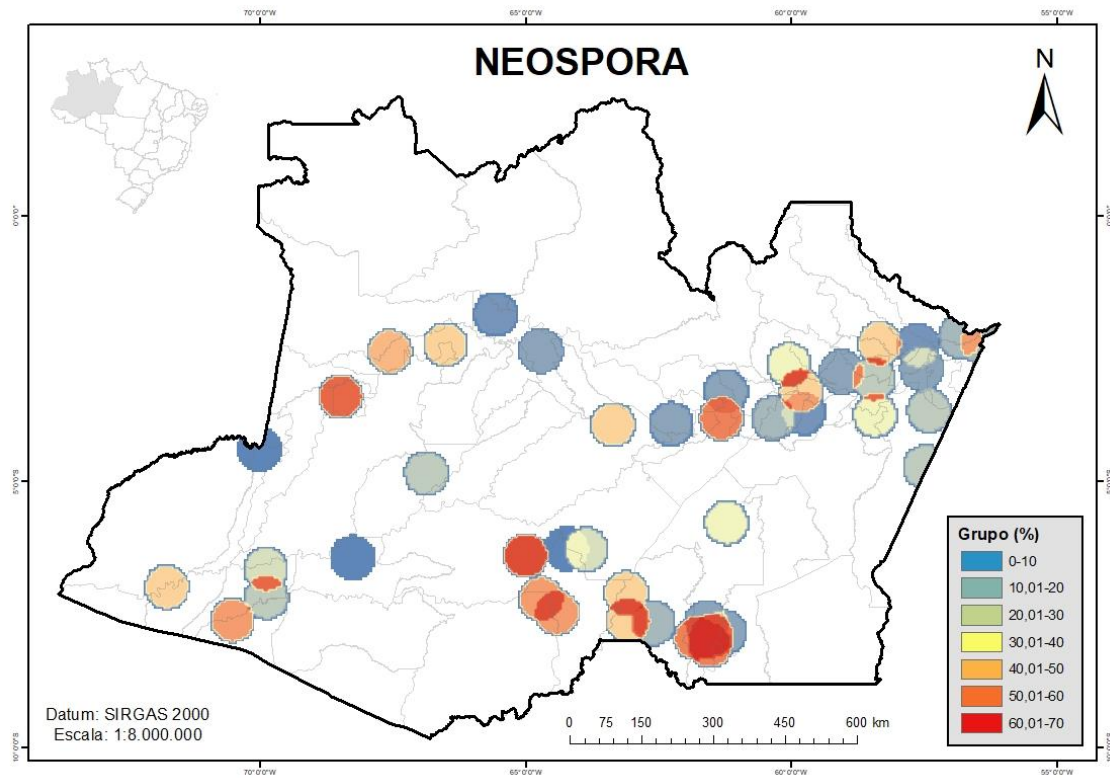


Table 1: Prevalence of anti-*N. caninum* antibodies per farm in the state of Amazonas, Brazil.

Sp	Municipality	Farm code	Total No. of animals	Positive animals	Neosporosis infection frequency	
1	Barcelos	A.1	4	0	0.0%	
	Maraã	A.2	17	7	41.2%	
		A.3	14	3	21.4%	
	Santa isabel do rio negro	A.4	9	3	33.3%	
	Tonantins	A.5	20	4	20.0%	
	Subtotal		64	17	26,6%	
2	Amaturá	B.6	12	7	58,3%	
	Benjamin constant	B.7	26	4	15.4%	
	Beruri	B.8	25	13	52.0%	
	Carauari	B.9	20	8	40.0%	
	Coari	B.10	15	0	0.0%	
	Codajás	B.11	25	7	28.0%	
	Fonte boa	B.12	20	10	50.0%	
	Itamarati	B.13	25	1	4.0%	
	São paulo de Olivença	B.14	6	1	16.7%	
		Subtotal		174	51	29,3%
	3	Canutama	C.15	25	0	0.0%
		Eirunepé	C.16	25	11	44.0%
		Envira	C.17	20	2	10.0%
			C.18	20	8	40.0%
C.19			30	1	3.3%	
Humaitá		C.20	26	0	0.0%	
		C.21	30	12	40.0%	
		C.22	20	10	50.0%	
		C.23	15	10	66.7%	
Ipixuna		C.24	31	6	19.3%	
		C.25	25	3	12.0%	
Manicoré		C.26	25	11	44.0%	
		C.27	25	8	32.0%	
		C.28	30	8	26.7%	
		C.29	30	11	36.7%	
		C.30	30	11	36.7%	
		C.31	60	24	40.0%	
	Subtotal		467	136	29,1%	
4	Autazes	D.32	25	6	24.0%	
	Boa vista do ramos	D.33	25	8	32.0%	
	Borba	D.34	12	4	33.3%	
	Caapiranga	D.35	25	10	40.0%	
	Careiro castanho	D.36	25	10	40.0%	
	Careiro da várzea	D.37	10	2	20.0%	
	Itacoatiara	D.38	30	13	43.3%	
		D.39	20	8	40.0%	
		D.40	19	9	47.4%	

Itapiranga	D.41	20	3	15.0%
Manaus	D.42	17	3	17.6%
Maués	D.43	25	11	44.0%
	D.44	16	5	31.2%
Nhamundá	D.45	13	9	69.2%
Parintins	D.46	50	22	44.0%
Urucará	D.47	36	10	27.8%
Subtotal		368	133	36,1%
TOTAL		1073	324	30.2%

Table 2: Univariate analysis and logistic regression of risk factors associated with *Neospora caninum* infection in cattle in the state of Amazonas, Brazil.

Variable	N	Positive (%)	Univariate	Regression	
			<i>p</i> value	OR	<i>p</i> value
Type of herd					
Mixed	214	48 (22.4%)		-	
Beef	834	265 (31.8%)	0.009	1.61 (1.13 – 2.29)	0.008
Dairy	25	11 (44.0%)		2.71 (1.15- 6.37)	0.021
Livestock farming system					
Dry land	810	227 (28.0%)		-	
Floodplain	10	2 (20.0%)	0.012	0.89 (0.18 – 4.35)	0.886
Dry land + Floodplain	253	95 (37.6%)		1.54 (1.12 – 2.11)	0.007
Size of farm (Ha)					
< 50	170	56 (32.9%)			
51 to 500	626	176 (28.1%)	0.213		
> 501	277	92 (33.2%)			
No. of cattle					
1 – 10 animals	36	10 (27.8%)			
11 – 50 animals	72	25 (34.7%)			
51 – 100 animals	236	77 (32.6%)	0.595		
More than 100 animals	729	221 (29.1%)			
Source of water supply					
Running water	306	64 (20.9%)			
Still water	230	68 (29.6%)	0.000	1.58 (1.06 – 2.35)	0.021
Running + Still water	537	192 (35.8%)		2.10 (1.51 – 2.91)	0.000
Presence of dogs					
Yes	737	254 (34.5%)			
No	239	54 (22.6%)	0.000	1.80 (1.28 – 2.52)	0.000
Abortions on the farm					
Yes	501	199 (39.7%)			
No	572	125 (21.9%)	0.000	2.35 (1.80 – 3.07)	0.000
Newborn mortality rate					
Low	607	138 (22.7%)		-	
Moderate	416	175 (42.1%)	0.000	2.46 (1.88 – 3.23)	0.000
High	50	11 (22.0%)		0.95 (0.47-1.92)	0.905
Birth of weak calves					
Yes	431	165 (38.3%)			
No	642	159 (24.8%)	0.000	1.88 (1.44 – 2.45)	0.000

4.3 ARTIGO 3

Serological monitoring and vertical transmission rate of *Neospora caninum* in cattle in the state of Amazonas, Brazil.

Submetido a Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária – ISSN 0103-846X

(Qualis A2 – Fator de impacto: 1.013 - Área de avaliação: Medicina Veterinária)

**SEROLOGICAL MONITORING AND VERTICAL TRANSMISSION
RATE OF *NEOSPORA CANINUM* IN CATTLE IN THE STATE OF
AMAZONAS, BRAZIL**

Monitoramento sorológico e taxa de transmissão vertical de *Neospora caninum* em bovinos no Estado do Amazonas, Brasil.

Paulo Cesar Gonçalves de Azevedo Filho^{1,2}; Jomel Francisco dos Santos¹; Arthêmio Coelho dos Reis³; Müller Ribeiro-Andrade²; José Wilton Pinheiro Júnior²; Sandra Regina Fonseca de Araújo Valença²; Erika Fernanda Torres Samico Fernandes²; Rinaldo Aparecido Mota²

¹Federal Institute of Education, Science and Technology of Amazonas – IFAM, Campus Manaus Zona Leste, Manaus, AM, Brazil

²Department of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco – UFRPE, Recife, PE, Brazil

³Amazonas Agriculture and Forest Protection Agency– ADAF, Manaus, AM, Brazil

ABSTRACT

This study involved a nine-month period of serological monitoring for cows neosporosis in seropositive cattle herds in the state of Amazonas at five farms where a prevalence of *Neospora caninum* infection of $\geq 40\%$ was detected. Vertical transmission of *N. caninum* was determined based on serological testing of precolostral blood samples from calves produced by seropositive cows. The initial prevalence of the infection at the five farms was 53.74% (43/80) while the final prevalence was 63.75% (51/80). A vertical transmission rate of 8.70% was observed. This study revealed an increase in the seroconversion rate for anti-*Neospora caninum* IgG antibodies among cows in serologically monitored herds, and a lower vertical

transmission rate of the parasite in the conditions of cattle husbandry in Brazil's Amazon region.

Keywords: *Neospora caninum* infection, Amazon rainforest, birth.

RESUMO

Objetivou-se realizar um monitoramento sorológico para neosporose bovina em rebanhos soropositivos no estado do Amazonas por um período de nove meses em cinco propriedades com prevalência da infecção por *Neospora caninum* $\geq 40\%$. Para o estudo da transmissão vertical de *N. caninum* realizou-se a sorologia pré-colostral em amostras sanguíneas de bezerros filhos de vacas soropositivas. A prevalência inicial nas cinco propriedades foi de 53,74% (43/80) e a prevalência final foi de 63,75% (51/80). Observou-se uma taxa de transmissão vertical de 8,70%. Este estudo demonstrou uma elevação na taxa de soroconversão de vacas em rebanhos monitorados sorologicamente para *Neospora caninum* e uma menor taxa de transmissão vertical do parasito nas condições de manejo dos bovinos na região Amazônica do Brasil.

Palavras Chaves: Infecção *Neospora caninum*; Floresta Amazonica; Natalidade.

INTRODUCTION

In Brazil's Amazon region, land is less expensive than in the country's south and southeast. That is why a large part of the country's cattle is raised in the Amazon region, which contributes significantly to Brazil position as one of the world's leading exporters of beef (BILLACRÊS & NOGUEIRA, 2011). Approximately 80% of the deforested areas in the region are used for pasture planting, which is the main factor responsible for environmental degradation there. However, unfortunately, cattle in this region are not raised under good management practices, thus producing low production volumes per area, which in turn leads to further deforestation aimed at opening up new pastureland (SCHLICKMAN & SHAUMAN, 2007).

Infectious diseases are considered the main factor responsible for economic losses in animal farming (PINHEIRO et al., 2000; REICHEL et al., 2013), particularly neosporosis, which is considered the main disease associated with reproductive losses in cattle herds in various regions around the world (DUBEY et al., 2007; DUBEY & SCHARES, 2011; MCALLISTER, 2016).

Neospora caninum abortions in cattle usually occur between the third and ninth month of gestation, and may be sporadic, endemic or epidemic. Studies have shown that vertical or congenital transmission of *N. caninum* is considered the most important in infected herds, and may occur over several generations (DUBEY & SCHARES, 2011). However, the definitive hosts also play an important role in horizontal transmission and maintenance of the infection in herds (SCHARES et al., 1998).

Studies in California and in the Netherlands found that 20% of cattle abortions are caused by *N. caninum*; abortion rates in Belgium and the United Kingdom are around 12.5% (DAVISON et al., 1999; DE MEERSCHMAN et al., 2002); and in Spain between 10.7% and 57%, depending on the diagnostic technique employed (GONZÁLEZ et al., 1999; PEREIRA-BUENO et al., 2003). Studies in Canada have revealed an annual loss of cows attributed to *N. caninum* of approximately \$1,766.51 CAD per one hundred dams, or \$ 18.00 CAD per infected dam, with abortion accounting for 50% of economic losses (HADDAD et al., 2005).

In addition to abortions caused by neosporosis, other losses must also be considered, such as declining milk production, lower weight gain, infertility as a result of fetal death and resorption, discarding and replacement, and shortening of the animal's productive life, and veterinary costs (ALVAREZ-GARCÍA, 2003).

The purpose of this study was to perform serological monitoring for bovine neosporosis and to calculate the vertical transmission rate of *Neospora caninum* among seropositive cows in the state of Amazonas.

MATERIAL AND METHODS

Composition of groups

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal Rural University of Pernambuco, under Permit No. 080/2018. Cattle farms in the state of Amazonas where serology positive for *N. caninum* was identified were selected. The inclusion criteria were as follows: the farms had to have a 40% or higher prevalence of infected cows, easy access, and be situated in regions where livestock raising is economically

important. Based on these criteria, five farms were included where the cows were monitored serologically for a 9-month period according to table 1.

All the cows in the herd were initially subjected to an indirect fluorescent antibody test (IFAT) to identify the *Neospora caninum* infected females.

Serological monitoring for *Neospora caninum*

Over a period of nine months, three blood samples were collected from the cows (positive and negative) at 3-month intervals for serological screening tests. The samples were analyzed using the IFAT technique to screen for anti-*N. caninum* IgG antibodies.

Preparation of antigen for IFAT

Slides for the IFAT were sensitized with *N. caninum* isolate Nc-Sp7, kept in a culture of monolayers of MARC-145 cells in the conditions described by Regidor-Cerrillo et al. (2010). The number of viable tachyzoites was determined by counting in a Neubauer chamber using Trypan blue. They were then purified and resuspended in 0.6% formalin solution in phosphate-buffered saline (PBS), adjusted to a concentration of 1200-1500 parasites/ μ L; 10 μ L of this tachyzoite suspension was used to sensitize each well of the IFAT slides. All the slides were fixed in acetone at -20°C and kept refrigerated until use.

Screening for anti-*N.caninum* IgG antibodies

Initially, serum samples were diluted 1: 200 (cutoff) (GONDIM et al., 1999) in 1x PBS, distributed in the wells of the sensitized slides and incubated at 37°C for 30 minutes in a humidifying chamber. After this, the slides were washed and reincubated with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-bovine IgG serum (Sigma Chemical, USA) containing 0.02% Evans blue dye (Sigma Chemical, USA). Lastly, the slides were washed again, coated with buffered glycerol, coverslipped, and examined under an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse; 40x objective lens). The samples were considered positive when 50% of the tachyzoites in the well showed total peripheral fluorescence. Known positive and negative serological samples were included as controls in all the IFAT slides.

Evaluation of *N. caninum* vertical transmission rate

To study the vertical transmission of *N. caninum*, blood samples were drawn from calves born to seropositive cows shortly after birth, before they ingested colostrum

(precolostral serology). Sera were evaluated by IFAT, and calves with a precolostral titer of 100 were considered positive (ALVAREZ-GARCIA et al., 2003).

RESULTS

The initial prevalence at the five monitored farms was 53.74% (43/80). At the end of the serological monitoring of herds, the prevalence rate was 63.75% (51/80). Table 2 describes the prevalence rates per farm recorded during the study.

No abortion occurred during the monitoring period of the seropositive cows. From the 23 seropositive cows that calved at term at the five farms of this study, 02/23 calves were IFAT positive, with a cut-off titer of 100 and a vertical transmission rate of 8.70% (Table 3).

DISCUSSION

During this study, the overall prevalence was found to increase, rising from 53.74% (43/80) at time zero to 63.75% (51/80) after nine months of serological monitoring, with three of the five farms showing an increase in the number of seropositive cows. This finding is significant from the standpoint of *Neospora caninum* transmission, and the final prevalence rate proved to be higher than that identified in other studies conducted in the Amazon region, e.g., in Pará: 19.2% (SILVA et al., 2017), Rondônia: 9.5% and 11.2% (AGUIAR et al., 2006; BOAS et al., 2015) and Tocantins: 25% (MARTINS et al., 2011). The increase in the number of infected animals during the study can most likely be attributed to environmental contamination by oocysts, especially in view of the environmental factors characteristic of the Amazon region, which are conducive to parasite survival, as well as the presence of the parasite's definitive hosts (dogs) on farms (GOODSWEN et al., 2013). Vertical transmission of *N. caninum* is also considered the most efficient route of parasite transmission (DUBEY & SCHARES 2011). This transplacental transmission may occur through postnatal infection via the ingestion of oocytes (exogenous route) or by reactivation of the infection in chronically infected cows (endogenous route), and the transmission rate may differ in these two scenarios (WILLIAMS et al., 2009).

The cattle ranches of this study use the extensive livestock farming system, and our study identified problems of animal handling, such as the presence of dogs, definitive hosts of *Neospora caninum*, in direct contact with the cows. These dogs had access to the water

sources and feed destined for the cattle. In addition, cows seropositive for *Neospora caninum* were kept on the premises and dams were replaced without considering their serological status for *Neospora caninum*. These factors must have influenced the initial and final prevalence rates on the serologically monitored farms.

The presence of permanent hosts of the parasite in contact with the cattle and environmental contamination with *Neospora caninum* oocysts lead to a higher prevalence of the disease on farms. Studies by Dubey et al. (2007) found that animal husbandry is a risk factor for environmental contamination by *N. caninum*, in addition to the presence of dogs on farms, which increase the possibility of horizontal transmission of *N. caninum* in herds (DUBEY et al., 2007). Previous studies have also reported a significant association between animals seropositive for *Neospora caninum* and the presence of dogs in cattle herds (BRUHN et al., 2012; GHALMI et al, 2012; CEDEÑO & BENAVIDES, 2013; ASMARE et al., 2013).

The vertical transmission rate in our study was 8.70% (2/23). This rate is lower than that found in samples from slaughterhouses in Argentina, where the vertical transmission rate by *N. caninum* in fetal sera was 20.2% (21/104) (VENTURINI et al. 1999). Amaral et al. (2012) reported a vertical transmission rate of 16.7% in slaughterhouses in the Brazilian states of Pernambuco and Alagoas. This higher rate may be correlated to the health status of animals sent for slaughter, which in this case are animals with reproductive disorders, and may explain the higher vertical transmission rates detected in slaughterhouses.

Studies conducted in Costa Rica (ROMERO et al., 2002) and Germany (DIJKSTRA et al., 2003) have shown that the congenital infection rate of *N. caninum* decreases as the number of pregnancies of a cow increases, and hence, as it ages. According to the aforementioned authors, multiple pregnancies reduce the possibility of recurrence of infection, and hence, the vertical transmission rate of *N. caninum*. This information may, in part, explain the lower vertical transmission rate identified in our study, as these herds are composed mostly of old cows.

In our study we also found a low birth rate of 28.75% (23/80) on the five farms. The higher prevalence of *N. caninum* infection than that reported in other studies (AGUIAR et al., 2006; MARTINS et al., 2011; BOAS et al., 2015) may be responsible for the low conception and birth rate of the animals under study. *N. caninum* is recognized as one of the leading causes of abortion in cattle worldwide (DUBEY et al., 2007; DUBEY & SHARES, 2011), causing substantial reproductive losses in cattle by through abortion, the birth of weak calves, or persistently infected albeit clinically healthy animals (INNES et al., 2002). The

parasite may persist on a farm through congenitally infected animals, which pass it down vertically to other generations. Serological testing is an important tool for the detection of antibodies in animals with subclinical neosporosis, since there is a positive correlation between the presence of anti-*N. caninum* antibodies and low conception rates (ANDREOTTI et al., 2010; JUSTO et al., 2013).

CONCLUSIONS

This study detected an increase in the seroconversion rate in cows from herds monitored serologically for *Neospora caninum* infection, allied to a lower rate of vertical transmission of the parasite in the conditions of cattle husbandry in Brazil's Amazon region.

REFERENCES

- Aguiar DM, Cavalcante GT, Rodrigues AAR, Labruna MB, Camargo LMA, Camargo EP, et al. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. *Vet Parasitol* 2006; 142 (1-2): 71-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.06.014>.
- Amaral RL, Silva LB, Júnior JWP, Neto OLS, Leal CA, Porto WJ, et al., *Neospora caninum* em bovinos em matadouros de Pernambuco e Alagoas. *Pesq Vet Bras* 2012; 32 (10): 963–966. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012001000002>.
- Asmare K, Regassa F, Robertson LJ, Skjerve E, et al., Seroprevalence of *Neospora caninum* and associated risk factors in intensive or semi-intensively managed dairy and breeding cattle of Ethiopia. *Vet Parasitol* 2013; 193 (1-3): 85–94. <http://dx.doi.org.ez49.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.rvsc>
- Boas RV, Pacheco TA, Melo ALT, Oliveira ACS, Aguiar DM, Pacheco RC. et al., Infection by *Neospora caninum* in dairy cattle belonging to family farmers in the northern region of Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2015; 24 (2): 204-208. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612015035>.
- Andreotti A, Barros JC, Pereira AR, Oshiro LM, Cunha RC, Figueiredo Neto LF. et al., Association between seropositivity for *Neospora caninum* and reproductive performance of

beef heifers in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2010; 19 (2): 45-49. <http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01902010>.

Álvarez-García G, Collantes-Fernández E, Costas E, Rebordosa X, Ortega-Mora LM, et al., Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. *Vet Res* 2003; 34 (3) 341-352. <http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2003009>.

Billacrês MAR, Nogueira RJB. Aspectos da Pecuária Bovina no Amazonas: Produção, Transporte e Beneficiamento. *Revista Científica da AJES* 2011; 2 (4) 1-13.

Bruhn FRP, Daher DO, Lopes E, Barbieri JM, Da Rocha CMBM, Guimarães AM, et al., Factors associated with seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in southeastern Brazil. *Trop Anim Health Prod* 2012; 45 (5) 1093-1098. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-012-0330>.

Cedeño DQ, Benavides B. Seroprevalence and risk factors associated to *Neospora caninum* in dairy cattle herds in the municipality of Pasto, Colombia. *Revista Mvz Cordoba* 2013; 18 (1): 3311-3315. <https://doi.org/10.21897/rmvz.193>.

Davison HC, Otter A, Trees AJ, et al., Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle. *Int J Parasitol* 1999; 29 (8) 1189-1194. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(99\)00094-6](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00094-6).

De Meerschman F, Rettigner C, Focant C, Boreux R, Pinset C, Leclipteux T, Lossona B. et al., Use of a serum-free medium to produce in vitro *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* tachyzoites on Vero cells. *Vet Res* 2002; 33 (2), 159-168. <http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2002004>.

Dijkstra T, Barkema HW, Eysker M, Wouda W, et al., Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *Int J Parasitol* 2001; 31 (2): 209-215. DOI: 10.1016/s0020-7519(00)00160-0.

Dijkstra T, Barkema H, Eysker M, Beiboer ML, Wouda W, et al., Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. *Vet Parasitol* 2003; 110 (3-4): 161-169. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00323-0](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00323-0).

Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM, et al., Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Ver* 2007; 20 (2): 323-367. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00031-06>. PMID:17428888.

- Dubey JP, Schares G, Neosporosis in animals: The last five years. *Vet Parasitol* 2011; 180 (1-2): 90-108. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.031>.
- Ghalmi F, China B, Ghalmi A, Hammitouche D, Losson B, et al., Study of the risk factors associated with *Neospora caninum* seroprevalence in Algerian cattle populations. *Res Vet Sci* 2012; 93 (2): 655-661. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.12.015>.
- Goodswen SJ, Kennedy PJ, Ellis JT, et al., A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. *Infection, Genetics and Evolution* 2013; 13 (1): 133–150. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.08.012>
- Gondim LFP, Sartor IF, Hasegawa M, Yamane I, et al., Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Vet Parasitol* 1999; 86 (1): 71-75. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00129-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00129-6).
- González L, Buxton D, Atxaerandio R, Aduriz S, Maley SW, Marco JC, Cuervo LA, et al., Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. *Vet Record* 1999; 144 (6): 145-150. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.144.6.145>.
- Haddad JPA, Dohoo IR, Vanleewen JA, et al., A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle a Canadian perspective. *Can Vet J* 2005; 46 (3): 230-243.
- Innes EA, Andrianarivo AG, Björkman C, Williams DJ, Conrad PA, et al., Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitology* 2002; 18 (11): 497-504. [http://dx.doi.org/10.1016/s1471-4922\(02\)02372-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1471-4922(02)02372-3)
- Justo RV, Manfo BJ, Galhardo JÁ, Garcia JL, Campos AK, et al., Inquérito soroprevalência sobre neosporose bovina no norte do estado de Mato Grosso, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, 2013; 34 (6): 3897-3902. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl2p3897>.
- Martins NÉX, Freschi CR, Baptista F, Machado RZ, Freitas FLC, Almeida KS, et al., Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas lactantes do município de Araguaína, estado do Tocantins, Brasil. *Rev Patol Trop* 2011; 40 (3): 231-238. <http://dx.doi.org/10.5216/rpt.v40i3.15973>
- Mcallister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, Mcguire AM, et al., Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 1998; 28 (9): 1473-1478. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00138-6](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00138-6).

- Mcallister MM. Diagnosis and Control of Bovine Neosporosis. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* 2016; 32 (2): 443-463. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2016.01.012>.
- Pereira-Bueno J, Quintanilla-Goza A, Pérez-Pérez V, Espifelgueroso A, Álvarez-García G, Collantes-Fernández E, Ortega-Mora LM, et al., Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. *Vet Parasitol* 2003; 111 (1-2): 143-152. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00361-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00361-8).
- Pinheiro RR, Gouveia AMG, Alves FSF, Haddad JPA, et al., Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2000; 52 (5): 534-543. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352000000500021>.
- Reichel MP, Alejandra Ayanegui-Alcérreca M, Gondim LF, Ellis JT, et al., What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion-dollar question. *Int J Parasitol* 2013; 43 (2): 133-142. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.022>.
- Romero JJ, Perez E, Dolz G, Frankena K, et al., Factors associated with *Neospora caninum* serostatus in cattle of specialized Costa Rican dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. *Prev Vet Med* 2002; 53 (4): 263-273. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-5877\(01\)00290-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-5877(01)00290-2).
- Schares G, Peters M, Wurm R, Barwald A, Conraths FJ, et al., The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet Parasitol* 1998; 80 (2): 87-98. [http://dx.doi.org/10.1016/s0304-4017\(98\)00195-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-4017(98)00195-2)
- Schlickmann H, Schauman AS. Pecuária, Desmatamento e Desastres Ambientais na Amazônia. *Revista Ciências do Ambiente Online* 2007; 3 (2).
- Silva JB, Nicolino RR, Fagundes GM, Dos Anjos Bomjardim H, Dos Santos Belo Reis A, Silva DHL, Oliveira CMC, Barbosa JD, Fonseca AH, et al., Serological survey of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle (*Bos indicus*) and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in ten provinces of Brazil. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2017; 52 (1): 30-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2017.05.005>.
- Venturini MC, Venturini L, Bacigalupe D, Machuca M, et al., *Neospora caninum* - infections in bovine fetuses and dairy cows with abortions in Argentina. *Int J Parasitol* 1999; 29 (10): 1705-1708. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00143-5](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00143-5).
- Williams DJL, Hartley CS, Björkman C, Trees AJ, et al., Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum*: How the route of transmission impacts on

epidemiology and control of disease. *Parasitol*2009; 136 (14): 1895-1900.
<https://doi.org/10.1017/S0031182009990588>.

5 CONCLUSÃO

Esse estudo é o mais abrangente realizado no estado do Amazonas com alguns resultados inéditos e de grande importância para os rebanhos bovinos.

Animais soropositivos para *T. gondii* foram identificados em todas as subpopulações estudadas no estado do Amazonas, com algumas áreas apresentando maiores prevalências. É aconselhável corrigir os fatores de risco identificados, particularmente aqueles relacionados aos hospedeiros definitivos do parasito, além de focar a atenção no consumo de carne bovina, considerando a prevalência da infecção encontrada nos animais e as altas taxas de abate ilegal no estado.

No que se refere ao estudo soropidemiológico da infecção por *N. caninum* em bovinos no estado do Amazonas, é importante destacar que este é o primeiro relato da infecção por *N. caninum*. Animais infectados foram observados em todas as subpopulações do estado, estando associado à presença de cães, sistema de criação e fonte de água. A partir deste estudo, desenvolveu-se um estudo o monitoramento da infecção por este parasito em algumas propriedades, concluindo a existência de soroconversão de vacas e uma baixa taxa de transmissão vertical 8,7%.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA E FLORESTAL DO ESTADO DO AMAZONAS (ADAF). **Ações desenvolvidas pela coordenação de epidemiologia**. 2019. Disponível em: <http://www.adaf.am.gov.br/coordenacao-de-epidemiologia/> Acesso em: 05 Out. 2019.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDUSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE (ABIEC). **Estatísticas de abate de bovinos no estado do Amazonas**. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/Abates.aspx> Acesso em : 06 Ago.2019.
- ADL, S. M. et al. The Revised Classification of Eukaryotes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 59, n. 5, p.429-514, set. 2012. Doi: 10.1111/j.1550-7408.2012.00644.
- AGUIAR, D. M. et al. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 1-2, p.71-77, nov. 2006. Doi: 10.1016/j.vetpar.2006.06.014
- AGUIAR, D.M. et al. Seroprevalence and risk factors associated to *Neospora caninum* in female bovines from the western São Paulo State, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, p. 183-189, 2011.
- ALMERÍA, S.; LÓPEZ-GATIUS, F. Bovine neosporosis: Clinical and practical aspects. **Research In Veterinary Science**, v. 95, n. 2, p.303-309, out. 2013. Doi: 10.1016/j.rvsc.2013.04.008
- ALVAREZ-GARCÍA, G. et al. Influence of age and purpose for testing on the cutoff selection of serological methods in bovine neosporosis. **Veterinary Research**, v. 34, p. 341–352, 2003.
- AMARAL, R.L.G.et al. *Neospora caninum* em bovinos em matadouros de Pernambuco e Alagoas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**,v. 32, p.953-966, 2012. Doi: 10.1590/ S0100-736X2012001000002.
- ANDERSON, M. L. et al. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 417-431, 2000.
- ANDREOTTI, R. et al. Association between seropositivity for *Neospora caninum* and reproductive performance of beef heifers in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p.119-123, 2010. <http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01902010>.
- Arima, E. et al., *Pecuária na Amazônia: tendências e implicações para a conservação ambiental*. Belém: **Instituto do Homem e Meio Ambiente da Amazônia**, 2005.
- BAHIA, M. T. et al. Diagnosis of caprine toxoplasmosis by a dot enzyme-linked immunosorbent assay. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 45, p. 173-182, 1993.

BARR, C.B. et al. Neospora-like protozoal infections with bovine abortion. **Veterinary Pathology**, v. 28, p.110-116, 1991.

BARROS, J. C. et al. Diagnóstico da perda econômica causada pela neosporose na reprodução de novilhas de corte. Anais. **48ª Sociedade Brasileira de Economia Administração e Sociologia Rural**, Campo Grande, 2010.

BARTELS, C.J.M. et al. Effect of *Neospora caninum* serostatus on culling, reproductive performance and milk production in Dutch dairy herds with and without a history of *Neospora caninum* associated abortion epidemics. **Preventive Veterinary Medicine**, v.77, p.186-198, 2006.

BASTIEN, P. Diagnosis molecular: diagnosis of toxoplasmosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.96, p.205-215, 2002.

BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Z Parasitenkd journal**, v. 70, p. 271-274, 1984.

BLEWETT, D.A.; TRESS, A.J. The epidemiology of ovine toxoplasmosis with especial respect to control. **British Veterinary Journal**, v. 143, p. 128-135, 1987.

BOAS, R.V. et al. Infection by *Neospora caninum* in dairy cattle belonging to family farmers in the northern region of Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, p.204- 208, 2015.

BÓIA, M.N. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among indian people living in Iauareté, São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, p. 17-20, 2008.

BRUHN, F.R.P. et al. Factors associated with seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in southeastern Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 45, p. 1093-1098, 2013.

BUXTON, D. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. **Veterinary Research**, v. 29, p. 289–310, 1998.

BUXTON, D.; MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 12, 2002.

CAETANO-DA-SILVA, A. et al. Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. **Theriogenology**, v.62, p. 329–1336, 2004.

CAMARGO, M. E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v. 10, p. 143-171, 1974.

CAMILLO, G. et al. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos de leite do sudoeste do Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p.1511-13, 2010.

CANADA, N. et al. First Portuguese isolate of *Neospora caninum* from an aborted fetus from a dairy herd with endemic neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 110, p. 11-15, 2002.

CARDOSO, J. M. S. et al. Antibody dynamics during gestation in cows naturally infected with *Neospora caninum* from four dairy herds in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, p. 395-399, 2009.

CARDOSO, J.M.S. et al. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on three dairy farms in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 553-557, 2012.

CARMO, E.L. et al. Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos de corte abatidos na região metropolitana de Belém, Amazônia brasileira. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.26, p. 226-230, 2017.

CAVALCANTE, G. T. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Humans From Rural Western Amazon, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 3, p.647-649, jun. 2006. doi: 10.1645/ge-774r.1

CERQUEIRA-CÉZAR, C.K. et al. All about neosporosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.26, 2017.

CHANG, H. R. The potencial role of azithromycin in the treatment or prophylaxis of toxoplasmosis. **Internacional Journal of STD and AIDS**, v. 7, p.18-22, 1996.

COOK, A.J.C. et al. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre casecontrol study. **British Medical Journal**, v. 321, p.142-147, 2000.

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

COSTA, A.J. et al. Experimental infection of bovines with oocysts of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 63, p.212-218, 1977.

COSTA, V. M. M. et al. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31. p. 65-71, 2011.

COSTA-SILVA, T. A.; CHIOCCOLA, V. L. P. *Toxoplasma gondii* acute infection: estimation of humoral response and blood parasitism im mice AS/n inbred. **Social Science & Medicine**, v. 20, p.88-92, 2010.

DABRITZ, H.A.; CONRAD, P.A. Cats and *Toxoplasma*: implications for public health. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, p. 34-52, 2010.

DAGUER, H. et al. Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos e funcionários de matadouros da microrregião de Pato Branco, Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1133-37, 2004.

DINIZ, L.V. et al. Vertical transmission of *Neospora caninum* in bovine fetuses from a slaughterhouse in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 51, p.1751-55, 2019.

DE MAREZ, T. et al. Oral inoculation of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1647-57, 1999.

DEHKORDI, F.S. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in raw caprine, ovine, buffalo, bovine, and camel milk using cell cultivation, cat bioassay, capture ELISA, and PCR methods in Iran. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.10, p.120–125, 2013.

DONAHOE, S.L. et al. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, p.216-238, 2015.

DUBEY, J.P. Distribution of cysts and tachyzoites in calves and pregnant cows inoculated with *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**, v. 13, p. 199-211, 1983.

DUBEY, J. P. A review of toxoplasmosis in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 22, p. 177-202, 1986.

DUBEY, J.P. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, p. 1269-85, 1988.

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

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, p. 1593-98, 1994.

DUBEY, J.P.; LIN, T.L. Acute toxoplasmosis in a gray fox (*Urocyon cinereargenteus*). **Veterinary Parasitology**, v. 51, p. 321-325, 1994.

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

DUBEY, J.P. Distribution of tissue cysts in the organs of rats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Journal of Parasitology**, v. 83, p.755-757, 1997.

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

DUBEY, J. P. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 929-946, 2002.

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

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis, a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 57-72, 2004.

DUBEY, J.P.; BUXON D.; WOUDA W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**.v. 134, p. 267-289, 2006.

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

DUBEY, J.P.; JONES, J.L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States – **International Journal of Parasitology**, v. 38, p. 1257-78, 2008.

- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in sheep – the last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v.163, p. 1-14, 2009.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis of Animals and Humans. **CRC Press**, v. 2, p. 313, 2010.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals the last five year. **Veterinary Parasitology**, v.180, p. 90-108, 2011.
- DUBEY, J.P et al. Differential roles for inner membrane complex proteins across *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis* neurona development. **mSphere**, v. 18, n. 2, p. 409-17, 2017. doi: 10.1128/mSphere.00409-17
- ESTEBAN-REDONDO, I. et al. Detection of *T. gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. **Veterinary Parasitology**, v. 6, p. 155–71, 1999.
- FERRARONI, F.J.J.; MARZOCHI, M.C.A. Toxoplasmose em animais domésticos e silvestres de manaus-Amazonas. **Acta Amazonica**, v.8, p. 83-89, 1978.
- FIGLIUOLO, L.P.C.et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.123, p. 161–166, 2004.
- FRENKEL. J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, v.167, p.893-896, 1970.
- FREYRE, A. et al. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. **Veterinary Parasitology**, v. 73, p. 13–15, 1997.
- GARCIA-VAZQUEZ, Z. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, swine and goats in four Mexican states. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 17, p. 127-132, 1993.
- GHALMI, F. et al. Study of the risk factors associated with *Neospora caninum* seroprevalence in Algerian cattle populations. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 655-61, 2012.
- GONDIM, L. F. et al. Maintenance of *Neospora caninum* tachyzoites using Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). **New Zealand Veterinary Journal**, v. 47, p.36, 1999a.
- GONDIM, L. F. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 86, p. 71-75, 1999b.
- GONDIM, L.F.P. et al. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**, v. 101, p. 1-7, 2001.
- GONDIM, L.F.P. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal Parasitology**, v. 34, p. 159-161, 2004b.
- GOODSWEN, S.J.; KENNEDY, P J.; ELLIS, J T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 13, p. 133–150, 2013.

- GORMAN, T. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in sheep and alpacas (*Llama pacos*) in Chile. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 40, p. 143–149, 1999.
- GOTTSTEIN, B. et al. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. **International Journal of Parasitology**, v. 28, p.679-691, 1998.
- HADDAD, J.P.A.; DOHOO, I.R.; VANLEEWEN, J.A. A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle: A Canadian perspective. **Canadian Veterinary Journal**.v.46, p. 230-243, 2005.
- HASEGAWA, M.Y.et al. Ocorrência de anticorpos anti-*neospora caninum* em bovinos de corte e em cães rurais da região de Avaré, estado de São Paulo, Brasil. **Ciências Agrárias**, v. 25, p.45-50, 2004.
- HASHEMI-FESHARKI R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle, sheep and goats in Iran. **Veterinary Parasitology**, v. 61, p. 1-3, 1996.
- HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B.; KAUFMANN, H. Adhesion and invasion of bovine endothelial cell by *Neospora caninum*. **Parasitology**, v.112, p.183-197, 1996.
- IBRAHIM, A.M.E.; ELFAHAL, A.M.; EL HUSSEIN, A.R.M.First report of *Neospora caninum* infection in cattle in Sudan. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, p. 769-772, 2012.
- IMRE, K. et al. Serological survey of *Neospora caninum* infection in cattle herds from Western Romania. **Journal of Parasitology**, v. 98, p. 683–685, 2012.
- INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). **Classificação da cobertura vegetal da Amazônia**. 2010. Disponível em: http://www.inpe.br/cra/projetos_pesquisas/terraclass2010.php. Acesso em: 05 Set. 2019
- JITTAPALAPONG, S. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in dairy cows in Northeastern Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 39, p. 1-5, 2008.
- JONES, J.L.; DUBEY, J.P. Foodborne toxoplasmosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, p.845-51, 2012.
- JUSTO, R.V. et al. Seroepidemiological inquiry on bovine neosporosis in northern Mato Grosso state, Brazil. **Ciências Agrárias**, v. 34, p. 3897-3902, 2013.
- KATZ, Stephen. The Immunology of Parasitic Infections. A Handbook for Physicians, Veterinarians, and Biologists. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 31, n. 3, p.603-603, 1982. Doi: 10.4269/ajtmh.1982.31.3.tm0310030603a
- KIJLSTRA, A.; JONGERT, E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. **International Journal of Parasitology**, v. 38, p. 1359-1370, 2008.
- KING, J.S. et al. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, v. 40, p. 945-950, 2010.

- KLAUCK, V. et al. Relation between *Neospora caninum* and abortion in dairy cows: Risk factors and pathogenesis of disease. **Microbial Pathogenesis**, v. 92, p. 46-49, 2016.
- KLUN, I. et al. Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: seroprevalence and risk factors. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 121–131, 2006.
- LANGONI, H. et al. Inquérito soroepidemiológico para a toxoplasmose em ovinos no Estado de São Paulo, Brasil. **O Biológico**, v. 61, p. 35-39, 1999.
- LLANO, H. A. B. *Neosporose bovina*. 2013. 46f. Seminário (Mestrado em Ciência Animal) – **Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia**.
- LÓPEZ, J.P. et al. *Trypanosoma cruzi* infection in *Didelphis virginiana* in relation to population parameters and variables associated with presence in rural community dwellings in Yucatan, Mexico. **Ecohealth**. v. 10, p. 31–35, 2013.
- MAINARDI, R.S. et al. Soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em rebanhos caprinos no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 759-761, 2003.
- LUCIANO, D.M. et al. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* in cattle and pigs slaughtered, state of Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, p. 351-353, 2011.
- MARQUES, F.A.C. et al. *Neospora caninum*: evaluation of vertical transmission in slaughtered beef cows (*Bos indicus*). **Parasitology Research**, v. 108, p. 1015–1019, 2011.
- MARTINS, N.É.X. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas lactantes do município de Araguaína, estado do Tocantins, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 40, p. 231-238, 2011.
- MATSUO, K. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, horses, pigs, and chickens in Japan. **Parasitology International**, v. 63, n. 4, p. 638-639, 2014.
- MCALLISTER, M.M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, v. 28, p. 1473-1478, 1998.
- MCALLISTER, M.M. Diagnosis and control of bovine neosporosis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 32, p. 443-463, 2016.
- MINEO, T.W.P. et al. Survey for natural *Neospora caninum* infection in wild and captive birds. **Veterinary Parasitology**, v. 182, p. 352-355, 2011.
- MINERVINO, A.H. et al. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle from Santarem, Pará, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v.84, p.254-256, 2008.
- MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, p.1965-1976, 2004.

- MOURA, A.B. et al. Occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in beef cattle of microregion of Guarapuava, Paraná state, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, p.419-422, 2012.
- MORÉ, G. et al. Diagnosis of *Sarcocystis cruzi*, *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in cattle. **Parasitology Research**, v. 102, p. 671-675, 2008.
- NASCIMENTO, E.E. et al. Anti-*Neospora caninum* antibody detection and vertical transmission rate in pregnant zebu beef cows (*Bos indicus*): *Neospora caninum* in pregnant beef cows (*Bos indicus*). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 37, p.267-270, 2014.
- NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisons) du gondi. **Comptes rendus de l'Académie des Sciences**, v. 147, p. 736, 1908.
- OLIVA, A.R.; OLIVA, M.R.; GALAN, O.N. Infección por *Toxoplasma gondii* en um adolescente. **MEDISAN**, v. 20, p. 73-76, 2016.
- OLIVEIRA, J. P. **Distribuição espacial de anticorpos IgG para *Toxoplasma gondii* em um estudo soropidemiológico realizado em bovídeos no estado do Pará**. 2015. 112 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.
- ORTEGA-MORA, L. M. B. et al. Protozoal abortion in farm ruminants. Guidelines for diagnosis and control. **CAB International**, Oxfordshire, United Kingdom, 2007.
- OSHIRO, L.M. et al. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, p. 133-138, 2007.
- PARISH, S. M. et al. Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 191, p. 1599-1600, 1987.
- PAZ, G.F.; LEITE, R.C.; ROCHA, M.A. Associação entre sorologia para *Neospora caninum* e taxa de prenhez em vacas receptoras de embriões. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p. 1323-1325, 2007.
- PERDONCINI, G. et al. Prevalência de *Toxoplasma gondii* em aves e suínos: um problema para a saúde pública. **UNOESC e Ciência**, v. 1, p. 57-64, 2010.
- PEREIRA, M.F. et al. Fatores de risco associados à infecção por *Toxoplasma gondii* em ovinos e caprinos no estado de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 140-146, 2012.
- QUINN, H.E.; ELLIS, J.T.; SMITH, N.C. *Neospora caninum*: a cause of immune failure of pregnancy. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 391-94, 2002.
- RAGOZO, A.M.A. et al. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from sheep from São Paulo State, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 94, p. 1259–1263, 2008.

- RAMOS, I.A.S. et al. Assessment of transplacental transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle in the Agreste region of Pernambuco. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, 2016.
- REICHEL, M.P. et al. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question. **International Journal of Parasitology**, v. 43, p. 133-142, 2013.
- REGIDOR-CERRILLO, J. et al. *Neospora caninum* infection during early pregnancy in cattle: how the isolate influences infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses. **Veterinary Research**, v. 45, p. 10, 2014.
- REMYINGTON, J.S.; MCLEOD, R.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: REMINGTON e KLEIN, **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant**, WB Saunders, Philadelphia, 4th ed., p. 140-267, 1995.
- RUGGIERO, M.A. et al. A Higher Level Classification of All Living Organisms. **PLoS ONE**, v. 10, 2015.
- SAADATNIA, G.; GOLKAR, M. A review on human toxoplasmosis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 44, p. 805–814, 2012.
- SABIN, A.B.; OLITSKY, P.K.; Toxoplasma and obligate intracellular parasitism. **Science**, v. 2, p. 336-338, 1937.
- SANGER, V. L. et al. Toxoplasmosis. V. Isolation of Toxoplasma from cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 123, n. 917, p. 87-91, 1953.
- SANTOS, T.R. et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle, dogs, and humans from the Jauru microregion, Mato Grosso state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 161, p. 324–326, 2009.
- SAWADOGO, P. et al. Seroprevalence of *T. gondii* in sheep from Marrakech, Morocco. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p. 89–92, 2005.
- SCARPELLI, L. et al. *Toxoplasma gondii* in experimentally infected *Bostaurus* and *Bos indicus* semen and tissues. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 59-64, 2009.
- SCHMIDT, A.C. et al. Seroprevalence, spatial analysis and risk factors of infection with *Neospora caninum* in cattle in Brazil's northern Pantanal wetland. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 27, p. 455-463, 2018.
- SILVA, M.I.S. et al. Fatores de riscos associados à infecção por *Neospora caninum* em matrizes bovinas leiteiras em Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, p. 455-461, 2008.
- SILVA, J.B. et al. Serological survey of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle (*Bos indicus*) and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in ten provinces of Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 52, p.30-35, 2017.

SIMÕES, L. *Toxoplasma gondii* e gestação: características da toxoplasmose, sinais clínicos, diagnóstico e a importância da doença na saúde pública – revisão. **Revista Científica De Medicina Veterinária**, v. XIII, n.25, 2015.

SKJERVE, E. et al. Risk factors for the presence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in Norwegian slaughter lambs. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 35, p. 219–227, 1998.

SMITH, N.C. An immunological hypothesis to explain the enhanced susceptibility to malaria during pregnancy. **Parasitology Today**, v. 12, p. 4 – 6, 1996.

SCHMIDT, A.C et al. Seroprevalence, spatial analysis and risk factors of infection with *Neospora caninum* in cattle in Brazil's northern Pantanal wetland. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, p. 455-463, 2018.

SNAK, A. et al. *Neospora caninum* em propriedades rurais da região Oeste do Paraná, Brasil: prevalência e fatores de risco. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, p.51-59, 2018.

SPLENDRE, D.A. Un nuovo protozoa parassita de conigli incontrato nelle lesion anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. **Revista Sociedade Scientifica**, v. 3, p. 109-112, 1908.

SOCOL, V.T. et al. Occurrence of anti- *Toxoplasma gondii* antibodies in ovine from urban and periurban áreas from Curitiba, Parana state. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 69-70, 2009.

SOUSA, M.E. et al. Seroprevalence and risk factors associated with infection by *Neospora caninum* of dairy cattle in the state of Alagoas, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 1009-1013, 2012.

SUN, W.W. et al. Herd-level prevalence and associated risk factors for *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Chlamydia abortus* and bovine viral diarrhoea virus in commercial dairy and beef cattle in eastern, northern and northeastern China. **Parasitology Research**, v. 114, p. 4211-4218, 2015.

STENLUND, S. et al. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 85, p.227-234, 1999.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1217-1258, 2000.

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

TIWARI, R.K.; BAGHEL, R.P.S.; SINGH, S.K. Inclusion of niger and sesame cake replacing soybean meal in coarse cereals based starter chicken ration. **Indian Journal of Poultry Science**, v. 40, p. 241-244, 2005.

THRUSFIELD, M.V. **Epidemiologia Veterinária**. 2ª ed. São Paulo: Roca, 2004.

THURMOND, M.; HIETALA, S. Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 210, p. 672-674, 1997.

TREES, A.J.; AL-ATIYA, S.A.; BALFOUR, A.H. Diagnosis of ovine toxoplasmosis. **Veterinary Record**, v. 123, p. 554, 1988.

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

WILLIAMS, R.H. et al. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in longitudinal and cross-sectional studies on sheep farms provides evidence of vertical transmission in ovine hosts. **Parasitology**, v. 130, p. 301–307, 2005.

UZÊDA, R.S. et al. Fatores relacionados à presença de anticorpo IgG anti-*Toxoplasma gondii* em caprinos leiteiros do Estado da Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 5, p. 1-8, 2004.

VELARDE, F.I.; MONTENEGRO, Y.V.; CANTO, Y.A. Parasitologia Veterinária: Protozoários. **CASTDEL**, v. 1, p. 174, 2009.

VIANNA, L.C. et al. Incidence and transplacental transmission of *Neospora caninum* in primiparous females from *Bos indicus* slaughtered in Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. **Ciências Agrárias**, v. 29, p.387-392, 2008.


VITOR, R.W.A.; FERREIRA, A.M.; FUX, B. Antibody response in goats experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 81, p. 259-263, 1999.

WATSON, W.A.; BEVERLEY, J.K.A. Epizootics of toxoplasmosis causing ovine abortion. **Veterinary Record**, v. 88, p. 120–124, 1971.

WEISS, L.M.; DUBEY, J.P. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. **International Journal of Parasitology**, v. 39, p. 895-901, 2009.

WONG, S.Y.; REMINGTON, J.S. Biology of *Toxoplasma gondii*. **AIDS**, v. 7, p. 299-316, 1993.

ANEXO A-PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



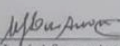
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

CEUA - UFRPE
Aprovado em
18/07/2018
Validade
18/07/2020

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA B-10
Licença condicional para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

A Comissão de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	80/2018
Número do processo	23082.005955/2018-23
Data de emissão da licença	18 de julho de 2018
Título do Projeto	Mapeamento da Prevalência e Incidência da Brucelose, Neosporose e Toxoplasmose em Bovídeos no Estado do Amazonas
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Rinaldo Aparecido Mota
Colaboradores	Paulo Cesar Gonçalves de Azevedo Filho; Pomy de Cássia Peixoto Kim; Renata Pimentel Bandeira de Melo; Muller Ribeiro Andrade
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Bovino; macho 1000; fêmea 1000; total: 2000


Prof. Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
(Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA / UFRPE)

Prof.ª Dr.ª Marleyne Amorim
Presidente CEUA/UFRPE
CEPE 3846/77