UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

EPIDEMIOLOGIA DA NEOSPOROSE BOVINA NO PANTANAL MATO-GROSSENSE

Ana Carolina Schmidt

Cuiabá – MT
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

EPIDEMIOLOGIA DA NEOSPOROSE BOVINA NO PANTANAL MATO-GROSSENSE

Autora: Ana Carolina Schmidt
Orientador: Prof. Dr. Richard de Campos Pacheco
Co-orientadora: Dra. Rísia Lopes Negreiros

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração: Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Mato Grosso para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Cuiabá – MT
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

S347e Schmdt, Ana Carolina.
EPIDEMIOLOGIA DA NEOSPOROSE BOVINA NO PANTANAL MATO-GROSSENSE / Ana Carolina Schmdt. -- 2017
92 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Richard de Campos Pacheco.
Co-orientadora: Rísia Lopes Negreiros.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Cuiabá, 2017.
Inclui bibliografia.

1. Distribuição Espacial. 2. Neospora caninum. 3. Anticorpos. 4. Epidemiologia. 5. Reação de Imunofluorescência Indireta.. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo Nº 23108.112018/2015-45, sobre "Estudo epidemiológico da neosporose no rebanho bovino no estado de Mato Grosso", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. RICHARD DE CAMPOS PACHECO & Col.**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFMT em reunião ordinária de **10/12/2015**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº 23108.112018/2015-45, entitled "Epidemiologic study of neosporosis in herd cattle in the Mato Grosso State", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in the Use of Animals (Federal University of Mato Grosso – UFMT) on **Dec 10, 2015**.

Cuiabá-MT, 11 de dezembro de 2015.

Prof. Dr. Roberto Vilela Veloso
Presidente

Prof. Dr. Daniel Moura de Aguiar
Vice-Presidente

Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT
Cidade Universitária – Av. Fernando Correa da Costa, 2.367
Bairro Boa Esperança – CEP 78060-900 – CUIABÁ-MT, Brasil

Telefone: (65) 3615 8829
Fax.: (65) 3615 8254
E-mail: cepa@ufmt.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUACÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
Avenida Fernando Corrêa da Costa, 2367 - Boa Esperança - Cep: 78060900 -CUIABÁ/MT
Tel : +55 65 3615-8627 - Email : cpgvet@ufmt.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "EPIDEMIOLOGIA DA NEOSPOROSE BOVINA NO PANTANAL MATO-GROSSENSE"

AUTOR : Mestranda Ana Carolina Schmidt

Dissertação defendida e aprovada em 23/02/2017.

Composição da Banca Examinadora:

Presidente Banca / Orientador Doutor Richard de Campos Pacheco
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Examinador Interno Doutora Caroline Argenta Pescador
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Examinador Externo Doutor Marcelo Diniz dos Santos
Instituição : UNIVERSIDADE DE CUIABÁ

Examinador Suplente Doutor Daniel Moura de Aguiar
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

CUIABÁ, 23/02/2017.

DEDICATÓRIA

À minha mãe Maria Helena (saudades eternas) e ao meu pai Paulo Roberto, pelo amor incondicional e exemplo de vida, que me mostrou a direção correta a seguir. A minha irmã Daiane, por todo o amor, paciência e apoio. A minha sobrinha Helena, um anjinho que ilumina meus dias. Agradeço a vocês a motivação incondicional que me impulsiona em direção às vitórias dos meus desafios.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por trazer o sol que me faz acordar feliz todas as manhãs.

À minha família, por me mostrar desde que nasci o amor.

Ao meu namorado Reginaldo, pelo companheirismo, compreensão e apoio.

Ao Professor Richard de Campos Pacheco, pela oportunidade de experimentar a pesquisa, por todos os ensinamentos e confiança ao longo destes dois anos de trabalho.

A amiga Dra. Rísia Lopes Negreiros, que gentilmente aceitou ser minha Co-orientadora.

Ao Professor Daniel Moura de Aguiar, pelo conhecimento compartilhado, por disponibilizar o antígeno para a sorologia e por possibilitar a realização dos testes diagnósticos.

Ao Instituto de Defesa Agropecuária de Mato Grosso, pela licença para a realização da pesquisa, pela disponibilização das amostras de soros bovinos utilizadas na pesquisa e por acreditar na qualificação profissional do seu corpo técnico.

A Universidade Federal de Mato Grosso, instituição de grande valor, que me deu a oportunidade de aprendizado.

Aos colegas dos Laboratórios de Virologia e Rickettsioses e Parasitologia da UFMT, pela convivência agradável e disponibilidade em sempre me ajudar, especialmente a Thábata dos Anjos Pacheco pelos ensinamentos na execução da técnica de diagnóstico.

A todos os meus amigos, especialmente os da Coordenadoria de Defesa Sanitária Animal do Instituto de Defesa Agropecuária de Mato Grosso. Obrigada João Marcelo por “semear” a neosporose na minha mente.

A todos os colegas do mestrado, especialmente a Janice, pelo companheirismo e amizade.

Às equipes do Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso, que realizaram a colheita dos soros bovinos utilizados neste estudo.

EPÍGRAFE

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

RESUMO

EPIDEMIOLOGIA DA NEOSPOROSE BOVINA NO PANTANAL MATO-GROSSENSE

A neosporose é causada por um protozoário intracelular obrigatório, *Neospora caninum*. É considerada uma das mais difundidas e frequentes causas de aborto no gado bovino em todo o mundo. Para avaliação da prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* e dos fatores de risco associados, foram coletados soros de 2.452 bovinos em 262 fazendas da ecorregião do Pantanal, estado de Mato Grosso, Brasil. Foi aplicado um questionário epidemiológico em cada propriedade. Anticorpos anti-*N. caninum* foram detectados pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) utilizando ponto de corte 1:100. Os fatores de risco associados com a probabilidade de o animal ser soropositivo foram analisados por meio da regressão logística. A prevalência nos animais foi de 25,44% (20,10% - 30,78%), e em 76,72% (71,60% - 81,84%) dos rebanhos foi identificado ao menos um animal soropositivo para *N. caninum.* A ocorrência de anticorpos em bovinos foi estatisticamente associada à presença de cães na fazenda, ocorrência de aborto em vacas, venda de gado para reprodução e o risco das fêmeas serem soropositivas teve um acréscimo com a idade. A análise espacial demonstrou que o risco relativo para a doença é constante no espaço e as propriedades com maiores prevalências estão localizadas a sul e a oeste da região estudada.

Palavras-chave: Distribuição Espacial, *Neospora caninum*, Anticorpos, Epidemiologia, Reação de Imunofluorescência Indireta.

ABSTRACT

EPIDEMIOLOGY OF BOVINE NEOSPOROSIS IN MATO-GROSSENSE PANTANAL

Neosporosis is caused by an obligate intracellular protozoan, *Neospora caninum*. It is considered one of the most widespread and frequent causes of abortion in cattle throughout the World. To evaluate the prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies and associated risk factors, serum samples from 2452 bovines were collected from 262 farms from the Pantanal ecoregion, state of Mato Grosso, Brazil. An epidemiological questionnaire was completed at each property, Antibodies of *N. caninum* were detected using the Indirect Immunofluorescent Antibody Test utilizing cut-off dilution of 1:100. The risk factors associated with the probability of the animal being seropositive were analysed using logistical regression. Prevalence in the animals ranged from 25.44 % (20.10 % - 30.78 %), and in 76.72 % (71.60 % - 81.84%) of the herds at least one animal was seropositive for *N. caninum*. The occurrence of antibodies in cattle was statistically associated with the presence of dogs on a farm, the occurrence of abortions in cows, the sale of cattle for breeding and the risk of females being seropositive increased with age. The spatial analysis demonstrated that the relative risk of the disease is constant in space and the properties with the highest prevalences are located to the south and west of the region studied.

Key-words: Spatial Distribution, *Neospora caninum*, Antibodies, Epidemiology, Indirect Immunofluorescent Antibody Test.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Eventos históricos sobre o estudo do *Neospora Caninum*..... 20

Tabela 2: Número total de propriedades, número de propriedades amostradas e número de fêmeas bovinas (≥ 24 meses) amostradas em cada município localizado na ecorregião do Pantanal mato-grossense, para a pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* durante o período de setembro a dezembro de 2014..... 34

Tabela 3: Variáveis qualitativas analisadas nos testes de associações como potenciais fatores de risco para as fêmeas bovinas (≥ 24 meses) positivas para anticorpos anti-*Neospora caninum* na ecorregião do Pantanal do estado de Mato Grosso, 2014..... 38

Tabela 4: Resultados da análise univariada dos possíveis fatores de risco para propriedades positivas para anticorpos anti-*Neospora caninum* na ecorregião do Pantanal do estado de Mato Grosso, 2014..... 41

Tabela 5: Resultados da análise univariada dos possíveis fatores de risco para fêmeas bovinas positivas bovinas (≥24 meses) para anticorpos anti-*Neospora caninum* na ecorregião do Pantanal do estado de Mato Grosso, 2014..... 43

Tabela 6 Distribuição das fêmeas amostras conforme a idade e positividade para pesquisa de anticorpos anti- *Neospora caninum* na ecorregião do Pantanal do estado de Mato Grosso, 2014..... 44

Tabela 7: Resultado do modelo de regressão logística para os fatores de risco associados com a prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em fêmeas bovinas (≥ 24 meses) nas 262 propriedades amostradas na ecorregião do Pantanal mato-grossense..... 45

Tabela 8: Resultado do modelo de regressão logística para os fatores de risco associados com a prevalência individual de anticorpos anti-. *Neospora caninum* em fêmeas bovinas (≥ 24 meses) na ecorregião do Pantanal mato-grossense..... 45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico do *Neospora caninum*..... 24

Figura 2 Modelo de elevação digital Radar *Shuttle* (SRTM) da bacia Hidrográfica do Alto Paraguai..... 31

Figura 3: Mapa do Estado de Mato Grosso com os municípios amostrados na pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em fêmeas bovinas (≥24 meses), na ecorregião do Pantanal, durante o período de setembro a dezembro de 2014..... 32

Figura 4: Distribuição das propriedades rurais amostradas para pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum em* fêmeas bovinas (≥ 24 meses) nos municípios de Cáceres, Poconé, Barão de Melgaço, Nossa Senhora do Livramento e Santo Antônio do Leverger, localizados na ecorregião do Pantanal, durante o período de setembro a dezembro de 2014..... 33

Figura 5: Distribuição das propriedades rurais amostradas, segundo resultado da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), para pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* em fêmeas bovinas (≥ 24 meses) nos municípios do estado de Mato Grosso, localizados na ecorregião do Pantanal, durante o período de setembro a dezembro de 2014..... 40

Figura 6: Mapa dos municípios na ecorregião do Pantanal mato-grossense com as distribuições das propriedades amostradas, segundo histórico de aborto em fêmeas bovinas (≥ 24 meses) nos 12 meses anteriores ao período de setembro de 2014..... 46

Figura 7: Mapa dos municípios na ecorregião do Pantanal mato-grossense com as distribuições das propriedades amostradas, durante o período de setembro a dezembro de 2014, em função da presença de

caninos…..... 46

Figura 8: Mapa dos municípios na ecorregião do Pantanal mato-grossense com as distribuições das propriedades amostradas, durante o período de setembro a dezembro de 2014, em função da venda de bovinos para reprodução..... 47

Figura 9: Mapa dos municípios na ecorregião do Pantanal mato-grossense com a distribuição das propriedades amostradas, durante o período de setembro a dezembro de 2014, as quais possuem todos os fatores associados na regressão logística multivariada..... 48

Figura 10: Estimador Kernel do risco relativo da neosporose bovina nos municípios do estado de Mato Grosso, localizados na ecorregião do Pantanal, durante o período de setembro a dezembro de 2014..... 49

Figura 11: Estimador Kernel da densidade de propriedades negativas na pesquisa a pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em fêmeas bovinas (≥ 24 meses) nos municípios do estado de Mato Grosso, localizados na ecorregião do Pantanal, durante o período de setembro a dezembro de 2014..... 49

Figura 12: Estimador Kernel da densidade de propriedades positivas na pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em fêmeas bovinas (≥ 24 meses) nos municípios do estado de Mato Grosso, localizados na ecorregião do Pantanal, durante o período de setembro a dezembro de 2014..... 50

Figura 13: Função de correlação marcada da distribuição espacial das propriedades positivas e negativas na pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em fêmeas bovinas (≥ 24 meses) nos municípios do estado de Mato Grosso, localizados na ecorregião do Pantanal, durante o período de setembro a dezembro de 2014.....51

Figura 14: Distribuição espacial das prevalências intra-rebanho das propriedades positivas na pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em fêmeas bovinas (≥ 24 meses) nos municípios do estado de Mato

Grosso, localizados na ecorregião do Pantanal, durante o período de setembro a dezembro de 2014..... 51

Figura 15: Estimador Kernel da prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em fêmeas bovinas (≥ 24 meses) nos municípios do estado de Mato Grosso, localizados na ecorregião do Pantanal, durante o período de setembro a dezembro de 2014..... 52

Figura 16 Função de correlação marcada da distribuição espacial das propriedades positivas na pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* e a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em fêmeas bovinas (≥ 24 meses) nos municípios do estado de Mato Grosso, localizados na ecorregião do Pantanal, durante o período de setembro a dezembro de 2014..... 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACRIMAT	Associação dos Criadores de Mato Grosso
INDEA	Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OR	Odds Ratio
PPGVET	Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
UFMT	Universidade Federal de Mato Grosso

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 18
2 REVISÃO DE LITERATURA..... 20
2.1 Histórico..... 20
2.2 Etiologia..... 22
2.3 Ciclo biológico..... 22
2.4 Patogenia e sinais clínicos 25
2.5 Epidemiologia..... 25
2.6 Diagnóstico laboratorial..... 27
2.7 Controle..... 28
3 OBJETIVO..... 30
4 MATERIAL E MÉTODOS..... 31
4.1 Área de estudo..... 31
4.2 Amostragem..... 33
4.3 Coleta de soro e informações epidemiológicas..... 35
4.4 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)..... 36
4.5 Prevalência, análise estatística e análise espacial..... 37
5 RESULTADOS..... 40
6 DISCUSSÃO..... 54
7 CONCLUSÃO..... 58
REFERÊNCIAS..... 59
APÊNDICE A..... 68
APÊNDICE B..... 89
APÊNDICE C..... 90
ANEXO A..... 91

1 INTRODUÇÃO

A neosporose é uma das mais difundidas e frequentes causas de aborto, geralmente no quinto mês de gestação, e natimortalidade em bovinos em todo o mundo (MCALLISTER, 2016), levando a grandes perdas econômicas (DUBEY et al., 2011; REICHEL et al., 2013). É causada por um protozoário intracelular obrigatório, *Neospora caninum*, pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozea, ordem Eucoccidiida e a família Sarcocystidae (DUBEY et al., 2002).

A transmissão aos bovinos pode ocorrer pela ingestão de oocistos esporulados, eliminados no ambiente pelo hospedeiro definitivo, principalmente, o cão doméstico (*Canis familiaris*) (DONAHOE et al., 2015; MCALLISTER, 2016). Além disso, ocorre a manutenção da infecção nos rebanhos por meio da transmissão transplacentária, devido à infecção da fêmea durante a gestação (transmissão exógena), ou por reativação dos bradizoítos existentes no organismo da mãe infectada (transmissão endógena); em ambos os casos os taquizoítos atravessam a barreira placentária durante a gestação (TREES & WILLIAMS, 2005).

O Pantanal é a maior planície inundável em área contínua do mundo. Está localizado no centro da América do Sul, na bacia hidrográfica do Alto Paraguai e compreende áreas do Brasil, Paraguai e Bolívia. No território Brasileiro sua área é de aproximadamente 140.000 km², com 35% de seu território no estado de Mato Grosso, ocupando 7% do território estadual. Possui como atividade predominante, a criação extensiva de bovinos, principalmente, as fases de cria e recria, com 2.085.437 bovinos distribuídos em 7.772 propriedades rurais, representando 7,32% do rebanho bovino do estado, que possui o maior rebanho bovídeo do Brasil, com 28.4879.77 milhões de animais distribuídos em 102.162 mil propriedades rurais (ABREU et al., 2010; MATO GROSSO, 2014).

Estudos realizados em municípios localizados no Pantanal sul-mato-grossense demonstraram a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em populações de bovinos (OSHIRO et al., 2007; MELLO et al., 2008; ANDREOTTI et al., 2010).

A bovinocultura é uma atividade de extrema importância econômica para o Estado, tendo em vista que o faturamento gerado em 2014 pela exportação de carne bovina produzida em Mato Grosso foi de R$ 1,2 bilhões e, que o valor representa

18,71% de toda a exportação da carne bovina brasileira (ACRIMAT, 2015). Em 2015, Mato Grosso produziu 1,17 milhão de toneladas de carne bovina, e foi o segundo maior exportador do Brasil – 298 mil toneladas no total de vendas externas. (ACRIMAT, 2016). No Brasil, as perdas na bovinocultura leiteira associadas à neosporose foram estimadas em 51,3 milhões de dólares americanos por ano (variando 35,8 a 111,3 milhões de dólares). Na indústria de carne bovina brasileira, as perdas associadas à ocorrência do *N. caninum* foram estimadas em 101 milhões de dólares (variando 63,6 a 111,7 milhões), segundo REICHEL et al. (2013).

O objetivo do estudo foi investigar a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em fêmeas bovinas (≥ 24 meses) e identificar os fatores associados que influenciam na prevalência nos bovinos e em rebanhos, assim como, realizar a análise espacial da distribuição da doença na ecorregião do Pantanal mato-grossense, Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

Neospora caninum teve seu primeiro relato no ano de 1984 na Noruega por Bjerkas e colaboradores (1984), que identificaram cistos semelhantes aos de *Toxoplasma gondii* em filhotes de cães da raça Boxer. Estes animais apresentaram alterações neurológicas após o nascimento, sendo que as amostras testadas não reagiram às técnicas de diagnóstico para toxoplasmose. Dubey e colaboradores (1988) realizaram o primeiro diagnóstico da doença em cães, que apresentavam sinais neurológicos, nomeando o agente como *N. caninum*.

Dubey (1999) demonstrou que cães e bovinos se infectam com a mesma espécie de *Neospora*. Após o desenvolvimento de um teste imuno-histoquímico que permitiu analisar amostras armazenadas, foi possível realizar o diagnóstico da infecção em diversas espécies animais (LINDSAY e DUBEY, 1989).

O primeiro isolamento *do N. caninum,* de tecido de fetos bovinos abortados*,* foi realizado por Conrad et al. (1993) e no Brasil, no ano de 1999, isolaram o parasito a partir dos tecidos de fetos bovinos abortados (GONDIM et al., 1999).

Os principais eventos históricos sobre o estudo do *N. caninum* estão sumarizados na tabela 1.

Tabela 1. Eventos históricos sobre o estudo do protozoário *Neospora Caninum.*

Ano	Contribuição	Referência
1984	Protozoário semelhante ao *Toxoplasma gondii* foi apontado como causador de doença neurológica em cães.	BJERKAS et al., 1984
1988	*N. caninum* foi descrito como um novo gênero, causador de doença	DUBEY et al., 1988

	neurológica em cães.	
1988	Desenvolvimento do teste de imunofluorescência indireta para detecção do *N. caninum.*	DUBEY et al., 1988
1992	Demonstrada a infecção congênita do *N. caninum em bovinos.*	DUBEY et al., 1992
1993	Primeiro relato de isolamento de *N. caninum* em fetos bovinos abortados.	CONRAD et al., 1993
1996	*Neospora* sp foi isolado do SNC de um equino adulto com sinais neurológicos.	MARSH et al., 1998
1998	Descrição do *Neospora Hughesi* como novo gênero *Neospora sp*.	MARSH et al., 1998
1998	Cães são de definidos como hospedeiros definitivos de *N. caninum.*	MCALLISTER et al., 1998
1999	Demonstrada a transmissão horizontal do *N. caninum* dos canídeos para os bovinos.	DE MAREZ et al., 1999
1999	Primeiro relato de isolamento de *N. caninum* em fetos bovinos abortados, no Brasil.	GONDIM et al., 1999
2004	Coiotes (*canis latrans*) são considerados hospedeiros definitivos para *N. caninum*.	GONDIM et al., 2004
2010	Dingo Australiano (*Canis lupus dingo*) foi considerado como hospedeiro definitivo do *N. caninum.*	KING et al., 2010
2011	Lobo cinzento (*Canis lupus lupus*) foi descrito como hospedeiro definitivos do *N. caninum.*	DUBEY et al., 2011

2.2 Etiologia

O protozoário *Neospora* pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Eucoccidiida e família Sarcocystidae (DUBEY et al., 1988). No gênero *Neospora* duas espécies são conhecidas, *N. caninum*, isolado de cérebro de cão (DUBEY et al., 1988), e *N*. *hughesi,* isolado do cérebro e medula de um cavalo adulto que apresentava severa incoordenação motora (MARSH et al., 1998; DUBEY et al., 2001).

O cão (*Canis lupus familiaris*) foi o primeiro hospedeiro definitivo identificado para *N. caninum* (MCALLISTER et al., 1998) e, posteriormente, outros membros da família Canidae, como o coiote (*Canis latrans*) (GONDIN et al., 2004), o dingo (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e o lobo cinzento (*Canis lupus lupus*), também foram descritos como hospedeiros definitivos (DUBEY et al., 2011a).

Diversas espécies de animais domésticos e não domésticos podem atuar como hospedeiros intermediários do *N. caninum*, como os bovinos, ovinos, caprinos, equinos, búfalos, ratos (*Rattus norvegicus),* cervídeos (*Ozotoceros bezoarticus, Cervus canadenses, Cervus elaphus);* capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris);* raposas (*Vulpes vulpes*) (ANDERSON et al., 2000; ALMERIA et al., 2002; HUANG et al., 2004; RODRIGUES et al., 2004; YAI et al., 2008; DUBEY e SCHARES, 2011; ALMERIA, 2013; MESQUITA et al., 2013). Sendo os bovinos considerados os mais importantes hospedeiros intermediários para este protozoário (MCALLISTER et al., 1998).

2.3 Ciclo biológico

O *N. caninum* possui três formas de desenvolvimento durante seu ciclo de vida: os taquizoítos, os cistos com bradizoítos e os oocistos. (DUBEY e LINDSAY, 1996; DUBEY et al., 2002). Os taquizoítos são considerados os organismos

proliferativos, pois se multiplicam rapidamente por endodiogenia causando morte celular e disseminação da infecção. Sem uma resposta imunológica efetiva do hospedeiro, os taquizoítos podem continuar a se multiplicar, causando progressivamente destruição celular e levando o animal à morte. Com o início de uma resposta imune do hospedeiro, os taquizoítos diferenciam-se em bradizoítos e estabelecem um cisto tecidual persistente (BUXTON et al., 2002). Os bradizoítos são considerados os organismos de multiplicação lenta ou de latência, e estão em grande número dentro de cistos teciduais (DUBEY e LINDSAY, 1996).

Resultados sorológicos negativos em bezerros com menos de 180 dias devem ser interpretados com cautela, pois o sistema imune destes animais ainda não é completamente competente (BARTLEY et al., 2004).

A última forma identificada de *N. caninum* foram os oocistos, após serem observados nas fezes de cães que ingeriram cérebros de camundongo com cistos *de N. caninum*. Os oocistos são eliminados nas fezes na forma não esporulada, medindo 10 a 11 µm de diâmetro, são esféricos a subesféricos, contém um esporonte central (MCALLISTER et al., 1998). Cada oocisto contém dois esporocistos, cada qual com quatro esporozoítos. Quando os oocistos são ingeridos por um hospedeiro intermediário, os esporozoítos infectivos são liberados no trato intestinal, penetram nas células e se transformam em taquizoítos, que se dividem rapidamente, lesando as células e disseminando a infecção (LINDSAY et al., 1999).

N. caninum apresenta um ciclo de vida heteróxeno (LINDSAY et al., 1999). A fase assexuada ocorre em uma ampla faixa de hospedeiros intermediários, enquanto a fase sexuada é limitada aos hospedeiros definitivos, conforme demostrado na Figura 1 (GONDIM et al., 2004).

O hospedeiro se infecta por meio da ingestão de oocistos esporulados, que iniciam a multiplicação intracelular na forma de taquizoítos, os quais invadem as células nucleadas e multiplicam-se por endodiogenia dentro de vácuolos parasitóforos, levando a formação de pseudocistos que se rompem liberando taquizoítos que disseminam para diferentes tecidos, como o ocular, sistema nervoso central, músculos esqueléticos e cardíacos, devido a resposta imunológica gerada por células do hospedeiro há a transformação da forma taquizoíto em bradizoíto (DUBEY et al., 2007).

Na transmissão horizontal, os hospedeiros definitivos se infectam ingerindo cistos de *N. caninum* presentes em tecidos dos hospedeiros intermediários. No trato digestório do hospedeiro definitivo há formação de oocistos, que são liberados nas fezes na forma não esporulada. Nos oocistos eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo para o ambiente, sob condições ótimas de pH, temperatura, umidade, a esporulação ocorre entre um e cinco dias, tornando-o infeccioso. Estes podem permanecer viáveis no solo por longos períodos (DUBEY et al., 2007).

Na transmissão vertical os taquizoítos atingem a placenta e podem causar infecção fetal, podendo ser caracterizada por infecção transplacentária endógena, onde o feto pode ser infectado como resultado de reativação da infecção materna pré-natal ou infecção transplacentária exógena, na qual a transmissão fetal ocorre como resultado de infecção materna durante a gestação (WILLIAMS et al., 2009).

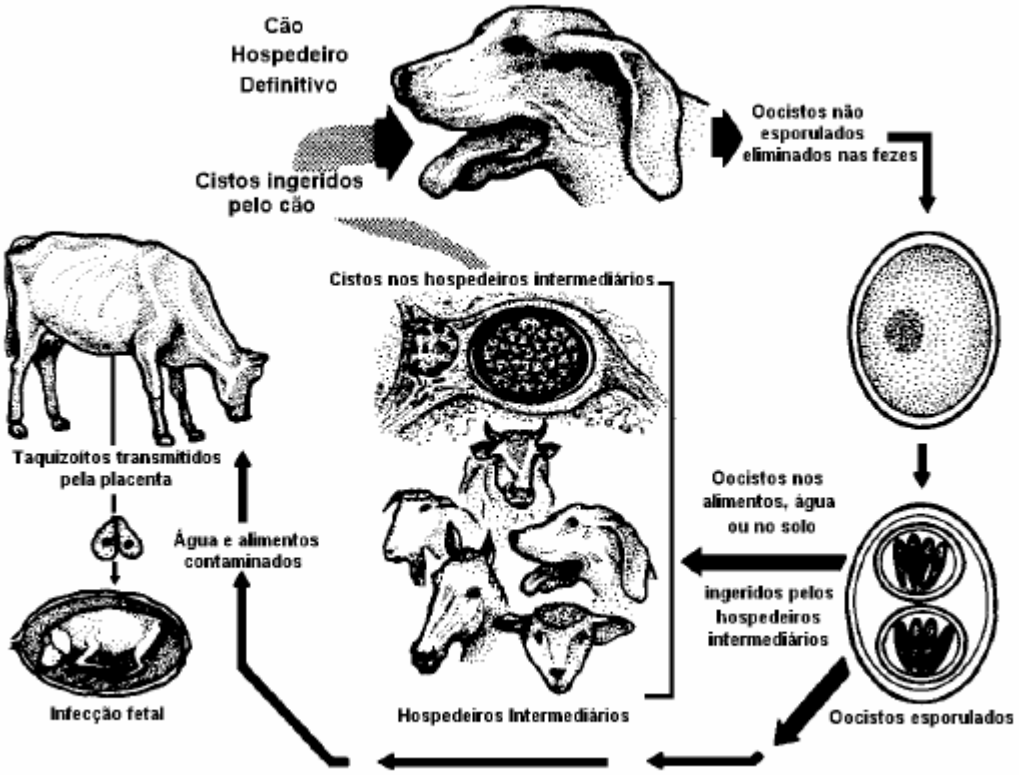


Figura 1. Ciclo biológico da espécie *Neospora caninum*.
Fonte: Dubey (1999)

2.4 Patogenia e sinais clínicos

Nos bovinos, *N. caninum* causa aborto, a partir do terceiro mês até o final da gestação, sendo mais comum entre o quinto e sexto mês de gestação (DUBEY e LINDSAY, 2006).

O protozoário apresenta tropismo para o epitélio coriônico e vasos sanguíneos placentários fetais, provocando vascoleje, inflamação e degeneração do corioalantóide e necrose disseminada nos placentomas (RADOSTITS et al., 2000).

Se a infecção intrauterina ocorre no início da gestação, a morte e reabsorção embrionária podem passar despercebidas, mas se a infecção ocorre mais tardiamente, pode ocorrer o aborto como único sinal clínico da infecção, ou pode ainda haver a mumificação fetal. Nas fêmeas que abortaram não são observados sinais clínicos posteriores e o cio ocorre normalmente. Entretanto, o aborto ou o nascimento de animais infectados, pode repetir em futuras gestações (DUBEY, 1999).

A infecção congênita pode também se manifestar por ataxia, perda de sensibilidade, paralisia e outros déficits nervosos nos bezerros recém-nascidos (RADOSTITS et al., 2000).

2.5 Epidemiologia

A neosporose está amplamente distribuída nos rebanhos bovinos mundiais. Estudos determinaram a soroprevalência de anticorpos anti-*N.caninum* em diversos países, como Brasil, Argentina, Austrália, Canadá, Alemanha, Irlanda, México, Polônia, Nova Zelândia, França, Rússia, Turquia, etc. Ainda que as técnicas diagnósticas utilizadas e os pontos de cortes sejam distintos nos diferentes estudos, impossibilitando assim uma comparação das prevalências no mundo, essas

pesquisas comprovam a distribuição cosmopolita do *N. caninum* (DUBEY et al., 2007).

Este parasito não apresenta predileção por sexo ou idade dos animais. No entanto, pesquisam indicam maiores prevalências de soropositivos para *N. caninum* entre bovinos de leite do que no gado de corte (GUIMARÃES JÚNIOR e ROMANELLI, 2006).

Bovinos com resultado sorológico positivo têm maiores riscos de abortamentos e vacas soropositivas que abortaram têm 5,7 vezes mais risco de ter apresentarem abortos nas próximas prenhes (THURMOND e HIETALA, 1997).

Em estudos realizados na Argentina foi constada maior soroprevalência em rebanhos com histórico de abortamento (VENTURINI et al., 1999).

Estudos sorológicos, utilizando amostras de sangue pré-colostrais, mostram que 81% a 95% dos bezerros nascidos de vacas soropositivas foram infectados, congenitamente, e estavam clinicamente normais (THURMOND e HIETALA, 1997)

Paré et al. (1996), demonstraram que a idade da vaca, número de lactações e histórico de abortamento não afetaram a taxa de infecção congênita.

Não há estudos que demonstram que as placentas e descargas uterinas das vacas soropositivas que abortaram ou que não abortaram podem transmitir *N. caninum* para outros bovinos (DAVISON et al., 2011)

Não foi comprovado que *N. caninum* seja transmitido por transferência de embriões em bovinos (LANDMAN et al., 2002).

Os touros não possuem importância epidemiológica na transmissão do *N. caninum,* devido à baixa carga parasitária encontrada no sêmen (FERRE et al., 2008).

Os cães se infectam após a ingestão de tecidos dos hospedeiros intermediários contendo bradizoítos encistados. O consumo de membranas placentárias pode ser uma fonte de infecção para *N. caninum* (BARR et al., 1994). Em população de cães, a soroprevalência varia de região para região, sendo maior entre os cães rurais quando comparados aos urbanos (SAWADA et al., 1998).

Estudos epidemiológicos em rebanhos bovinos mostraram que a presença de cães é um fator de risco para a infecção por *N. caninum* (DUBEY et al., 2007).
Schares et al. (2003), encontraram maior prevalência de bovinos soropositivos nas fazendas próximas a região de maior concentração humana. Guedes et al. (2008)

mostraram que as propriedades com menos de 100 ha tiveram maiores chances de apresentar vacas soropositivas, do que as fazendas com mais de 100 ha.

Sanderson et al. (2000), encontraram associação significativa entre a soroprevalência para *N. caninum* no rebanho de corte e a densidade de vacas, sendo que as maiores prevalências foram associadas com as maiores densidades de animais confinados no inverno. É mais provável que o uso de suplementos alimentares aumente o risco de transmissão horizontal, pela contaminação fecal de água e alimentos por um hospedeiro definitivo.

2.6 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial baseia-se em testes sorológicos, histopatológico, molecular e isolamento (DUBEY et al.,2007).

Os testes sorológicos são importantes ferramentas para o estudo da epidemiologia da neosporose, pois detectam anticorpos anti-*N. caninum*. Diversos testes podem ser empregados, incluindo a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), teste de aglutinação (NAT) e Immunoblots (DUBEY e SCHARES, 2006; DUBEY et al., 2007). A RIFI foi o primeiro teste sorológico utilizado e é a prova de referência para pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum,* considerada como padrão ouro (DUBEY et al., 1988; BJORKMAN e UGGLA, 1999).

O exame histopatológico é comumente utilizado para o diagnóstico em fetos abortados, sendo que as amostras a serem remetidas são pulmão, cérebro, musculatura esquelética, uma vez que são estes órgãos afetados por frequência de aparecimento (DUBEY, 2003).

A técnica de imuno-histoquímica (IHQ), que utiliza anticorpos anti-*N.caninum* tem sido empregada como um método eficaz para identificação de cistos e taquizoítos em tecidos fetais (LINDSAY e DUBEY, 1989). Esta técnica facilita a visualização de estruturas parasitárias nos tecidos, sendo também, extremamente,

importante nas fases iniciais e ou em lesões discretas (CORBELLINI et al., 2006). A detecção de antígeno de *N. caninum* pela IHQ nas lesões é a melhor evidência para etiologia de abortos (DUBEY e SCHARES, 2006). No entanto, apesar de descrita como uma técnica de alta especificidade, é pouco sensível (VAN MAANEN et al., 2004)

Métodos moleculares são utilizados para detecção e a identificação do parasito ou DNA-parasitário nas amostras teciduais, como cérebro ou placenta (MOORE et al., 2008). A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) é de grande utilidade no diagnóstico de *Neospora*, pois permite amplificar quantidades muito pequenas de DNA, mesmo em tecidos que estejam autolisados, apresentando uma alta sensibilidade e especificidade. O desenvolvimento de técnicas de PCR quantitativas permitiu não só a detecção, mas também a quantificação do DNA do parasito em diferentes tecidos de animais infectados (COLLANTES-FERNANDEZ et al., 2002).

O diagnóstico a partir do cultivo celular ou inoculação em cobaias é utilizado para isolar *N. caninum* de tecidos animais (DUBEY et al.,1988). Entretanto, a taxa de sucesso é muito baixa, pois a maioria dos parasitos morre no tecido fetal quando a infecção está presente (CONRAD et al., 1993).

2.7 Controle

Programas de controle da neosporose são realizados em diversos países. Estes programas incorporam cálculos de custo benefício, comparando as despesas oriundas das medidas de controle com os benefícios de redução de perdas decorrentes da infeção por *N. caninum* ou abortos (DUBEY et al., 2007).

Devido à inexistência de vacina comercial eficaz para o controle do *N. caninum* (REICHEL et al., 2014; MCALLISTER, 2016) e de tratamento, economicamente viável para a neosporose bovina, as estratégias para o controle da infecção por *N. caninum* envolvem o conhecimento do ciclo de vida e da epidemiologia do parasito. Os esforços para o controle da infecção devem ser dirigidos ao estabelecimento de medidas higiênico-sanitárias, a fim de evitar a

propagação do agente e reduzir o nível de infecção (COLLANTES-FERNADEZ, 2003; REICHEL et al., 2014).

Medidas higiênicas devem ser tomadas com o objetivo de prevenir a infecção dos animais soronegativos e reduzir a contaminação ambiental por oocistos nas fezes do hospedeiro definitivo. Para isso, deve-se evitar o acesso dos cães aos alimentos e fontes de água dos bovinos, manter silos e depósitos de ração fechados. Além do controle da população de cães, indica-se o controle de roedores, principalmente nos estábulos (COLLANTES e FERNADÉZ, 2003).

Diversos estudos epidemiológicos mostram claramente que a presença de cães nas propriedades rurais é um fator de risco para a neosporose bovina e, portanto, a remoção de todos os cães pode ser considerada como um método de controle da doença. No entanto, Mcallister (2016) não recomenda a retirada de todos os cães, sendo possível reduzir o risco de transmissão horizontal do *N. caninum* para o rebanho bovino sem a remoção de todos os animais. Ainda, descreve que alguns cães protegerão ativamente seu território impedindo a entrada de outros canídeos domésticos e selvagens, reduzindo o risco da transmissão (MCALLISTER, 2016).

Restos de placentas, fetos abortados carcaças de bovinos de qualquer idade, devem ser removidos das pastagens, evitando o acesso dos canídeos (REICHEL et al., 2014). Os cães devem ser alimentados com rações ou, quando ingerirem carne ou vísceras, estas sempre devem ser cozidas. Outra medida efetiva é o controle da população de cães errantes na propriedade (ANDREOTTI, 2001).

Como *N. caninum* é, eficientemente, transmitido verticalmente entre os bovinos, algumas vezes por diversas gerações, o abate das vacas soropositivas e a introdução de animais soronegativos, é um método efetivo para controlar a perpetuação da infecção no rebanho e diminuir o risco de aborto (THURMON e HIETALA, 1998; CAMPERO et al., 2003; REICHEL et al., 2014).

Bovinos de alto valor zootécnico podem ser utilizados como doadores de óvulos na transferência de embriões para receptoras negativas (BJÖRKMAN e UGGLA, 1999; CAMPERO et al., 2003).

3 OBJETIVO

Realizar o estudo epidemiológico da neosporose bovina por meio da prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* e caracterizar os fatores de risco em fêmeas bovinas (≥ 24 meses) e em propriedades rurais da ecorregião do Pantanal mato-grossense, além da análise espacial da distribuição dos animais soro reagentes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de Estudo

A Bacia do Pantanal está localizada na zona subtropical do Hemisfério Sul (~15-21 S Latitude, ~ 55-58 W longitude); no centro da América do Sul e é composta por áreas alagáveis e por um Platô (planalto), onde estão localizadas as maiores altitudes, conforme demonstrado na figura 2.

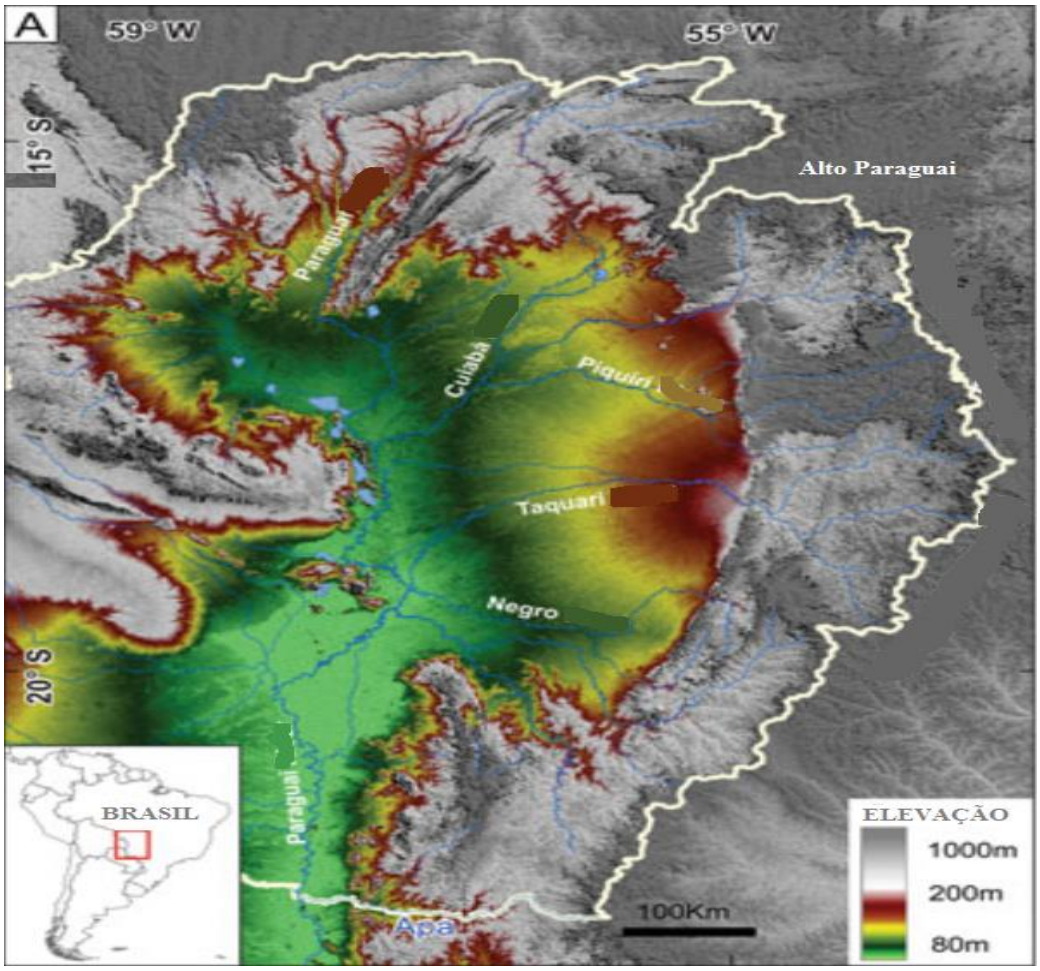


Figura 2. Modelo de elevação digital Radar *Shuttle* (SRTM) da bacia Hidrográfica do Alto Paraguai.
Fonte: BERGIER e ASSINE, 2016

No território mato-Grossense, a ecorregião do Pantanal, está localizada a ~ 16° - 18° S de Latitude e ~ 55°-58° O de longitude. Apresenta formações savânicas associadas com as florestais monodominantes ou as com grande diversidade de espécies. Esta ecorregião tem, caracteristicamente, um pulso de inundação, com níveis de enchente, cheia, vazante e seca, apresentando na estação chuvosa grandes extensões de planície recobertas pela água, enquanto os capões e cordilheiras, unidades de paisagem mais altas, localizadas ao norte da ecorregião do permanecem secos (MATO GROSSO, 2011).

Foram selecionadas para o estudo, propriedades rurais dos municípios de Cáceres, Poconé, Barão do Melgaço, Santo Antônio do Leverger e Nossa Senhora do Livramento que estão localizados em sua maior extensão na ecorregião do Pantanal mato-grossense (Figura 3).

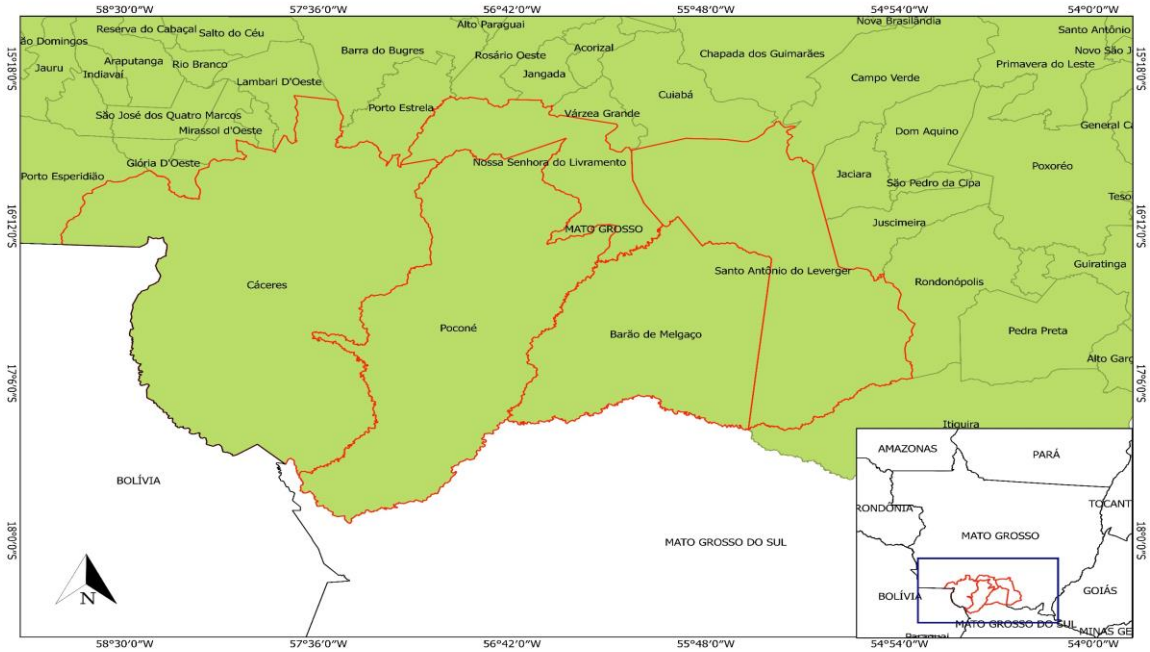


Figura 3. Mapa do Estado de Mato Grosso com os municípios amostrados na pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em fêmeas bovinas (≥24 meses), na ecorregião do Pantanal, durante o período de setembro a dezembro de 2014.

4.2 Amostragem

A amostragem foi realizada em dois estágios: no primeiro, sorteados de forma aleatória um número pré-estabelecido de propriedades (figura 4), com atividade reprodutiva (unidades primárias de amostragem) para estimar focos da presença de anticorpos anti-*N. caninum* e, no segundo, sorteados dentro de cada propriedade um número pré-estabelecido de fêmeas bovinas (≥24 meses), considerado as unidades secundárias de amostragem.

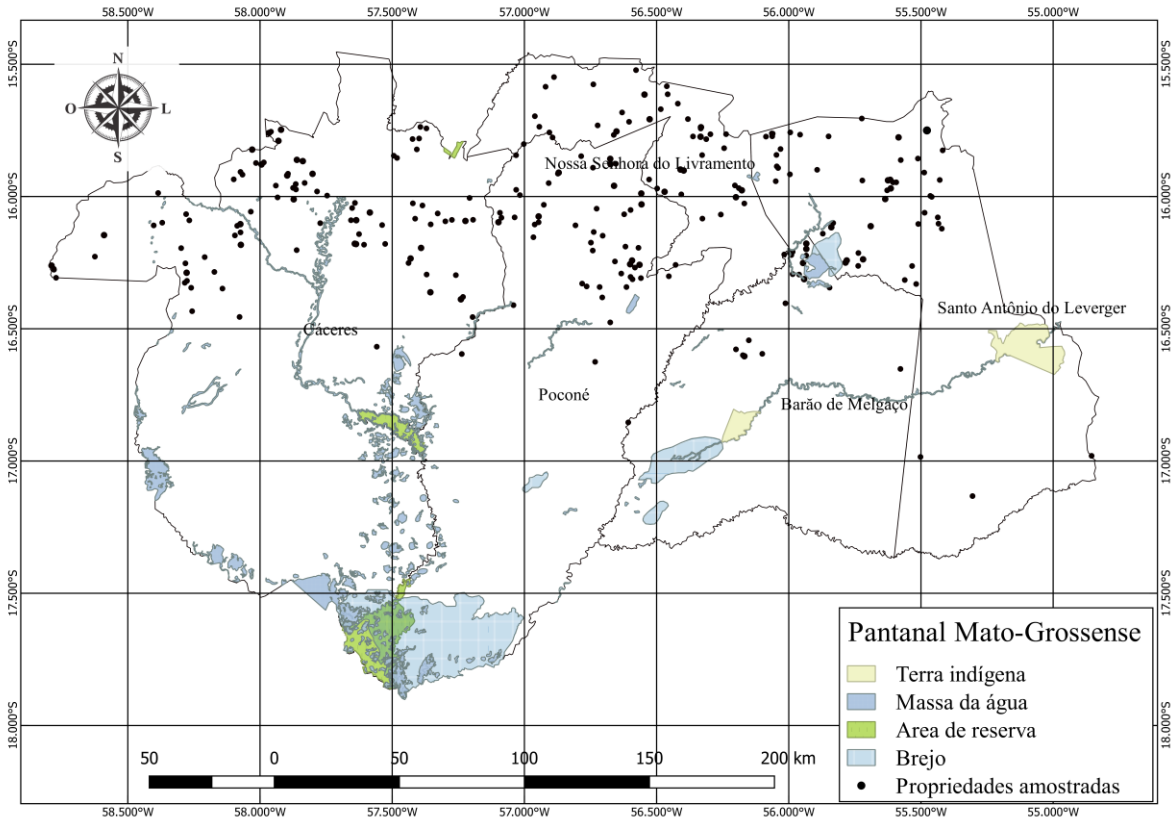


Figura 4. Distribuição das propriedades rurais amostradas para pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum em* fêmeas bovinas (≥ 24 meses) nos municípios de Cáceres, Poconé, Barão de Melgaço, Nossa Senhora do Livramento e Santo Antônio do Leverger, localizados na ecorregião do Pantanal, durante o período de setembro a dezembro de 2014.

Verifica-se que 95% das propriedades amostradas estão localizadas a ~ 15.5° - 16° S de Latitude e ~ 55° - 58° O de longitude. A concentração de propriedades na região norte, deve-se ao fato das sedes das propriedades rurais estarem localizadas nas regiões com maiores altitudes, que não são alagadas no período chuvoso.

As propriedades localizadas na ecorregião do Pantanal mato-grossense, podem ser caracterizadas como grandes propriedades, possuindo vastas extensões de pastagem natural ou artificial. No período da seca, o rebanho bovino ocupa regiões alagáveis, e com o início da enchente são manejados para as regiões com maiores altitudes. As coordenadas geográficas foram aferidas nas sedes das propriedades rurais. No total, foram amostradas 262 propriedades, conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2. Número total de propriedades, número de propriedades amostradas e número de fêmeas bovinas (≥ 24 meses) amostradas em cada município localizado na ecorregião do Pantanal mato-grossense, para a pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* durante o período de setembro a dezembro de 2014.

Município	Total de propriedades	Total de propriedades amostradas	Número de fêmeas amostradas (≥ 24 meses)
Barão de Melgaço	583	21	203
Cáceres	2848	94	1003
Nossa Senhora do Livramento	1215	43	352
Poconé	1530	52	423
Santo Antônio do Leverger	1602	52	471
Total (Pantanal)	7778	262	2452

O planejamento amostral para as unidades secundárias visou estimar um número mínimo de animais a serem examinados dentro de cada propriedade, de forma a permitir a sua classificação como foco ou não foco da ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* nos animais. Para tanto, foi utilizado o conceito de sensibilidade e especificidade agregadas (DOHOO et al., 2003). Nesse processo foi

utilizado o programa *Herdacc* versão 3 para escolha de tamanho de amostra que permitisse valores de sensibilidade e especificidade de rebanho iguais ou superiores a 90%. Considerando a unidade secundária da amostra o tamanho da amostra foi pré-estabelecido conforme o número de fêmeas bovinas (≥ 24 meses) na propriedade. Para propriedades com até 99 fêmeas e propriedades com 100 ou mais fêmeas, foram amostradas aleatoriamente 10 e 15 animais, respectivamente. Nas propriedades com menos de 10 fêmeas (≥ 24 meses), todas foram amostradas. As fêmeas no período de peri-parto, ou seja, aproximadamente 15 dias antes e após o parto foram excluídas da seleção.

4.3 Coleta de soro e informações epidemiológicas

As 2.452 amostras de soro analisadas foram disponibilizadas pelo Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso (INDEA/MT), provenientes de um estudo prévio intitulado: “Estudo de prevalência da brucelose em bovinos no estado de Mato Grosso”, realizado no período de setembro a dezembro de 2014 (BARDDAL et al., 2016). Quinze equipes de servidores do INDEA/MT, compostos de médicos veterinários e auxiliares técnicos realizaram a colheita das amostras, entrevista com o proprietário, preparo, identificação e armazenamento do material, e envio ao Laboratório de Saúde Animal do INDEA/MT – LASA/MT. As equipes foram orientadas quanto à cronologia dentária para identificar e coletar material apenas de fêmeas com 24 meses ou mais e registrar a idade das fêmeas amostradas.

Amostras de sangue de todos os animais selecionados foram colhidas por punção da veia jugular, com agulha descartável estéril em tubo a vácuo previamente identificado. O sangue foi centrifugado no local a 300g por 10 minutos para obtenção do soro que foi identificado e armazenado em duplicata, em microtubos de 1,5 ml a -20º C até o momento das análises.

Na visita a propriedade, para a colheita de sangue, foi solicitado ao proprietário ou responsável que respondesse a um questionário epidemiológico (anexo A) visando à obtenção de informações para identificar possíveis fatores de

risco associados à presença de anticorpos anti-*N*. *caninum*. Variáveis como localização (coordenadas geográficas), medidas adotadas para prevenção e controle da infecção, características individuais de cada animal, bem como os dados sanitários foram abordadas.

4.4 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Amostras de soros fêmeas bovinas (≥24 meses)foram analisadas pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) buscando detectar a presença de anticorpos contra *N. caninum*, conforme descrito por DUBEY et al. (1988). Taquizoítos de *N. caninum* (isolado NC-1) mantidos em cultura de células VERO foram utilizados como antígenos na RIFI, assim como conjugado anti-bovino IgG (Sigma, St Louis, MO, USA) na diluição de 1:1200. A sensibilidade e a especificidade do teste são estimadas em 98% e 99%, segundo Packham et al. (1998).

Os soros dos bovinos foram diluídos a 1:100 em tampão fosfato pH 7,2 (0,0084M Na2HPO4, 0,0018M NaH2PO4 e 0,147M NaCl) acrescentado de soro fetal equino 1%, sendo em seguida distribuídos 10 µl por orifício em lâminas contendo o antígeno específico fixado. Após 30 minutos de incubação em estufa a 37 ºC, as lâminas foram lavadas, em cuba de vidro, com solução tampão fosfato pH 7,2 (0,0084M Na2HPO4, 0,0018M NaH2PO4 e 0,147M NaCl) por duas vezes e por 10 minutos e, em seguida, foram secas em temperatura ambiente por 60 minutos. Nas laminas secas, foi acrescentado em cada poço, a diluição de conjugado IgG de coelho anti-IgG bovino (diluição de 1:1200) marcado com isotiocianato de fluoresceína e Azul de Evans (5 µl). As lâminas foram novamente incubadas por 30 minutos a 37 ºC e lavadas, em ambiente escuro, como descrito anteriormente. Após a secagem à temperatura ambiente, realizou-se a montagem com lamínula utilizando glicerina tamponada pH 8,0. A leitura foi realizada em microscópio epifluorescente, na objetiva de 40 vezes.

As amostras analisadas foram consideradas positivas quando a maioria (>50%) dos taquizoítos fixados apresentaram fluorescência periférica total, na

diluição de 1:100. Reações com fluorescência parcial ou apical foram interpretadas como negativas (BJORKMAN e UGGLA, 1999). Em todas as séries, incluiu-se em cada lâmina soros controles, sabidamente positivo e negativo para *N. caninum*. Todas as amostras positivas foram confirmadas por dois avaliadores e retestadas nas diluições de 1:100, 1:400, 1:1600, 1:6400 e 1:12800.

Em cada série foram incluídos soros testemunhas de títulos positivo e negativo, previamente conhecidos.

4.5 Prevalência, análise estatística e análise espacial

Para calcular o tamanho da amostra de propriedades, considerou-se a expressão algébrica utilizada na estimação de proporções n=[Np(1-p)l(N-1)(d/Za/2)2+p(1-p)].deff., considerando a prevalência absoluta de 50%, erro máximo da estimativa de 6%, IC de 95%, e efeito do desenho (*deff*) de 1,5.

Os valores de prevalências da doença nas propriedades e nos animais foram expressos na forma de intervalo de confiança (THRUSFIELD, 2007). O cálculo da prevalência de animais foi realizado de forma ponderada (DOHOO et al., 2003). A seguinte expressão foi utilizada para o peso de cada animal: (total de fêmeas ≥24 meses na propriedade) / (total de fêmeas ≥24 meses amostradas na propriedade) X (total de fêmeas ≥24 meses na região) / (total de fêmeas ≥24 meses amostradas na região).

Para análise das variáveis qualitativas, as diferenças estatísticas entre proporções foram comparadas usando o teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando os valores esperados nas células da tabela foram inferiores a cinco. As variáveis analisadas encontram-se listadas na tabela 3.

As variáveis que obtiveram valor-p<0,20 no teste de associação foram selecionadas para compor modelo estatístico da regressão logística, no qual foi utilizado o método *stepwise* para escolha do modelo final, em que apenas as variáveis com p<0,05 foram mantidas. As análises estatísticas foram realizadas no programa *R statical package* (R CORE TEAM, 2015).

Tabela 3. Variáveis qualitativas analisadas nos testes de associações como potenciais fatores de risco para as fêmeas bovinas (≥ 24 meses) positivas para anticorpos anti-*Neospora caninum* na ecorregião do Pantanal do estado de Mato Grosso, 2014.

Variáveis
Tipo da exploração (corte, leite ou mista)
Tipo de criação (confinado ou extensivo)
Usa inseminação artificial (sim ou não)
Raça predominante (europeu de leite e corte, zebu ou mestiço)
Presença do cão na propriedade (sim ou não)
Presença de ovinos/caprinos na propriedade (sim ou não)
Presença de equídeos na propriedade (sim ou não)
Espécies silvestres em vida livre na propriedade (sim ou não)
Presença de cervídeos em vida livre na propriedade (sim ou não)
Presença de capivaras em vida livre na propriedade (sim ou não)
Alguma vaca abortou nos últimos doze meses (sim ou não)
O que faz com o feto abortado e a placenta (enterra/queima, alimenta cão/porco ou não faz nada)
Compra fêmeas ou machos com finalidade de reprodução (sim ou não)
Compra de quem (leilão/exposição, comerciante de gado ou outras propriedades)
Vende fêmeas ou machos para reprodução (sim ou não)
A quem (leilão/exposição, comerciante de gado ou outras propriedades)
Realiza abate de bovinos na propriedade (sim ou não)
Qual a frequência (mensal ou semestral)
Local de abate das fêmeas e machos adultos no fim da vida reprodutiva (na própria fazenda, em estabelecimento sem inspeção veterinária, em estabelecimento com inspeção veterinária, não abate)
Aluga pastos em alguma época do ano (sim ou não)
Tem pastos comuns com outras propriedades (sim ou não)
Existem na propriedade áreas alagadiças ás quais o gado tem acesso (sim ou não)
Tem piquete separado para fêmeas no pós-parto (sim ou não)
Tem assistência veterinária (sim e não)
Compartilha aguada/bebedouros com outras propriedades (sim e não)
Propriedade possui área para pouso de boiadas (sim e não)
Número de fêmeas existentes nas propriedades com idade ≥ 24 meses (≤ 78 fêmeas ou ≥ 79 fêmeas)

Para a análise espacial utilizou-se o estimador de intensidade de Kernel com objetivo de analisar o comportamento de padrões de pontos e estimar a intensidade pontual do processo em toda a região de estudo.

A partir do estimador Kernel é possível gerar um mapa de risco com os dados de ponto espacial, dado por: $R(s) = \lambda_1(s) / \lambda_0(s)$; em que: $\lambda_1(s)$ é o estimador de densidade kernel dos positivos; e $\lambda_0(s)$ é o estimador de densidade kernel dos negativos. A suposição básica é que o risco é constante em todo o espaço e é dado por: $R_0(s) = {}^{n}1/{}^{n}0$ em que: ${}^{n}1$ é o total de locais positivos e ${}^{n}0$ é o total de locais negativos.

A significância do teste foi obtida por meio de um teste de Monte Carlo (KELSALL e DIGGLE, 1995). Para verificar a existência de um padrão espacial foi utilizada à função de correlação marcada (OLINDA e SCALON, 2010). As análises foram realizadas por meio do *software* R Core Team (2015), utilizando o pacote *Spatstat* (BADDELEY e TURNER, 2005). Todas as informações geradas pelo trabalho de campo e de laboratório foram inseridas em um banco de dados específico, utilizado nas análises epidemiológicas.

O Comitê de Bioética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Mato Grosso aprovou o presente estudo, sob o protocolo 23108.112018/2015-45.

5 RESULTADOS

Das 262 propriedades analisadas, anticorpos anti-*N. caninum* foram detectados em 201 propriedades, resultando na prevalência de 76,72% (IC 95%; 71,60%; 81,84%), conforme demonstrado na figura 5.

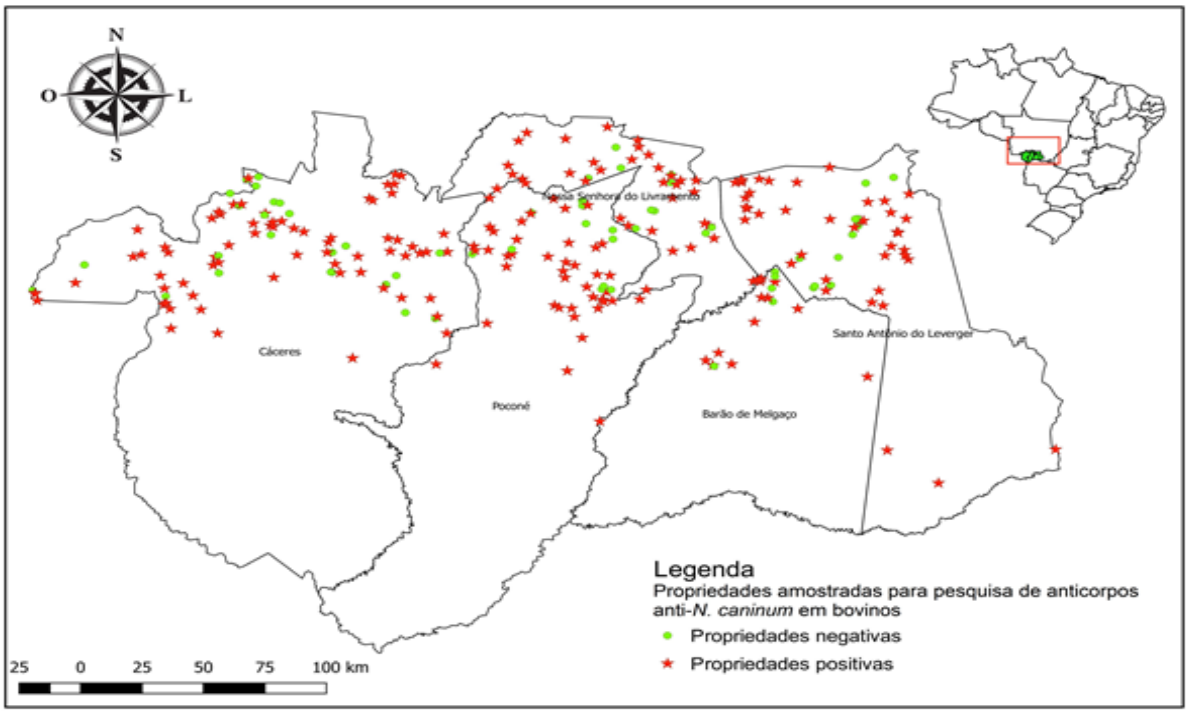


Figura 5. Distribuição das propriedades rurais amostradas, segundo resultado da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), para pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* em fêmeas bovinas (≥ 24 meses) nos municípios do estado de Mato Grosso, localizados na ecorregião do Pantanal, durante o período de setembro a dezembro de 2014

Anticorpos anti-*N. caninum* foram detectados em 563 das 2452 fêmeas bovinas amostradas. A prevalência total dos animais foi de 25,44 % (IC 95%; 20,10%; 30,78%). Títulos de anticorpos variaram entre 100 a 12800 com 168 (29,8%) das amostras apresentando títulos de 100; 210 (37,3%) títulos de 400; 132 (23,4%) títulos de 1600; 35 (6,2%) títulos de 6400; 18 (3,2%) títulos de 12800. A tabela 4 apresenta os resultados da análise univariada para os possíveis fatores de risco

para as propriedades rurais, e a tabela 5 apresenta os resultados da análise univariada para os possíveis fatores de risco para as fêmeas bovinas amostradas.

Tabela 4. Resultados da análise univariada dos possíveis fatores de risco para propriedades positivas para anticorpos anti-*Neospora caninum* na ecorregião do Pantanal do estado de Mato Grosso, 2014.

Variável	Total de propriedades	Número de propriedades positivas a pesquisa de *N. caninum*	Valor de p
Número de fêmeas (≥ 24 meses)			
≤ 78*	65	57	
≥ 79	197	144	0,0247
Tipo de exploração			
Corte	145	115	0,0546
Leite	57	37	
Misto	60	49	
Tipo de criação			
Intensivo	13	10	1
Extensivo	249	191	
Presença de animais silvestres			
Não	103	71	0,024
Sim	159	130	
Presença de cervídeos			
Não	149	112	0,593
Sim	113	89	
Introdução de reprodutores			
Não	137	102	0,446
Sim	125	99	
Compra reprodutores de quem			
Comerciante de gado	18	17	0,126
Outras propriedades	98	74	
Leilão	6	6	
Leilão e outras propriedades	3	2	
Presença de ovinos e caprinos			
Não	228	171	0,137
Sim	34	30	
Compartilhamento de pastagem	214	167	
Não	48	34	0,3797

Sim			
Introdução de bovinos			
Não	193	149	0,885
Sim	69	52	
Presença de piquetes separados			
Não	195	147	0,481
Sim	67	54	
Raça Predominante			
Europeu de leite e de corte	16	13	0,300
Zebu	136	109	
Mestiço	110	79	
Presença de equídeos			
Não	48	30	0,016
Sim	241	171	
Assistência Veterinária			
Não	219	164	0,165
Sim	43	37	
Presença de capivaras			
Não	176	128	0,042
Sim	86	73	
Vende machos ou fêmeas para finalidade de reprodução			0,023
Não	182	132	
Sim	80	69	
Vende reprodutores a quem			
Comerciante de gado	23	19	0,794
Outras propriedades	55	48	
Leilão	1	1	
Leilão e outras propriedades	1	1	
Pouso de boiada			
Não	260	199	1
Sim	2	2	
Presença de cão na propriedade			
Ausente	48	29	0,005
Presente	214	172	
Inseminação artificial			
Não usa	243	184	
Usa a inseminação	19	17	0,259
Compartilha bebedouro			
Não	224	172	1
Sim	38	29	

Histórico de aborto			
Não	185	134	0,039
Sim	38	33	
Não sabe	39	34	
Destino do feto abortado			
Não faz nada	26	22	1
Enterra ou queima	12	11	
Aluguel de pasto			
Não	165	127	1
Sim	97	74	
Abate bovinos na propriedade			
Sim	120	93	0,897
Não	142	108	
Frequência de abate na propriedade			
Semestral	102	76	0,071
Mensal	18	17	
Local de abate de reprodutores			
Estabelecimento com inspeção	60	51	0,107
Estabelecimento sem inspeção	30	26	
Na fazenda	35	26	
Não abate	137	98	
Presença de áreas alagadiças			
Não	154	116	0,625
Sim	108	85	

* 3º quartil

Tabela 5. Resultados da análise univariada dos possíveis fatores de risco para fêmeas bovinas positivas bovinas (≥24 meses) para anticorpos anti-*Neospora caninum* na ecorregião do Pantanal do estado de Mato Grosso, 2014.

Variável	Total de Animais	Número de Fêmeas bovinas (≥24 meses) positivas para pesquisa de *N. caninum*	Valor de p
Presença do canino na propriedade			
Sim	1614	576	
Não	215	48	0,127
Presença de animais silvestres na propriedade			

Sim	1436	509	
Não	393	114	0,392
Presença de áreas alagadiças na propriedade			
Sim	1237	429	
Não	591	195	0,8319

A tabela 6 apresenta a distribuição das fêmeas amostradas conforme a idade e positividade na pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum.*

Tabela 6. Distribuição das fêmeas amostras conforme a idade e positividade para pesquisa de anticorpos anti- *Neospora caninum*, na ecorregião do Pantanal do estado de Mato Grosso, 2014.

Idade em anos	Número de fêmeas amostradas	Número de fêmeas positivas na pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum*
2	44	10
3	320	81
4	395	103
5	561	105
6	229	62
7	229	57
8	213	43
9	104	24
10	179	35
11	28	10
12	84	15
13	16	6
14	22	4
15	19	4
16	6	3
17	3	1

Na análise multivariada, verificou-se ao final do modelo aplicado, três varáveis significativamente associadas com a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em propriedades rurais: presença do cão, histórico de aborto nos últimos doze meses e venda de bovinos para reprodução (Tabela 7); e duas variáveis foram significativamente associadas com a prevalência de anticorpos anti- *N. caninum* nos bovinos: presença do cão e idade do animal (Tabela 8).

Tabela 7. Resultado do modelo de regressão logística para os fatores de risco associados com a prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em fêmeas bovinas (≥ 24 meses) nas 262 propriedades amostradas na ecorregião do Pantanal mato-grossense.

Variáveis associadas	Estimativa	Valor-p	OR	2,5%	97,5%
Presença do cão na propriedade?	0,9565	<0,0001	2,6025	1,7647	3,9084
Alguma vaca/búfala abortou nos últimos 12 meses?	0,5557	0,0196	1,7431	1,1253	2,8946
Vende fêmeas ou machos para reprodução?	0,9832	0,0054	2,673	1,3822	5,598

Tabela 8. Resultado do modelo de regressão logística para os fatores de risco associados com a prevalência individual de anticorpos anti-*Neospora caninum* em fêmeas bovinas (≥ 24 meses) na ecorregião do Pantanal mato-grossense.

Variáveis associadas	Estimativa	Valor-p	OR	2,50%	97,50%
Presença do cão na propriedade.	0,1809	<0,0001	1,1983	1,1357	1,2643
Idade animal (considerando bovinos fêmeas a partir dos 24 meses).	0,0124	0,0146	1,0125	1,0025	1,0226

As figuras, 6, 7, e 8 mostram, respectivamente, a distribuição das propriedades amostradas para pesquisa de anticorpos anti-*N*. *caninum*, segundo histórico de aborto nos últimos doze meses, presença do cão e venda de bovinos para reprodução.

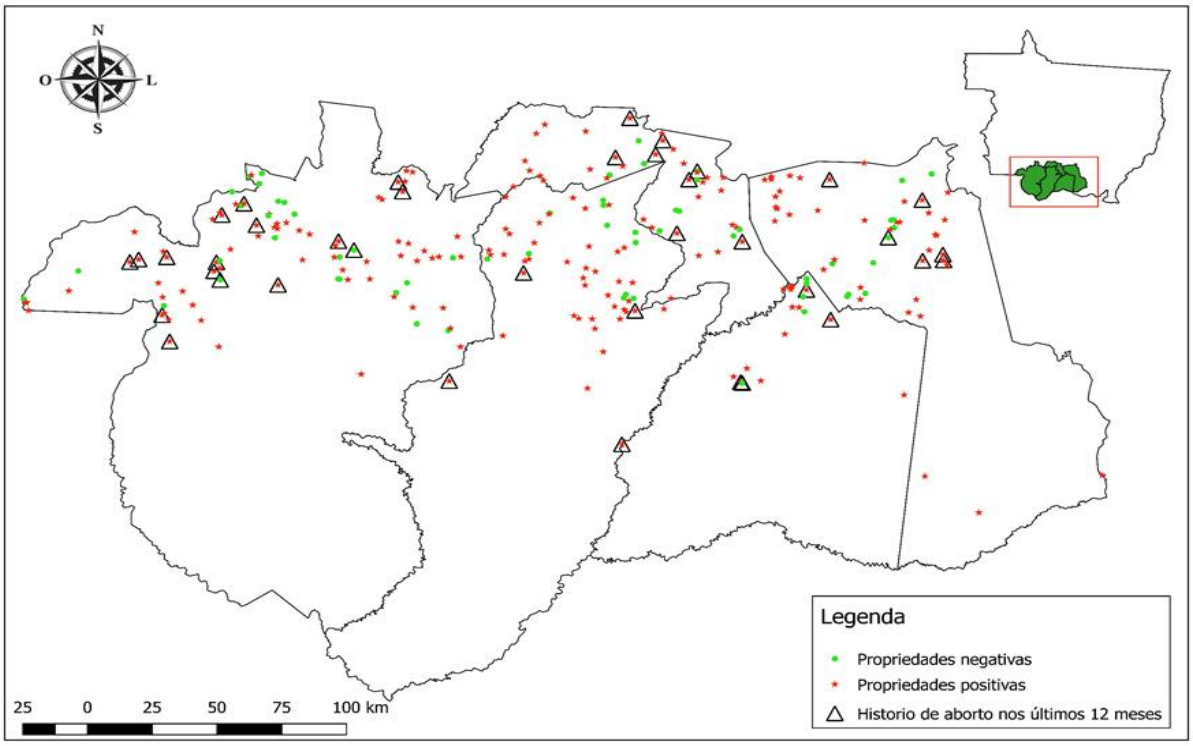


Figura 6. Mapa dos municípios na ecorregião do Pantanal mato-grossense com as distribuições das propriedades amostradas, segundo histórico de aborto em fêmeas bovinas (≥ 24 meses) nos 12 meses anteriores ao período de setembro de 2014.

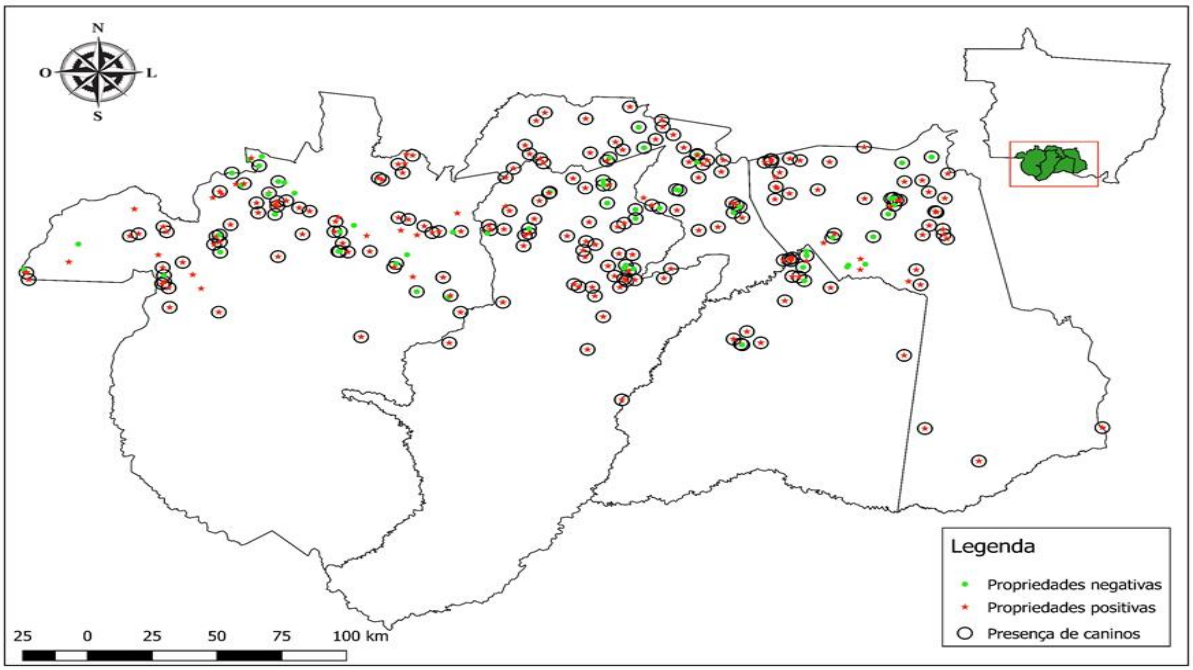


Figura 7. Mapa dos municípios na ecorregião do Pantanal mato-grossense com as distribuições das propriedades amostradas, durante o período de setembro a dezembro de 2014, em função da presença de caninos.

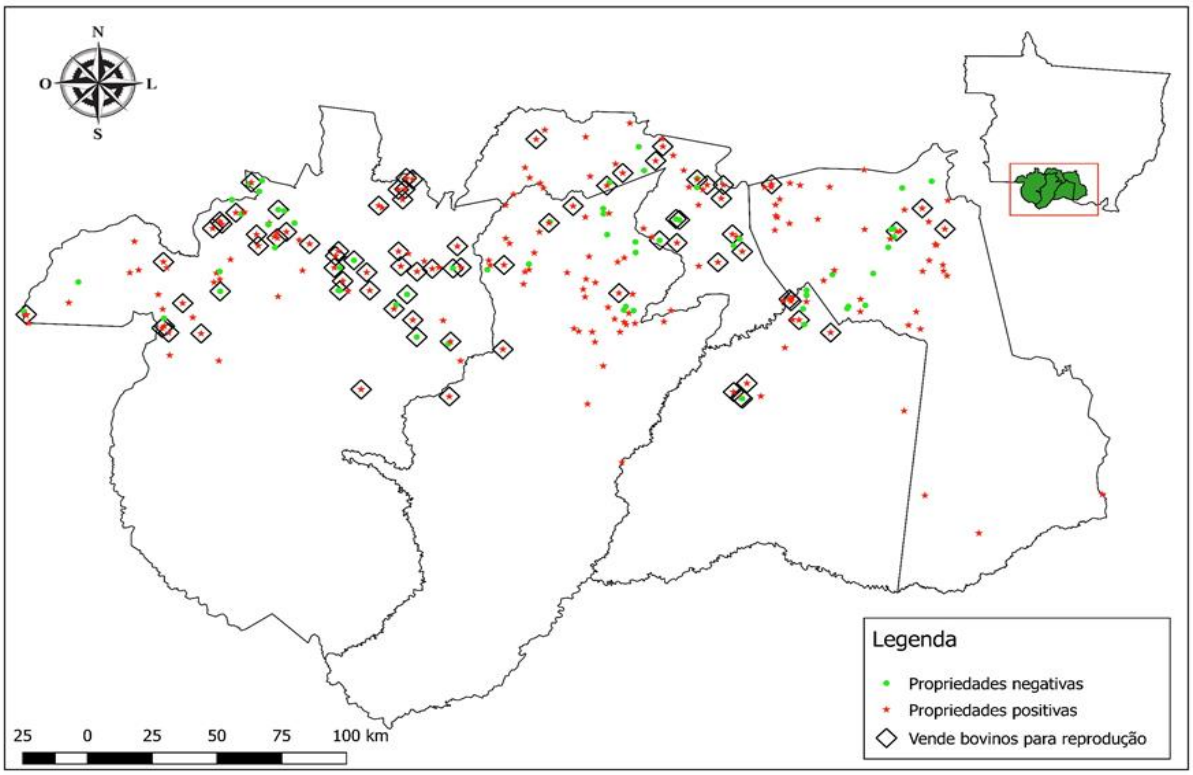


Figura 8. Mapa dos municípios na ecorregião do Pantanal mato-grossense com as distribuições das propriedades amostradas, durante o período de setembro a dezembro de 2014, em função da venda de bovinos para reprodução.

Na figura 9 observamos a distribuição das propriedades amostradas para neosporose bovina, segundo resultado da RIFI, que possuem todos os fatores associados na análise de regressão logística.

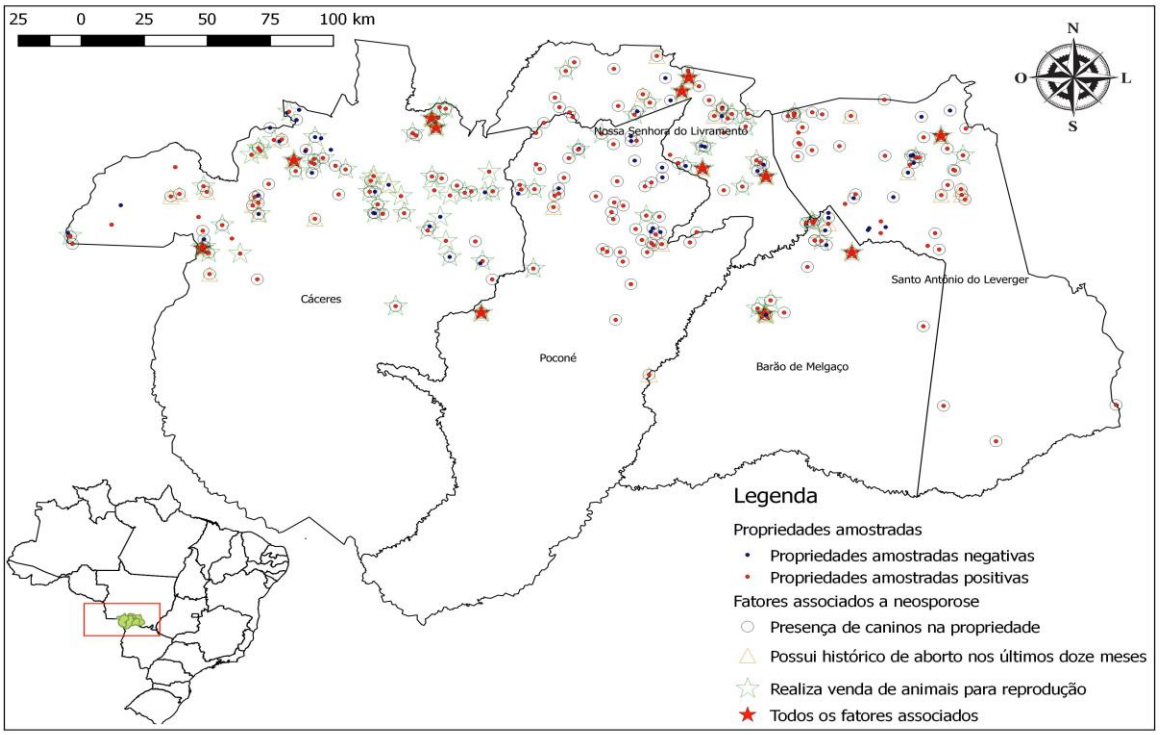


Figura 9. Mapa dos municípios na ecorregião do Pantanal mato-grossense com a distribuição das propriedades amostradas, durante o período de setembro a dezembro de 2014, as quais possuem todos os fatores associados na regressão logística multivariada.

Na análise espacial, observou-se que o risco da presença de anticorpos anti-*N caninum* varia de 3,2 a 3,7 na área estudada, e que a distribuição espacial do risco relativo pode ser considerada constante no espaço (valor p=0,65), conforme figura 10.

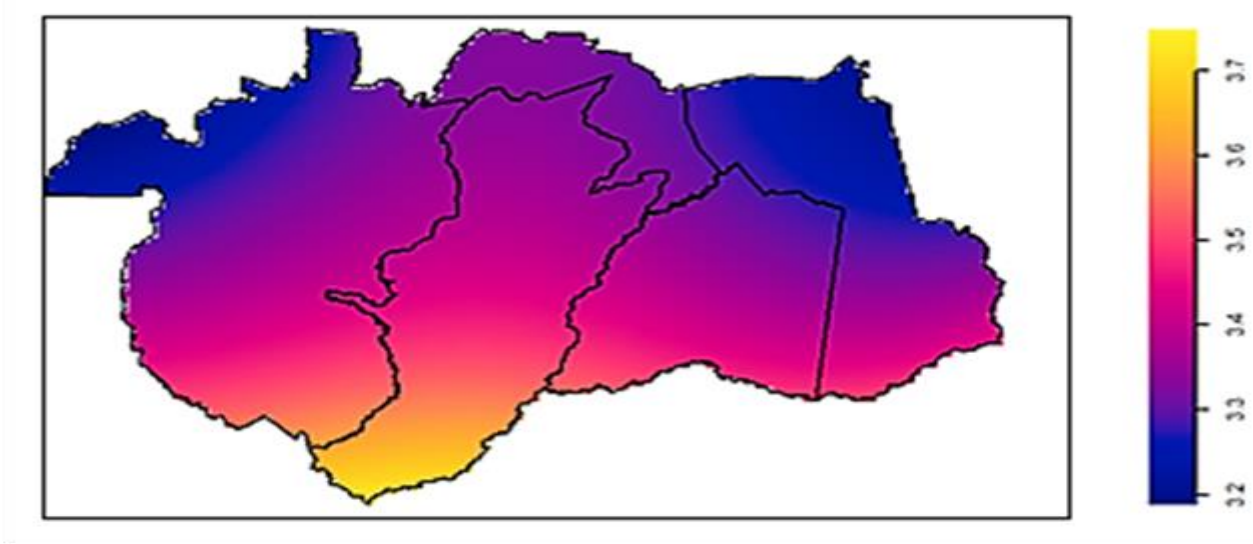


Figura 10. Estimador Kernel do risco relativo da neosporose bovina nos municípios do estado de Mato Grosso, localizados na ecorregião do Pantanal, durante o período de setembro a dezembro de 2014.

Na figura 11 é apresentado a distribuição espacial das propriedades negativas obtida por meio do estimador kernel, em que se verifica uma variação de 4 a 21 propriedade negativas, e que a maior concentração encontra-se ao norte da região estudada.

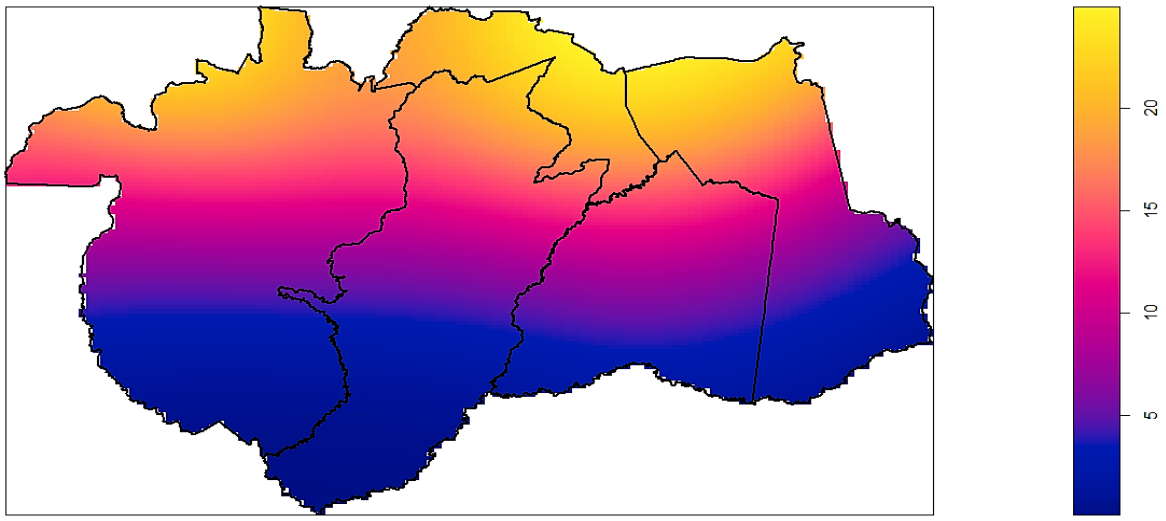


Figura 11. Estimador Kernel da densidade de propriedades negativas na pesquisa a pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em fêmeas bovinas (≥ 24 meses) nos municípios do estado de Mato Grosso, localizados na ecorregião do Pantanal, durante o período de setembro a dezembro de 2014.

Na figura 12 é apresentada a distribuição espacial das propriedades positivas obtida por meio do estimador kernel, onde se observa uma variação de 15 a 50 propriedade positivas, sendo que a maior concentração encontra-se ao norte da região estudada.

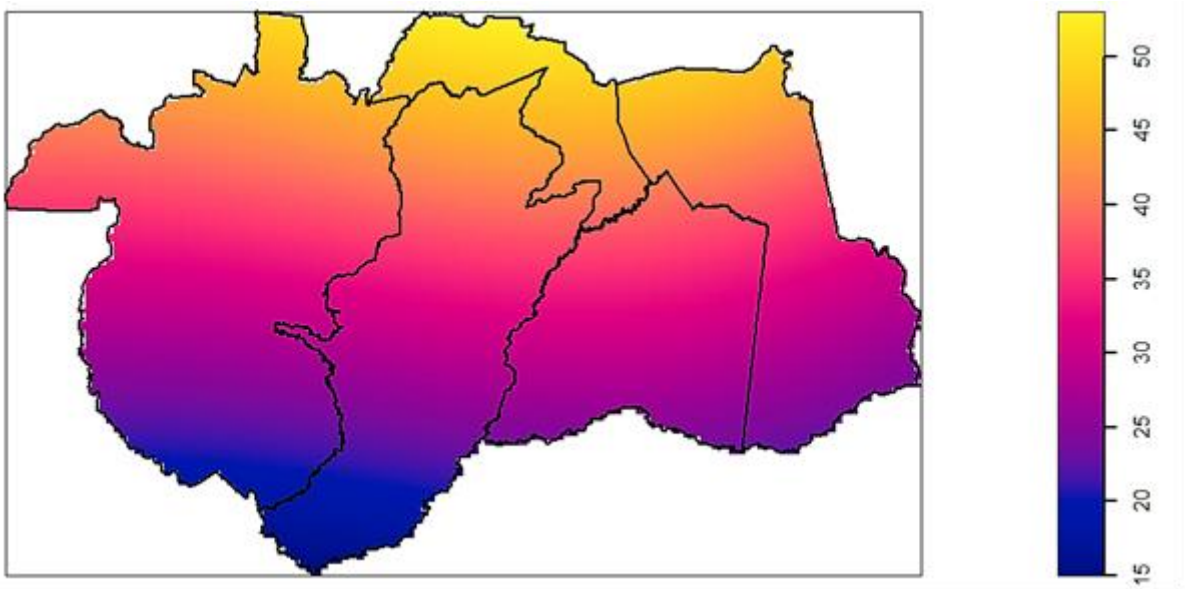


Figura 12. Estimador Kernel da densidade de propriedades positivas na pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em fêmeas bovinas (≥ 24 meses) nos municípios do estado de Mato Grosso, localizados na ecorregião do Pantanal, durante o período de setembro a dezembro de 2014.

A função de correlação marcada da distribuição espacial das propriedades positivas e negativas está apresentada na figura 13. Observa-se que não há relação entre a localização da propriedade e o fato dela ser positiva ou negativa, pois todos os valores obtidos estão dentro do intervalo de confiança, indicando que a ocorrência de propriedades positivas é aleatória no espaço.

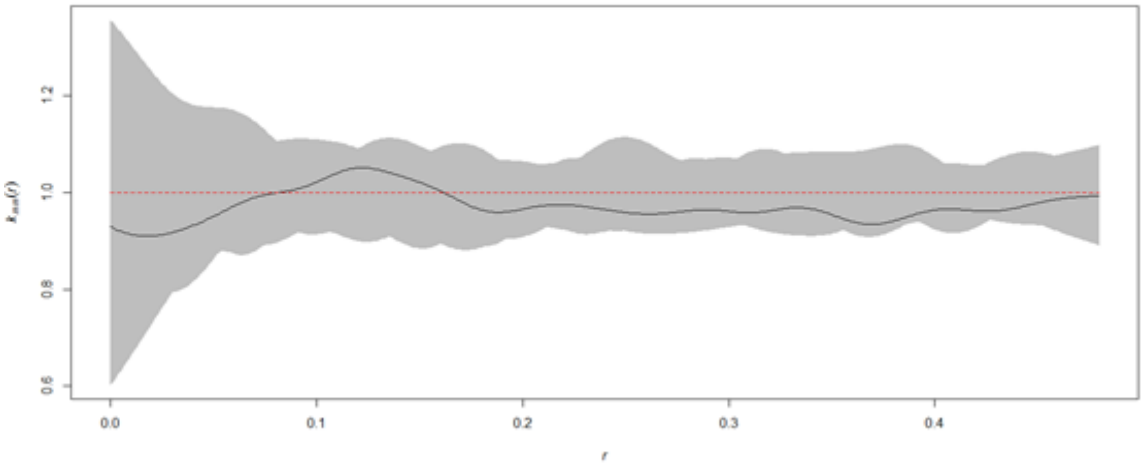


Figura 13. Função de correlação marcada da distribuição espacial das propriedades positivas e negativas na pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em fêmeas bovinas (≥ 24 meses) nos municípios do estado de Mato Grosso, localizados na ecorregião do Pantanal, durante o período de setembro a dezembro de 2014.

Na figura 14 é apresentada a distribuição espacial das prevalências intra-rebanho nas propriedades amostradas, onde observa-se uma variação na prevalência entre 0 a 0.8.

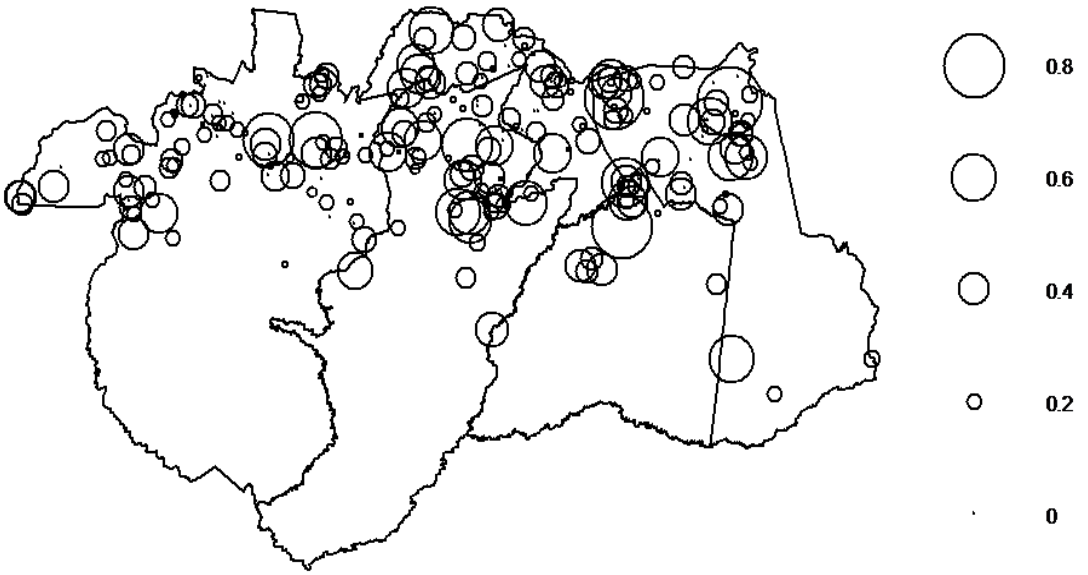


Figura 14. Distribuição espacial das prevalências intra-rebanho das propriedades positivas na pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em fêmeas bovinas (≥ 24 meses) nos municípios do estado de Mato Grosso, localizados na ecorregião do Pantanal, durante o período de setembro a dezembro de 2014.

Na figura 15 a distribuição espacial das prevalências nas propriedades obtida por meio do estimador kernel, onde se verifica uma variação de prevalência 0,10 a 0,35, e que as maiores prevalências estão localizadas a sul e leste na ecorregião do Pantanal.

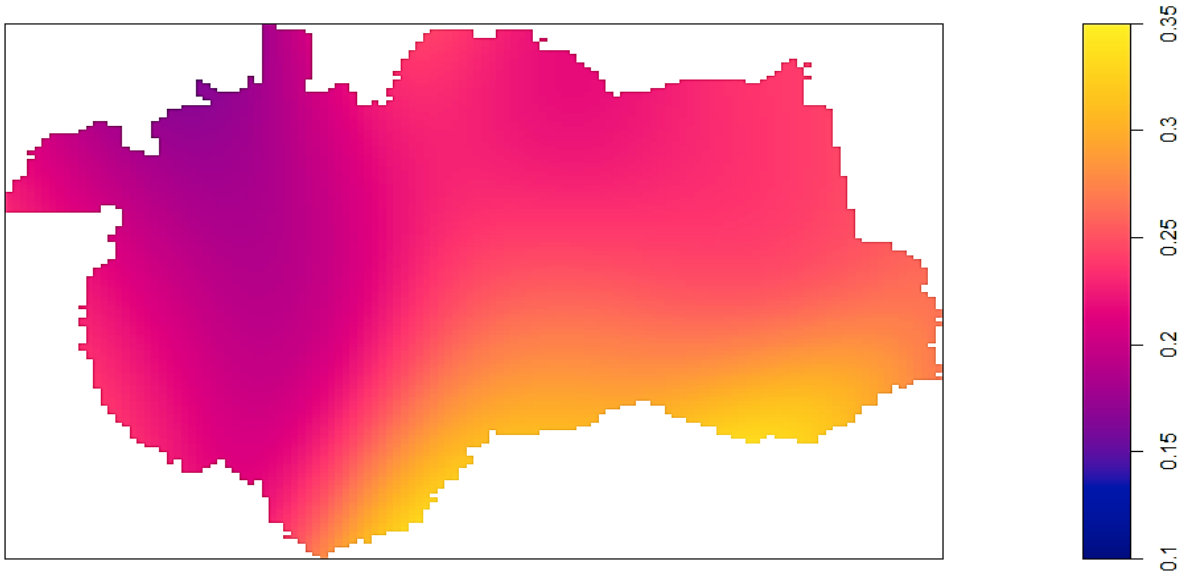


Figura 15. Estimador Kernel da prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em fêmeas bovinas (≥ 24 meses) nos municípios do estado de Mato Grosso, localizados na ecorregião do Pantanal, durante o período de setembro a dezembro de 2014.

Na figura 16 é apresentada a função de correlação marcada da distribuição espacial das propriedades para a prevalência de animais positivos para anticorpos anti-*N. caninum.* Observa-se que há relação entre a localização da propriedade e a prevalência, pois existem pontos fora do intervalo de confiança, sugerindo que a prevalência intra-rebanho está relacionada com a localização da propriedade. Os pontos fora do intervalo de confiança são inferiores a 1, indicando padrões de regularidade onde há um processo de repulsão, ou seja, propriedades com maiores prevalências intra-rebanho foram intercaladas com propriedades com menores valores de prevalência.

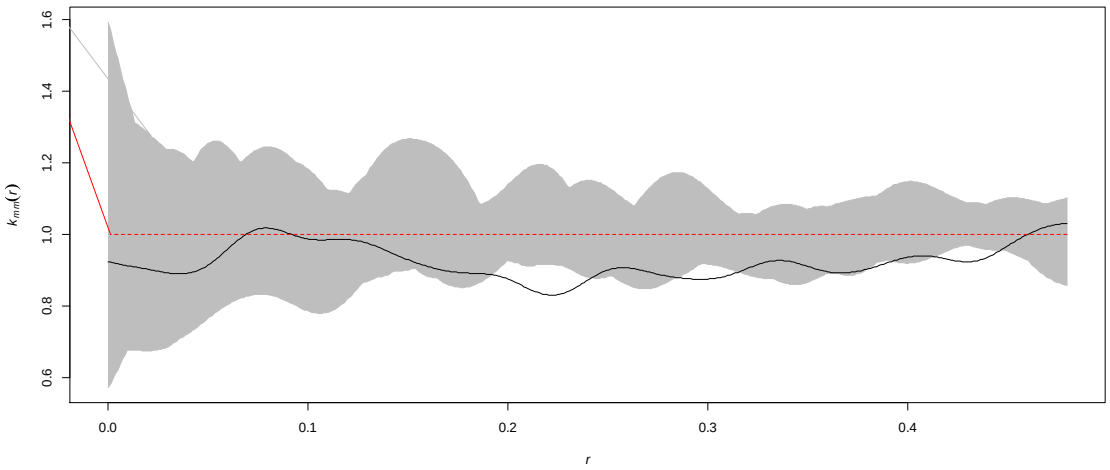


Figura 16. Função de correlação marcada da distribuição espacial das propriedades positivas na pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* e a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em fêmeas bovinas (≥ 24 meses) nos municípios do estado de Mato Grosso, localizados na ecorregião do Pantanal, durante o período de setembro a dezembro de 2014

6 DISCUSSÃO

A constatação de que 76,72% das propriedades amostradas possuem ao menos um animal positivo ao *N. caninum*, e a alta prevalência verificada nos animais (25,44%) demonstram que a neosporose encontra-se amplamente difundida na ecorregião do Pantanal mato-grossense.

No entanto, as comparações entre os estudos de prevalência devem ser realizadas com cautela, devido à adoção de diferentes técnicas sorológicas, pontos de corte, tamanho da amostragem e tipo da população animal (DUBEY et al., 2007). No Brasil, as prevalências da neosporose bovina variam de 6,8% a 89,7% (GENNARI, 2004; AGUIAR et al., 2006; OSHIRO et al., 2007; MINERVINO et al., 2008; CARDOSO et al., 2012; BRUHN et al., 2013). Na região Sudoeste do Estado de Mato Grosso, foi observada a frequência de anticorpos anti-*N. caninum* nos bovinos leiteiros de 53,5%, nas 24 propriedades avaliadas, sendo que, no mínimo, um bovino soropositivo por propriedade (BENETTI et al., 2009). Além disso, a frequência de 37,56% de animais soropositivos para anticorpos anti-*N. caninum* foi observada em cinco propriedades na região Norte do estado de Mato Grosso (JUSTO et al., 2013).

Vacas soropositivas apresentam um maior risco de aborto quando comparadas com as soronegativas, sendo que, o risco aumenta com o aumento dos níveis de anticorpos anti-*N. caninum* individuais (DUBEY et al., 2007), sendo de duas a sete vezes maiores possibilidades de abortarem que as soronegativas (DUBEY et al., 2011), e um aumento de 7,4 vezes nas novilhas congenitamente infectadas (THURMOND e HIETALA, 1997).

Para Mcallister (2016), as fêmeas bovinas podem apresentar altos níveis de anticorpos específicos ao patógeno após abortarem. O autor considera associado ao aborto causado por *N. caninum* títulos de 1.600 e, altamente provável a associação, títulos iguais ou superiores a 6.400. O presente estudo demonstrou que 32% dos soros positivos, possuem titulação igual ou superior a 1.600, portanto no Pantanal o histórico de abortos em bovinos nas propriedades pode estar associado à infecção

pelo *N. caninum*, uma vez que na análise dos fatores associados o histórico de aborto, verificou-se um aumento em 1,7 vezes a chance da propriedade ser positiva.

Verificou-se que a presença de cão na propriedade aumenta em 2,6 à chance da propriedade apresentar pelo menos um animal com anticorpos anti-*N. caninum*, e em 1,19 vezes a chance do bovino ser soropositivo para *N. caninum*. DUBEY et al. (2007) descreveram a presença de cão na propriedade como potencial fator de risco para a neosporose bovina, pois o mesmo é caracterizado como hospedeiro definitivo do *N. caninum* sendo responsabilizado pela introdução da doença em rebanhos bovinos (MCALLISTER et al., 1998; GOODSWEN et al., 2013).

A existência de cães na propriedade aumenta a chance da infecção dos bovinos pelo *N. caninum* (DUBEY et al., 2007; VANLEEUWEN et al., 2010), a qual se deve a ingestão oocistos excretados nas fezes dos cães positivos ao *N. caninum*, que podem estar disseminados no ambiente, alimento ou água (VANLEEUWEN et al., 2010; MCALLISTER, 2016).

Robbe et al. (2016), demostraram que cães criados livremente nas fazendas de gado apresentaram maior soropositividade para *N. caninum*, em comparação a cães mantidos confinados, pois possuem maior chance de ingestão de fetos ou placentas de bovinos infectados pelo *N. caninum*.

O risco de o bovino ser soropositivo aumenta com a idade, sugerindo que a transmissão horizontal do *N. caninum* tem papel importante em alguns rebanhos (DUBEY et al., 2007). Neste estudo, foi verificado que a idade das fêmeas está associada à soropositividade animal. A partir dos 24 meses, a cada ano de vida, há um incremento de 1,0125 vezes de chance de o animal ser soropositivo ao *N. caninum*.

A associação da neosporose com a venda de machos e fêmeas para finalidade de reprodução (chance de 2,67%) pode estar relacionada com o descarte de animais devido a problemas reprodutivos, tendo em vista que o Pantanal possui como atividade predominantemente de criação extensiva de bovinos, principalmente as fases de cria e recria (ABREU et al., 2010). Este dado é relevante para a implantação das medidas de controle da doença na ecorregião, pois em rebanhos onde a neosporose é endêmica, fêmeas soropositivas são frequentemente relacionadas com a manutenção da doença por gerações, uma vez que podem dar origem a bezerros congenitamente infectados (BJORKMAN et al., 1996). A eficiência

da transmissão endógena varia de 41 a 86% (MCALLISTER, 2016). Esta análise é de extrema importância pois constata-se que nesta ecorregião, bovinos infectados que deveriam ser destinados ao abate, podem estar sendo comercializados para finalidade de reprodução, contribuindo para a distribuição e manutenção da neosporose bovina na região.

Neste estudo a análise espacial exploratória indica que a distribuição das propriedades, quanto ao risco relativo da doença é constante no espaço. Não se detectou nenhum conglomerado na região estudada. A chance de a propriedade ter ao menos um animal positivo na pesquisa para anticorpos anti-*N. caninum* independe da sua localização geográfica na área estudada.

Estudos realizados sugerem que há diferença no risco de infecção pelo *N. caninum* entre diferentes regiões geográficas, sistemas de produção e diferentes temperaturas do ambiente (DUBEY et al., 2007; GHALMI et al., 2012), sendo que a prevalência de rebanhos entre regiões é maior em áreas com maiores temperaturas (SCHARES et al., 2003; RINALDI et al., 2005).

No estudo realizado por Boas et al. (2015), na região norte do Brasil, verificou-se que o nascimento de bezerros fracos e a presença de *N. caninum* aparecem em fazendas localizadas próximas umas das outras, indicando a ocorrência de agregação da doença.

O fato das propriedades estarem submetidas ao mesmo risco para *N. caninum* em toda a região estudada, é sugestivo da similaridade no manejo para produção de bovinos nas propriedades, sendo comum o sistema de criação extensiva com predominância cria e, também devido às propriedades estarem localizadas em uma mesma região geográfica, expostas as mesmas condições climáticas.

Entretanto, quando se considera a prevalência de animais nas propriedades, observou-se que as propriedades com maiores prevalências intra-rebanho estão localizadas ao sul e a leste da região estudada, com as propriedades localizadas nesta região apresentando maior proporção de animais positivos na pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum.*

É possível que características individuais das propriedades, localizadas nesta região, influenciam na probabilidade da exposição animal ao *N. caninum*. Dubey et al. (2007) citam como principais fatores de risco associados com o aumento da

soropositividade animal: o aumento da idade, o aumento da densidade de cães na propriedade, a presença de hospedeiros intermediários do *N. caninum*, adoção de práticas suplementares alimentares, o incremento na densidade de bovinos e a prática de reposição de novilhas com animais da própria criação.

No presente estudo a análise multivariada realizada para o risco individual, mostrou ao final do modelo aplicado, que o risco do animal ser positivo ao *N. caninum* é maior nas propriedades que possuem caninos, assim como, para bovinos, a partir dos 24 meses de idade, a cada ano de vida, aumenta a chance de o animal ser soropositivo para *N. caninum.*

Silva et al. (2008) observaram que propriedades com prevalência mais elevada para *N. caninum* tinham animais com estado nutricional classificado como ruim, enquanto que, naquelas em que os animais apresentavam estado nutricional regular, a prevalência era menor.

Os estudos que investigaram possíveis efeitos sobre a distribuição espacial da infecção por *N. caninum* em bovinos mostraram uma correlação positiva significativa com a densidade de cães e com o perfil da vegetação (SCHARES et al., 2003; RINALDI et al., 2005). No entanto, análises adicionais para investigar o efeito de tais covariáveis nas propriedades amostradas, requerem novas fontes de informações.

7 CONCLUSÃO

O estudo descreve pela primeira vez a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos e em propriedades rurais localizados na ecorregião do Pantanal Brasileiro. A neosporose bovina encontra-se amplamente disseminada nesta ecorregião, apresentando associação com histórico de aborto nas propriedades, presença do cão e venda de bovinos para reprodução. A análise espacial demonstrou que o risco relativo da doença é constante na região estudada, assim como as propriedades com maiores prevalências de animais estão localizadas a sul e a leste da região estudada.

8 REFERÊNCIAS

ABREU, U. G. P. et al. Cattle ranching, conservation and transhumance in the Brazilian Pantanal. **Pastoralism**, v. 1, n. 1, p. 99-114, jan. 2010. Disponível em: <http://practicalaction.org/docs/publishing/Cattle_ranching,_conservation_and_transhumance_in_the_Brazilian_Pantanal.pdf> Acesso em: 15 maio 2015.

ACRIMAT. **Informativo Mensal da Associação dos Criadores de Mato Grosso – Acrimat**, ed. 52, ano 7, jan. 2015 disponível em: <http://www.acrimat.org.br/novo/arquivos/informativos/09022015120105.pdf> Acesso em: 14 maio 2015.

ACRIMAT. **Informativo Mensal da Associação dos Criadores de Mato Grosso – Acrimat**, ed. 67, ago. 2016. Disponível em: <http://acrimat.com.br/portal/wpcontent/uploads/2016/09/2016_08_ACRIMATIN%20FORMA_LQ.pdf> Acesso em: 22 nov. 2016.

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. **Vet Parasitol**, v. 142, n. 1-2, p. 71-7, nov. 2006.

ALMERIA, S. et al. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. **Vet Parasitol,** v. 107, n. 4, p. 287-94, ago. 2002.

ALMERIA, S. *Neospora caninum* and Wildlife. **ISRN Parasitol,** v. 2013, p.23, abr. 2013.

ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. **Anim Reprod Sci,** v. 60-61, p. 417-31, jul. 2000.

ANDREOTTI, R. **Neosporose: um possível problema reprodutivo para o rebanho bovino**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 14 p. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream /item/132190/1/DOC104.pdf> Acesso em: 15 out. 2016.

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. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 19, n. 2, p. 119-23, jun. 2010.

BADDELEY, A.; TURNER, R. Spatstat: An R Package for Analyzing Spatial Point Patterns. **J Stat Softw,** n. 12, p. 1-42, jan. 2005.

BARDDAl, J. H. I. et al. Effect of vaccination in lowering the prevalence of bovine brucellosis in the state of Mato Grosso, Brazil. **Semin: Ciênc. Agrár**.n 37, p. 3479-3492, dez 2016.

BARR., B. C. et al. Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection in calves from cows that had previously aborted Neospora-infected fetuses**. J Am Vet Med Assoc**, v.202, p. 207-215, jan. 1994.

BARTLEY, P. M. et al. Maternal and fetal immune responses of cattle inoculated with *Neospora caninum* at mid-gestation. **J Comp Pathol**. v. 130 p. 81-91, jan. 2004.

BENETTI, A. H. et al. Inquiry of antibodies anti-*Neospora caninum* in dairy cattle, dogs and rural workers of the south-west region of Mato Grosso State. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 18, p. 29-33, dez. 2009.

BERGIER, I.; ASSINE, M. L. **Dynamics of the Pantanal Wetland in South America. The Handbook of Environmental Chemistry v. 37.** Cham, Switzerland. Springer International Publishing Switzerland, 2016. 243p.

BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Z Parasitenkd,** v. 70, n. 2, p. 271-4, jan. 1984.

BJORKMAN, C. et al. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. **J Am Vet Med Assoc**, v. 208, n. 9, p. 1441-4, maio 1996.

BJORKMAN, C.; UGGLA, A. serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **Int J Parasitol,** v. 29, n. 10, p. 1497-507, out. 1999.

BOAS, R. V. et al. Infection by *Neospora caninum* in dairy cattle belonging to family farmers in the northern region of Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet,** v. 24, n. 2, p. 204-8, abr. 2015.

BRUHN, F. R. et al. Factors associated with seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in southeastern Brazil. **Trop Anim Health Prod**, v. 45, n. 5, p. 1093-8, jun. 2013.

BUXTON, D.; MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends Parasitol,** v. 18, n. 12, p. 546-52, dez. 2002.

CAMPERO, C. M. et al. Serological status and abortion rate in progeny obtained by natural service or embryo transfer from *Neospora caninum*-seropositive cows. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health,** v. 50, n. 9, p. 458-60, nov. 2003.

CARDOSO, J. M. et al. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on three dairy farms in Brazil. **Vet Parasitol**, v. 187, n. 3-4, p. 553-7, jul. 2012.

CORBELLINI, L. G. et al. Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection: importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil. **Vet J,** v. 172, n. 1, p. 114-20, jul. 2006.

COLLANTES-FERNANDEZ, E. et al. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. **J Clin Microbiol,** v. 40, n. 4, p. 1194-8, abr. 2002.

CONRAD, P.A. et al. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. **J Vet Diagn Invest**, v. 5, p. 572-578, out. 1993.

DAVISON, H. C. et al. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. **Res Vet Sci,** v. 70, n. 2, p. 163-8, abr. 2001.

DE MAREZ, T.; LIDDELL, S.; DUBEY, J.P. et al. Oral inoculation of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses***.*** **Int. J. Parasitol**., v.29, p.1647-1657, jan. 1999.

DOHOO, I. et al. **Veterinary epidemiologic research**. Charlottetown, Canada: Atlantic Veterinary College, 2003. 706p.

DONAHOE, S. L. et al. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **Int J Parasitol Parasites Wildl,** v. 4, n. 2, p. 216-38, ago. 2015.

DUBEY, J. P. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **J Am Vet Med Assoc**, v. 192, n. 9, p. 1269-85, maio 1988.

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

DUBEY, J. P. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. **J Am Vet Med Assoc,** v. 214, n. 8, p. 1160-3, abr. 1999.

DUBEY, J. P. et al. Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. **J Parasitol,** v. 87, n. 2, p. 345-53, abr. 2001

DUBEY, J. P. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **Int J Parasitol**, v. 32, n. 8, p. 929-46, Jul. 2002.

DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Korean J Parasitol,** v. 41, n. 1, p. 1-16, mar. 2003.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants. **Vet Clin North Am Food Anim Pract,** v. 22, n. 3, p. 645-71, nov. 2006.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Vet Parasitol**, v. 140, n. 1-2, p. 1-34, ago. 2006.

DUBEY J. P. et al. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 2, p. 323-67, abr. 2007.

DUBEY, J. P. et al. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. Vet Parasitol, v. 181, n. 2-4, p. 382-7, set. 2011.(a)

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals--the last five years. **Vet Parasitol**, v. 180, n. 1-2, p. 90-108, ago. 2011.

FERRE, I. et al. Effects of re-infection with *Neospora caninum* in bulls on parasite detection in semen and blood and immunological responses. **Theriogenol,** v. 69, n. 7, p. 905-11, abr. 2008.

GENNARI, S. M. *Neospora caninum* no Brasil: situação atual da pesquisa. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 13, n. 1, p. 23-28, jan. 2004.

GHALMI, F. et al. Study of the risk factors associated with *Neospora caninum* seroprevalence in Algerian cattle populations. **Res Vet Sci,** v. 93, n. 2, p. 655-61, out 2012.

GONDIM, L. F. et al. *Neospora caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil. **N Z Vet J,** v. 47, n. 1, p. 35, fev. 1999.

GONDIM, L. F. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol,** v. 34, n. 2, p. 159-61, fev. 2004.

GUEDES, M. H. et al. Frequency of anti-*Neospora caninum* antibodies in cows and fetuses from Municipalities of southern Minas Gerais. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 17, n. 4, p. 189-94, out. 2008.

GUIMARÃES JUNIOR, J. S.; ROMANELLI, R. P. Neosporosis in domestic animals. **Semin: Cien. Agrar.** v.27, n.4, jan. 2006

GOODSWEN, S. J. et al. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. **Infect Genet Evol**, v. 13, p. 133-50, jan. 2013.

HUANG, C. C. et al. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). **Vet Res,** v. 35, n. 3, p. 283-90, jun. 2004.

JUSTO, R. V. et al. Inquérito soro-epidemiológico sobre neosporose bovina no norte do estado de Mato Grosso, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol Vet**, v 18, n 1, p. 29-33, dez. 2013.

KELSALL, J. E.; DIGGLE, P. J., Non-parametric estimation of spatial variation in relative risk. **Stat. Med** n. 14, p. 559–573, nov. 1995.

KING, J. S. et al. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol,** v. 40, n. 8, p. 945-50, Jul. 2010.

LANDMANN, J. K. et al. Confirmation of the prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle by the use of embryo transfer. **Aust Vet J,** v. 80, n. 8, p. 502-3, ago. 2002.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **Am J Vet Res,** v. 50, n. 11, p. 1981-3, nov. 1989.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; DUNCAN, R.B. Confirmation that the dog is a definitive host for *neospora caninum*. **Vet Parasitol,** v.82, p. 327 - 333, set. 1999.

MARSH, A. E. et al. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **J Parasitol**, v. 84, n. 5, p. 983-91, out. 1998.

MATO GROSSO. Secretaria de Estado de Meio Ambiente. Superintendência de Biodiversidade. Coordenadoria de Ecossistemas. **Mapa dos Biomas do Estado de Mato Grosso**. Cuiabá, 2011.

MATO GROSSO. Governo do Estado de Mato Grosso. Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso: **Banco de dados do sistema informatizado de animais**, Cuiabá, 2014.

MCALLISTER, M. M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol**, v. 28, n. 9, p. 1473-8, set. 1998.

MCALLISTER, M. M. Diagnosis and control of bovine neosporosis. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 32, p. 443-463, maio 2016.

MELLO, R. C. et al. Epidemiologic survey of *Neospora caninum* in bovines of rural settlements in Corumba, MS. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 17, p. 311-6, set. 2008.

MESQUITA, L. P. et al. Antibody kinetics in goats and conceptuses naturally infected with *Neospora caninum*. **Vet Parasitol,** v. 196, n. 3-4, p. 327-33, set. 2013.

MINERVINO, A. H. et al. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle from Santarem, Para, Brazil. **Res Vet Sci,** v. 84, n. 2, p. 254-6, abr. 2008.

MOORE, D. P. et al. The role of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in spontaneous bovine abortion in Argentina. **Vet Parasitol,** v. 156, n. 3-4, p. 163-7, out. 2008.

OSHIRO, L. M. et al. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 16, n. 3, p. 133-8, set. 2007.

OLINDA, R. A.; SCALON, J. D. Métodos de Monte Carlo para análise de processos pontuais marcados, **Rev. Bras. Biom,** v. 28, p. 39-56, 2010.

PACKHAM, A. E. et al. A modified agglutination test for *Neospora caninum*: development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. **Clin Diagn Lab Immunol,** v. 5, n. 4, p. 467-73, jul. 1998.

PARE, J.; THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. **Can J Vet Res,** v. 60, n. 2, p. 133-9, Abr. 1996.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Clínica Veterinária - Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. In: **Doenças causadas por protozoários.** 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 1174 - 1179.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing, reference index version 2.14.0**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Dez. 2015. Disponível em: <http://www.R-project.org.>

REICHEL, M. P. et al. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question. **Int J Parasitol**, v. 43, n. 2, p. 133-42, fev. 2013.

REICHEL, M. P. et al. Control options for *Neospora caninum*--is there anything new or are we going backwards? **Parasitol,** v. 141, n. 11, p. 1455-70, Set. 2014.

RINALDI, L. et al. *Neospora caninum* in pastured cattle: determination of climatic, environmental, farm management and individual animal risk factors using remote sensing and geographical information systems. **Vet Parasitol,** v. 128, n. 4, p. 219-30, mar. 2005.

ROBBE, D. et al. *Neospora caninum* seropositivity and reproductive risk factors in dogs. **Exp Parasitol**, v. 164, p. 31-5, maio 2016.

RODRIGUES, A. A. et al. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis)* from Brazil. **Vet Parasitol,** v. 124, n. 3-4, p. 139-50, out. 2004.

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

SAWADA, M. et al. Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. **J Vet Med Sci,** v. 60, n. 7, p. 853-4, Jul. 1998.

SCHARES, G. et al. Regional distribution of bovine *Neospora caninum* infection in the German state of Rhineland-Palatinate modelled by Logistic regression. **Int J Parasitol,** v. 33, n. 14, p. 1631-40, dez. 2003.

SILVA, M. I. S.et al. Fatores de riscos associados à infecção por *Neospora caninum* em matrizes bovinas leiteiras em Pernambuco. **Ciênc. Anim. Bras**, v. 9, p. 455-461, jan. 2008.

THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. 3.ed. Oxford: Blackwell Science, 2007. p. 228-245.

THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. **Am J Vet Res**, v. 58, n. 12, p. 1381-5, dez. 1997.

TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends Parasitol**, v. 21, n. 12, p. 558-61, dez. 2005.

VANLEEUWEN, J. A. et al. Risk factors associated with *Neospora caninum* seropositivity in randomly sampled Canadian dairy cows and herds. **Prev Vet Med,** v. 93, n. 2-3, p. 129-38, fev. 2010.

VAN MAANEN, C. et al. An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. **Vet Parasitol,** v. 126, n. 4, p. 351-64, dez. 2004.

VENTURINI, M. C. et al. *Neospora caninum* infections in bovine foetuses and dairy cows with abortions in Argentina. **Int J Parasitol,** v. 29, n. 10, p. 1705-8, out. 1999.

WILLIAMS, D. J. et al. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* - how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. **Parasitol,** v. 136, n. 14, p. 1895-900, dez. 2009.

YAI, L. E. et al. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from Sao Paulo State, Brazil. **J Parasitol**, v. 94, n. 3, p. 766, jun. 2008.

APÊNDICE A – Artigo Submetido

Seroprevalence, spatial analysis and risk factors of infection with *Neospora caninum* in cattle from the Brazilian Pantanal

Ana Carolina Schmidt[1,2], Thábata dos Anjos Pacheco[1], Janice Elena Ioris Barddal [1,3], Anderson Castro Soares de Oliveira [1], Daniel Moura de Aguiar [1], Rísia Lopes Negreiros[2], Richard de Campos Pacheco[1]*

ABSTRACT

Neosporosis is caused by an obligate intracellular protozoan, *Neospora caninum*. It is considered one of the most widespread and frequent causes of abortion in cattle throughout the World. To evaluate the prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies and associated risk factors, serum samples of 2452 bovines were collected from 262 farms in the Pantanal ecoregion, state of Mato Grosso, Brazil, an epidemiological questionnaire was given to each farmer for epidemiological data analysis. Antibodies of *N. caninum* were detected using the Indirect Immunofluorescent Assay (IFA), using the cut-off dilution of 1:100. Overall prevalence of anti-*N. caninum* antibodies was 25.44% (IC 95%, 20.10%, 30.78%), and prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies per herd was 76.72% (IC 95%, 71.60%, 81.84%). Presence of dogs, occurrence of abortion in cows, sale of cattle for breeding, and the risk of females being seropositive increased with age were statistically associated with seropositive animals. Spatial analysis demonstrated that the relative risk of the disease is

1- Post-Graduate Programme in Veterinary Sciences (PPGVET), Faculty of Veterinary Medicine, (FAVET), Federal University of Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, MT, Brazil. E-mail: richard@ufmt.br *Author for correspondence
2- Mato Grosso State Institute for the Promotion of Cattle-Farming (INDEA-MT), Cuiabá, MT, Brazil.
3- Ministry of Agriculture, Cattle-Farming and Supply (MAPA), Cuiabá, MT, Brazil

constant in space and farms with the highest prevalences of anti-*Neospora caninum* antibodies are located to the south and west of the region studied.

Key-words: Neosporosis, Antibodies, Epidemiology, Indirect Immunofluorescent Assay.

INTRODUCTION

Neosporosis is one of the most widespread and frequent causes of bovine abortion and stillbirths throughout the World (McAllister, 2016), leading to huge economic losses (Dubey and Schares, 2011; Reichel et al., 2013). It is caused by the obligate intracellular protozoan *Neospora caninum*, which belongs to the phylum Apicomplexa, class Sporozoa, order Eucoccidiorida and the family Sarcocystidae (Dubey et al., 2002).

Transmission to bovines occurs through the ingestion of the sporulated oocysts which are eliminated into the environment by the definitive host, principally, the domestic dog (*Canis familiareis*) (Donahoe et al., 2015; Mcallister, 2016). Infection can also occur, and herd infection levels be maintained, through transplacental infection by infected cows during gestation (exogenous transmission), or by reactivation of existing bradyzoites in the body of the infected cow (endogenous transmission); in either case the tachyzoites cross the placental barrier during gestation (Trees and Williams, 2005).

The Pantanal is the biggest continuous floodplain in the World. It is located in Central South America, in the Alto Paraguay hydrographic basin and covers parts of Brazil, Paraguay and Bolivia. In Brazil it covers approximately 140,000 km², with 35% in the state of Mato Grosso, occupying 7% of it. The main economic activity in the Pantanal is grass-fed cattle farming, mainly the stages of breeding and finishing, with 2,085,437 cattle distributed on 7772 farms, representing 7.32% of the state's cattle herd. Mato Grosso possessing the largest

cattle herd in the country, with 28,4879.77 million animals distributed on 102,162 farms (Abreu et al., 2010; Indea, 2014).

Cattle farming is one the most important economic activity for the state. In 2014 Mato Grosso beef exports generated USD$1.2 billion. This value represents 18.71% of all Brazilian beef exports (Acrimat, 2015). In 2015, Mato Grosso produced 1.17 million tons of beef, and was the second biggest exporter in Brazil – 298 thousand tons was the total in external sales (Acrimat, 2016). In Brazil, losses due to dairy farming associated with neosporosis were estimated at USD$51.3 million per annum (varying between 35.8 and 111.3 million dollars). In the Brazilian beef industry, losses due to the occurrence of *N. caninum* have been estimated as 101 million dollars (varying from 63.6 to 111.7 million), according to Reichel et al. (2013).

The objective of this study was to investigate the presence of anti-*N. caninum* antibodies in bovines and identify the associated factors that influence prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in bovines and in herds in the Pantanal of Mato-Grosso State, Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Study Area

Farms in the municipalities of Cáceres, Poconé, Barão de Melgaço, Santo Antonio de Leverger and Nossa Senhora do Livramento, which are mostly located in the Pantanal, were chosen for this study (Figure 1).

Sampling

This was carried out in two stages. In the first, a pre-established number of random farms (primary sampling units) were selected to estimate disease foci and, in the second, a pre-established number of cows ≥24-month-old (secondary sampling units) was selected. Thus 262 farms were sampled (Table 1). Sampling planning for the secondary units sought to

estimate a minimum number of animals to be examined on each farm, so as to allow its classification as a focus or non-focus of bovine neosporosis. Therefore, the concept of aggregated sensitivity and specificity was used (Dohoo et al., 2003). Herdacc Version 3 programme was used to choose the sample size necessary to enable herd sensitivity and specificity values ≥90% to be obtained. Taking into account the secondary sampling unit sample size was pre-established according to the number of cows (≥ 24-months-old) on the farm. For farms with 100 or more cows, 10 and 15 animals, respectively, were randomly sampled. On farms with fewer than ten cows ≥ 24-months-old, all animals were sampled. Thus 2452 serum samples were sampled (Table 1).

Serum collection and epidemiological information

Serum samples were sampled primarily for another study on the epidemiology of brucellosis in bovines in the state of Mato Grosso, during September to December 2014 (Barddal et al., 2016), and thereafter, the stored samples were made available for this study.

During sample collection, an epidemiological questionnaire was given to each farmer for epidemiological data analysis.

Indirect Immunofluorescence Assay

Serum samples were tested by Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) to detect the presence of *N. caninum* antibodies, as described by Dubey et al. (1988). *N. caninum* tachyzoites (isolate NC-1) maintained in VERO cellular cultures were used as antigens, as well as anti-bovine IgG conjugate (Sigma, St Louis, MO, USA) at a dilution of 1:1200. Test sensitivity and specificity is estimated at 98% and 99%, according to Packham et al. (1998).

Serum samples were considered positive when the majority (>50%) of the tachyzoites fixed showed total peripheral fluorescence at the 1:100 dilution. Reactions with partial or apical fluorescence were considered negative (Bjorkman and Uggla, 1999). In each slide, a serum previously shown to be non-reactive (negative control) and a known reactive serum

(positive control) were included. This positive control serum was previously shown to react with *N. caninum* at endpoint titers of 1:12800. All the positive samples were confirmed by two evaluators and retested at dilutions of 1:100, 1:400, 1:6400 and 1:12800.

Prevalence, statistical and spatial analysis

To calculate farm sample size, the algebraic expression n=[Np(1-p)l(N-1)(d/Za/2)2+p(1-p)].*deff*, used in the estimation of proportions, was used, taking 50% as absolute prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies, 6% as an estimate of maximum error, 95% as the confidence interval and 1.5 as experimental design effect.

Values for prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies on the farms and in the animals were expressed in the form of confidence intervals (Thrusfield, 2007), and calculation for prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies of animals was carried out using the pondered form (Dohoo et al., 2003). The following expression was used for the weight of each animal: (total of females ≥-24 months-old on the farm) / (total of females ≥24-months-old sampled on the farm) X (total of females ≥24months-old in the region) / (total of females ≥-24–months-old sampled in the region).

For the analysis of qualitative variables, the statistical differences between proportions were compared using the Chi-Squared Test or Fisher's Exact Test, when the values expected in the table were fewer than five. The variables analysed were: Exploitation type (beef, dairy or dual-purpose); type of rearing (confined or at-pasture); use of artificial insemination (yes or no); predominant breed (European beef or dairy, zebu or hybrid); presence of a dog on the farm (yes or no); presence of sheep or goats on the farm (yes or no); presence of equines on the farm (yes or no); wildlife on the farm (yes or no); presence of free-roaming wild deer on the farm (yes or no); presence of freely-roaming capybaras on the farm (yes or no); has any cow aborted during the last 12 months (yes or no); how was the aborted foetus or placenta disposed of (incinerated/buried, fed to dog or pigs, or nothing); have cows been bought in as

breeders (yes or no); bought in from what source (auction/exhibition, cattle dealer or other farm); have cows or bulls been sold for breeding (yes or no); to whom (auction/exhibition, cattle breeder or another farm); does slaughter occur on the farm (yes or no); how often (monthly or semestrally); location of slaughter of adult males and females at the end of their reproductive life (on the farm itself; at an establishment not subject to veterinary inspection; at an establishment subject to veterinary inspection; no slaughter); are any paddocks rented at any time of year (yes or no); are there any wetland areas to which cattle have access on the farm (yes or no); are there separate paddocks for post-calving females (yes or no); is veterinary assistance sought (yes or no); are feeders or water fountains shared with other farms (yes or no); does the farm have a drovers' rest area (yes or no) and number of cows aged ≥ 24 months on the farm (≤ 78 females or ≥ 79 females) .

The variables that obtained a value $p<0,20$ in the test of association were selected to compose the statistical logistical regression model in which the stepwise method was utilised to choose the final model, in which only the variables with $p <0,05$ were kept. The statistical analyses were carried out using the R statistical programme package (R Core Team, 2015). For the spatial analyses Kernel's intensity estimator was used to analyse the behaviour of patterns of points and estimate the punctual intensity of the process throughout the whole region of the state.

From the Kernel's estimator, it is possible to generate a map of risk with the spatial points data, expressed as: $R(s) = \lambda_1(s) / \lambda_0(s)$; in which: $\lambda_1(s)$ is the Kernel positives density estimator and $\lambda_0(s)$ is the Kernel negatives density estimator. The basic supposition is that risk is spatially constant and is expressed as: $R_0(s) = {}^{n}1/{}^{n}0$; where: ${}^{n}1$ is the total of positive locations and ${}^{n}0$ is the total number of negative locations. The significance of the test was obtained by means of the Monte Carlo test (Kelsall and Diggle, 1995). To verify the existence of a spatial pattern, the marked correlation function was used (Olinda and Scalon, 2010). The

analyses were carried out using R Core Team software (2015), using the Spatstat package (Baddeley and Turner, 2005).

The Federal University of Mato Grosso Committee for Ethics in Animal Research approved the present study under reference number 3108.112018/2015-45.

RESULTS

Prevalence anti-*N. caninum* antibodies in the total population was 25.44% (IC 95%; 20.10%; 30.78%), with titers ranging from 100 and 12800. The frequencies of the endpoint titers were as follows: 168 (29.8%) serum samples showed titers of 100; 210 (37.3%) titers of 400; 132 (23.4%) titers of 1600; 35 (6.3%) titers of 6400; and 18 (3.2%) titres of 12800 for *N. caninum*.

N. caninum antibodies were detected in at least one animal on 201 of the 262 farms analysed, resulting in seroprevalence among herds of 76.72% (IC 95%; 71.60%; 81.84%).

In the multivariate analysis, at the end of the model applied, there were three variables significantly associated with the prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies on the farms: the presence of dog, a history of abortion in the previous 12 months, and the sale of cattle for breeding (table 2); while two variables were significantly associated with bovines positive for *N.caninum* in: the presence of dog and the age of an animal (Table 3).

In the spatial analysis, the risk of presence of anti-*Neospora caninum* antibodies in herds (at least one seropositive animal in the farm) varied from 3.2 to 3.7 in the studied area, and the spatial distribution of relative risk could be considered constant in space (p=0.65), as showed in figure 2.

The marked correlation function for the spatial distribution of positive and negative farms is presented in figure 3, and it was observed no relationship between farm location and

serological result, once all the values obtained are within the confidence interval, indicating that the spatial occurrence of positive farms is random.

Spatial distribution of the prevalences of anti-*Neospora caninum* antibodies in the farms, using the kernel estimator, showed that there was a variation in seroprevalence of 0.10 to 0.35, with the highest intra – herd seroprevalence in the south region (Fig. 4).

A marked correlation for spatial distribution of the farms and their seroprevalence of could be seen. Points that lay outside the confidence interval, suggest that seroprevalence on a farm is related to its location, because values of points are lower than 1, indicating regularity patterns. Besides that, there is a process of repulsion between the seroprevalence, and farms with high values were intercalated with that with low seroprevalence values.

DISCUSSION

Overall, 76.72% of the farms sampled had at least one animal testing positive for *N. caninum* and the high degree of prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies seen in the animals (25.44%) show that neosporosis is widespread in the Pantanal Mato-grossense ecoregion.

Comparisons between other studies of prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies should be made with caution, due to the adoption of different serological techniques, age at slaughter, sample size and animal population type, according to Dubey et al. (2007). In Brazil, prevalences of anti-*Neospora caninum* antibodies for bovine neosporosis varied between 6.8% and 89.7%, (Gennari, 2004; Aguiar et al., 2006; Oshiro et al., 2007; Minervino et al., 2008; Cardoso et al., 2012; Bruhn et al., 2013). In the southwestern region of the state of Mato Grosso, a frequency of 53.5% of anti-*N. caninum* antibodies was seen in dairy cattle on the 24 farms evaluated, with at least one seropositive animal/farm being recorded (Benetti et al., 2009). Moreover, a frequency of 37.56% and 2,45% of animals seropositive for anti-*N.*

caninum antibodies was observed on five farms in the northern region and in Nossa Senhora do Livramento municipality, respectively, in the State of Mato Grosso (Justo et al., 2013; Rodrigues et al., 2016).

Seropositive cows had a higher risk of abortion when compared with seronegative ones, because the risk increases with the increase in individual anti-*N. caninum* antibody levels (Dubey et al., 2007). The possibility of abortion is two to seven times bigger than in seronegative animals (Dubey et al., 2011), and an increase of 7.4 times is observed in congenitally affected heifers (Thurmond and Hietala, 1997).

According to Mcallister (2016), cows can show high levels of antibodies specific to the pathogen after aborting. The author considers associations to abortion caused by *N. caninum* titres of 1,600 and, highly probably associations, titres equal to or higher than 6400. The current study demonstrated that 32% of the positive sera had titres equal or superior to 1600, demonstrating that in the Pantanal the history of abortion in bovines on farms could be associated with infection by *N. caninum*, because, in the analysis of factors associated with the history of abortion, the chance of the animal being seropositive increases by 1.7 times.

It was observed that existence of dogs increases in 1.19 and 2.6 times the chance of detection of anti-*N. caninum* antibodies of bovines and farms, respectively. Dubey et al., (2007) described the presence of a dog on a farm as a potential risk factor for bovine neosporosis, because dogs are the definitive host for *N. caninum*, being responsible for the introduction of the disease in cattle herds (Mcallister et al., 1998; Goodswen et al., 2013). Further, dogs kept running loose on cattle farms showed a higher rate of seropositivity for *N. caninum* when compared with dogs kept confined, because they were more likely to ingest foetuses or placentas from cows infected with *N. caninum* (Robbe et al., 2016).

The risk of a bovine being seropositive increased with age, suggesting that horizontal transmission of *N. caninum* has an important role in some herds (Dubey et al., 2007). Herein, cows` age were associated with seropositivity. After 24 months, and for each subsequent year, there was an increase of 1.01 times the chance of an animal being seropositive for *N. caninum.*

The association of neosporosis with the sale of males and females for breeding (chance of 2.67 times) could be related to the disposal of animals due to reproductive problems, since the main economic activity in the Pantanal is cattle farming at pasture, especially the phases of growing and fattening (Abreu et al., 2010). This information is important for the establishment of control measures of neosporosis in the region, because in herds where disease is endemic, seropositive females are frequently related to the maintenance of the disease for generations, because they can produce congenitally infected calves (Bjorkman et al., 1996). The endogenous transmission rate varies from 41 to 86% (Mcallister, 2016).

In this study the exploratory spatial analysis indicated that the distribution of farms in relation to spatial relative risk of the disease is constant in space. No conglomeration was detected in the studied region, and the occurrence of at least one positive animal for *N. caninum* independent of its geographic location in the studied area. However, Boas et al. (2014), in the northern region of Brazil, observed that birth of weak calves and the presence of *N. caninum* appear on farms located close too near another, indicating the occurrence of aggregation of the disease.

Studies have suggested that there is a difference in the risk of *N. caninum* infection among different geographical regions, production systems and different environmental temperatures (Dubey et al., 2007; Ghalmi et al., 2012), with the prevalence of anti-*Neospora*

caninum antibodies of herds among regions being higher in areas with higher temperatures. (Schares et al., 2003; Rinaldi et al., 2005).

Herein, absence of conglomeration should be associated with the fact that farms are submitted to similar management for cattle production., In addition, farms located in the same geographic area are exposed to the same weather conditions.

However, when considering the prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies of animals on the farms, it was also demonstrated that the farms with the highest prevalences of anti-*Neospora caninum* antibodies were located in the south of the studied region. It could be related to individual characteristics of these farms, which directly influence the number of seropositives bovines. Dubey et al. (2007), described as risk factors associated with the increase in animal seropositivity an increase in the density of dogs on the farm, presence of *N. caninum* intermediate hosts, adoption of supplementary feeding practices, an increase in bovine herd density and the practice of replacing heifers with those bred on the farm. Silva et al. (2008) observed that farms with higher prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies had animals with nutritional status classified as bad, whereas in those in which the animals had regular nutritional status, the seroprevalence was lower.

Few studies have investigated possible effects on the spatial distribution of infection by *N. caninum* in bovines, and have shown a significant positive correlation with the density of dogs, and the vegetation profile (Schares et al., 2003; Rinaldi et al., 2005). Therefore, further analyses are necessary in order to investigate the effect of such covariates in the Pantanal ecoregion.

CONCLUSION

The study showed for the first time the prevalence of anti-*N. caninum* antibodies in bovines and farms located in the Brazilian Pantanal ecoregion. Bovine neosporosis is widely

distributed throughout this region presenting an association with a history of abortion, presence of dogs, and the sale of breeding bovines. Spatial analysis demonstrated that the relative risk of the disease is constant in space, and the farms with the highest prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies are located to the south of the studied region.

ACKNWLEDGEMENTS

To Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso (INDEA/MT) for technical support during the visits to farms, and providing serum samples (INDEA-MT); To Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support; to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the scholarships of D. M. Aguiar, and R.C. Pacheco.

REFERENCES

Abreu, U. G. P., Manus, M. C., Santos, S. A. 2010. Cattle ranching, conservation and transhumance in the Brazilian Pantanal. Pastoralism 1, 99-114. http://practicalaction.org/docs/publishing/Cattle_ranching,_conservation_and_transhumance_in_the_Brazilian_Pantanal.pdf, doi: 10.3362/2041-7136.2010.007

Acrimat, MT. 2015. Informativo Mensal da Associação dos Criadores de Mato Grosso – Acrimat, 52. http://www.acrimat.org.br/novo/arquivos/informativos/ 090220 151201 05.pdf

Acrimat, MT. 2016. Informativo Mensal da Associação dos Criadores de Mato Grosso – Acrimat,67.http://acrimat.com.br/portal/wpcontent/uploads/2016/09/2016_08_ACRIMAT IN FORMA_LQ.pdf

Aguiar, D.M., Cavalcante, G.T., Rodrigues, A.A., Labruna, M.B., Camargo, L.M., Camargo, E.P., Gennari, S.M., 2006. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. Veterinary Parasitology 142, 71-77.

Baddeley, A.; Turner, 2005. R. Spatstat: An R Package for Analyzing Spatial Point Patterns. Journal of Statistical Software 12, 1-42.

Barddal, J. H. I., Quixabeira, J. C., Lopes, I. F., Neto, J. S. F., Ferreira, F., Amaku, M., Dias, R.A., Telles, E., Grisi-Filho, J. H. H., Gonçalves, V. S. P., Aguiar, M. D., 2016. Effect of vaccination in lowering the prevalence of bovine brucellosis in the state of Mato Grosso, Brazil. Semin: Ciênc. Agrár. 37, 3479-3492.

Benetti, A.H., Schein, F.B., dos Santos, T.R., Toniollo, G.H., da Costa, A.J., Mineo, J.R., Lobato, J., de Oliveira Silva, D.A., Gennari, S.M., 2009. Inquiry of antibodies anti-*Neospora caninum* in dairy cattle, dogs and rural workers of the south-west region of Mato Grosso State. Rev Bras Parasitol Vet 18, 29-33.

Bjorkman, C., Johansson, O., Stenlund, S., Holmdahl, O.J., Uggla, A., 1996. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. J Am Vet Med Assoc 208, 1441-1444.

Bjorkman, C., Uggla, A., 1999. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. International journal for parasitology 29, 1497-1507.

Boas, R.V., Pacheco T., A., Melo, A.L., Oliveira, A.C., 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.

Bruhn, F.R., Daher, D.O., Lopes, E., Barbieri, J.M., da Rocha, C.M., Guimarães, A.M., 2013. Factors associated with seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in southeastern Brazil. Trop Anim Health Prod 45, 1093-1098.

Cardoso, J.M., Amaku, M., Araujo, A.J., Gennari, S.M., 2012. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on three dairy farms in Brazil. Veterinary Parasitology 187, 553-557.

Dohoo, I.R., Martin, S.W., Stryhn, H., 2003. Veterinary Epidemiologic Research, Atlantic Veterinary College, Canada.

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.

Dubey, J.P., Carpenter, J.L., Speer, C.A., Topper, M.J., Uggla, A., 1988. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. J Am Vet Med Assoc 192, 1269-1285.

Dubey, J.P., Barr, B.C., Barta, J.R., Bjerkas, I., Bjorkman, C., Blagburn, B.L., Bowman, D.D., Buxton, D., Ellis, J.T., Gottstein, B., Hemphill, A., Hill, D.E., Howe, D.K., Jenkins, M.C., Kobayashi, Y., Koudela, B., Marsh, A.E., Mattsson, J.G., McAllister, M.M., Modry, D., Omata, Y., Sibley, L.D., Speer, C.A., Trees, A.J., Uggla, A., Upton, S.J.,

Williams, D.J., Lindsay, D.S., 2002. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. International journal for parasitology 32, 929-946.

Dubey, J.P., Schares, G., Ortega-Mora, L.M., 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev 20, 323-367.

Dubey, J.P., Schares, G., Ortega-Mora, L.M., 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev 20, 323-367.

Dubey, J.P., Schares, G., 2011. Neosporosis in animals--the last five years. Veterinary Parasitology 180, 90-108.

Gennari, S. M.,2004. *Neospora caninum* no Brasil: situação atual da pesquisa. Rev Bras Parasitol Vet, 13, 23-28.

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.

Goodswen, S.J., Kennedy, P.J., Ellis, J.T., 2013. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. Infect Genet Evol 13, 133-150.

Indea, MT., 2014; Banco de dados do sistema informatizado de animais. Cuiabá-MT: Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso.

Justo, R. V., Manfio; J. B., Galhardo, J. A., Garcia, J. L., Campos, A. K., 2013 Seroepidemiological inquiry on bovine neosporosis in northern Mato Grosso state, Brazil. Semin: Cien. Agrar 34, 3897-3902. DOI: 10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl2p3897

Kelsall, J. E.; Diggle, P. J., 1995.Non-parametric estimation of spatial variation in relative risk. Statistics in Medicine 14, 559–573.

McAllister, M.M., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Jolley, W.R., Wills, R.A., McGuire, A.M., 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. International journal for Parasitology 28, 1473-1478.

McAllister, M.M., 2016. Diagnosis and Control of Bovine Neosporosis. Vet Clin North Am Food Anim Pract 32, 443-463

Minervino, A.H., Ragozo, A.M., Monteiro, R.M., Ortolani, E.L., Gennari, S.M., 2008. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle from Santarem, Para, Brazil. Res Vet Sci 84, 254-256.

Oshiro, L.M., Matos Mde, F., de Oliveira, J.M., Monteiro, L.A., Andreotti, R., 2007. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 16, 133-138.

Olinda, R. A.; Scalon, J. D. 2010. Métodos de Monte Carlo para análise de processos pontuais marcados, Revista Brasileira de Biometria 28, 39-56.

Packham, A.E., Sverlow, K.W., Conrad, P.A., Loomis, E.F., Rowe, J.D., Anderson, M.L., Marsh, A.E., Cray, C., Barr, B.C., 1998. A modified agglutination test for *Neospora caninum*: development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. Clin Diagn Lab Immunol 5, 467-473.

R Development Core Team, 2015. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Reichel, M.P., Alejandra Ayanegui-Alcerreca, M., Gondim, L.F., Ellis, J.T., 2013. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question. International journal for Parasitology 43, 133-142.

Rinaldi, L., Fusco, G., Musella, V., Veneziano, V., Guarino, A., Taddei, R., Cringoli, G., 2005. *Neospora caninum* in pastured cattle: determination of climatic, environmental,

farm management and individual animal risk factors using remote sensing and geographical information systems. Veterinary Parasitology 128, 219-230.

Robbe, D., Passarelli, A., Gloria, A., Di Cesare, A., Capelli, G., Iorio, R., Traversa, D., 2016. *Neospora caninum* seropositivity and reproductive risk factors in dogs. Exp Parasitol 164, 31-35.

Rodrigues, R. S., Igarashi L. S., Gomes, A. H. B., Aguiar D. M., Pacheco T. A., Okano, W.; Barros, M. P., Santos, M. D., 2016. The occurrence of anti-*Neospora caninum* in bovine female animals and bovine fetuses in Nossa Senhora do Livramento County, Mato Grosso. Semin: Ciênc. Agrár 37, 4161-4166.

Schares, G., Barwald, A., Staubach, C., Ziller, M., Kloss, D., Wurm, R., Rauser, M., Labohm, R., Drager, K., Fasen, W., Hess, R.G., Conraths, F.J., 2003. Regional distribution of bovine *Neospora caninum* infection in the German state of Rhineland-Palatinate modelled by Logistic regression. International journal for Parasitology 33, 1631-1640.

Silva, M. I. S., Almeida. M. A., Motta, R. A., Junior, W. P. J., Rabelo, S. S. A., 2008. Fatores de riscos associados à infecção por *Neospora caninum* em matrizes bovinas leiteiras em Pernambuco. Ciênc. Anim. Bras, 9, 455-461.

Thrusfield, M.V., 2007. Veterinary Epidemiology, 3.ed. Oxford: Blackwell Science, p. 228-245.

Thurmond, M.C., Hietala, S.K., 1997. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. Am J Vet Res 58, 1381-1385.

Trees, A.J., Williams, D.J., 2005. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. Trends Parasitol 21, 558-561.

Vanleeuwen, J.A., Haddad, J.P., Dohoo, I.R., Keefe, G.P., Tiwari, A., Scott, H.M., 2010. Risk factors associated with *Neospora caninum* seropositivity in randomly sampled Canadian dairy cows and herds. Preventive Veterinary Medicine 93, 129-138.

Table 1. Columns left to right: (1) Municipalities of Pantanal Ecoregion, Mato Grosso, Brazil (2) Total number of farms in each municipality. (3) Number of farms sampled in the current survey. (4) Number of cows ≥ 24-months-old sampled in the current survey. All data were collected from September to December 2014.

Municipality	N. of farms	N. of farms sampled	N. of cows sampled
Barão de Melgaço	583	21	203
Cáceres	2848	94	1003
Nossa Senhora do Livramento	1215	43	352
Poconé	1530	52	423
Santo Antônio do Leverger	1602	52	471
Total	7778	262	2452

Table 2. Result of the logistical regression model for risk factors associated with the prevalence of anti-*N. caninum* antibodies on the 262 farms sampled in the Pantanal ecoregion, state of Mato Grosso, Brazil, during September to December 2014.

Associated variable	Estimate	P	Chance	IC 95%	
Presence of a dog on the farm?	0,9565	<0,0001	2,6025	1,7647	3,9084
Any cow or buffalo aborted during the last 12 months?	0,5557	0,0196	1,7431	1,1253	2,8946
Are cows or bulls sold for breeding?	0,9832	0,0054	2,673	1,3822	5,598

Table 3. Result of the logistical regression model for risk factors associated with the prevalence of anti-*N. caninum* antibodies in individual bovines in the Pantanal ecoregion, state of Mato Grosso, Brazil, during September to December 2014.

Associated variable	Estimate	P	Chance	IC 95%	
Presence of a dog on the farm.	0,1809	<0,0001	1,1983	1,1357	1,2643
Animal age (considering female bovines from 24 months old).	0,0124	0,0146	1,0125	1,0025	1,0226

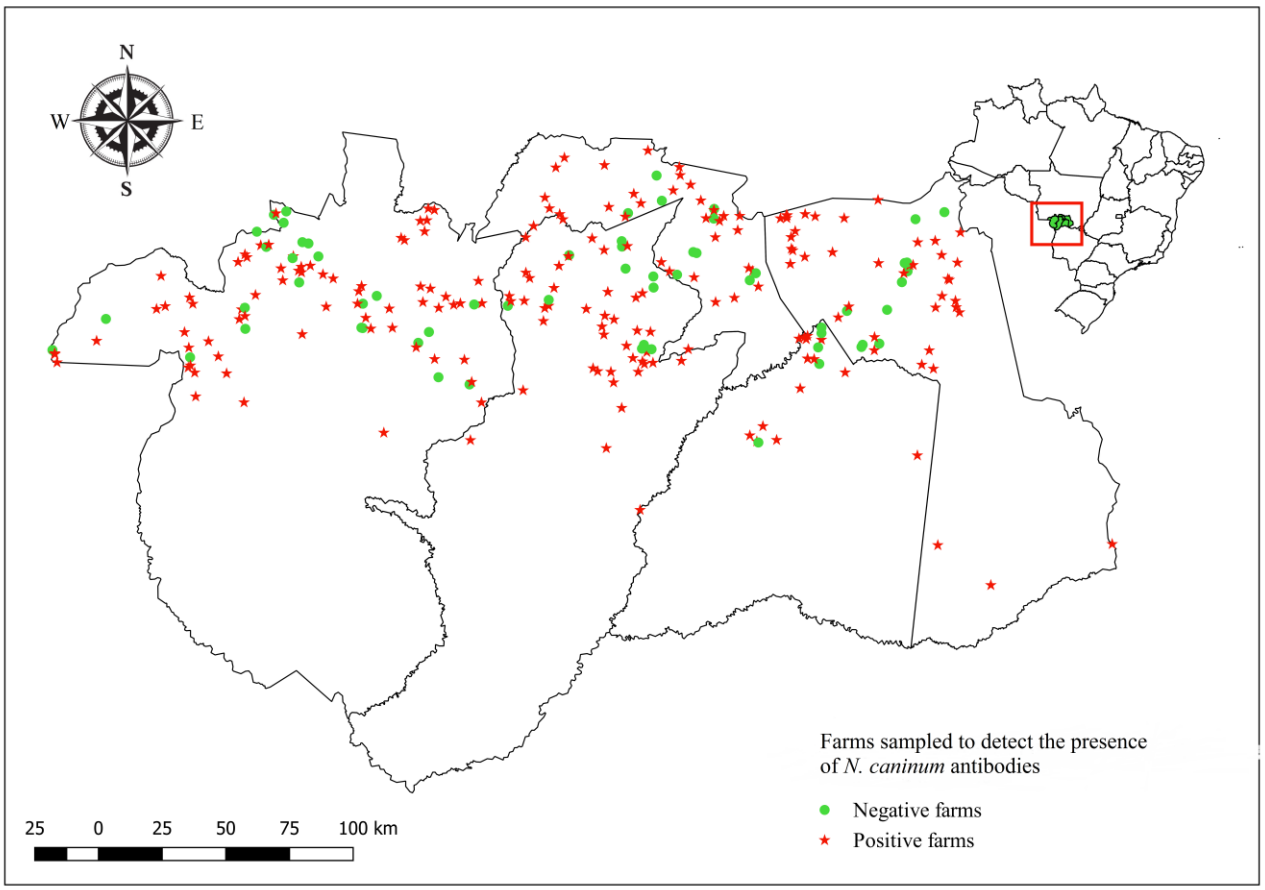


Figure 1. Distribution of farms sampled in the municipalities of Cáceres, Poconé, Barão de Melgaço, Nossa Senhora do Livramento and Santo Antônio do Leverger located in the Pantanal ecoregion of the state of Mato Grosso, during September to December 2014.

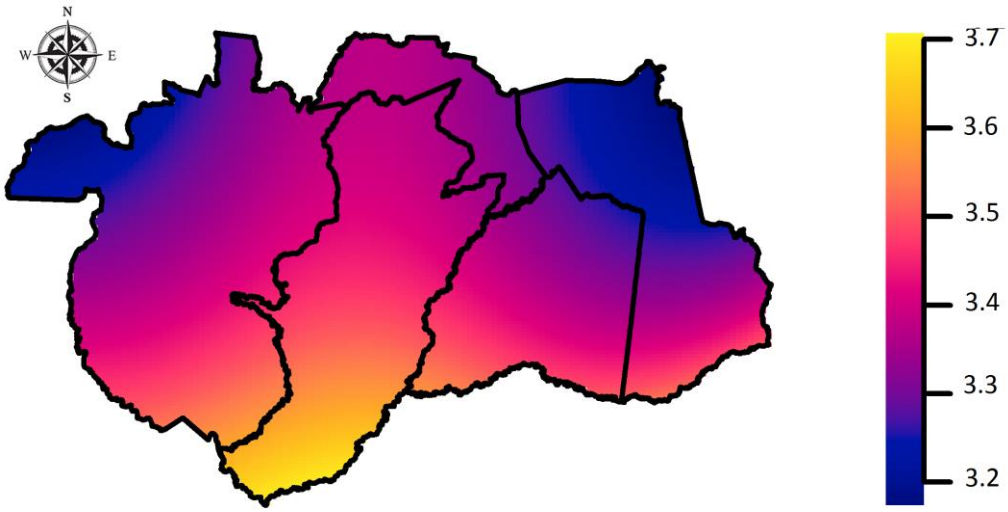


Figure 2. Spatial distribution of relative risk of *Neospora caninum* in herds in the Pantanal ecoregion of the state of Mato Grosso, during September to December 2014.

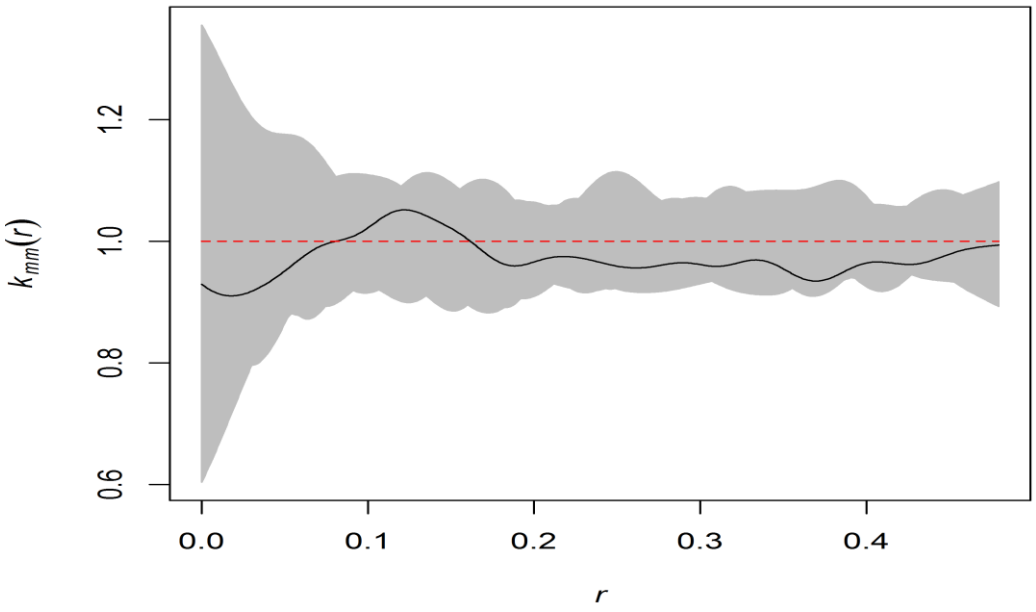


Figure 3. Marked spatial distribution correlation function for positive and negative farms for *Neospora caninum*, in the Pantanal ecoregion, state of Mato Grosso, Brazil, during September to December 2014.

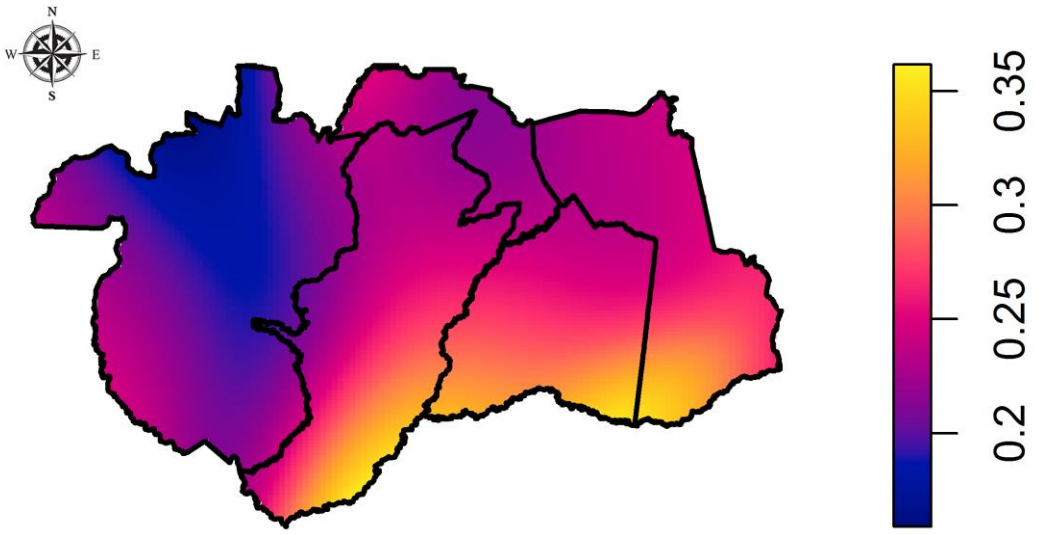


Figure 4: Spatial distribution of intra-herd prevalences of anti-*Neospora caninum* antibodies obtained by means of the Kernel Estimator in the Pantanal ecoregion, state of Mato Grosso, Brazil, during September to December 2014.

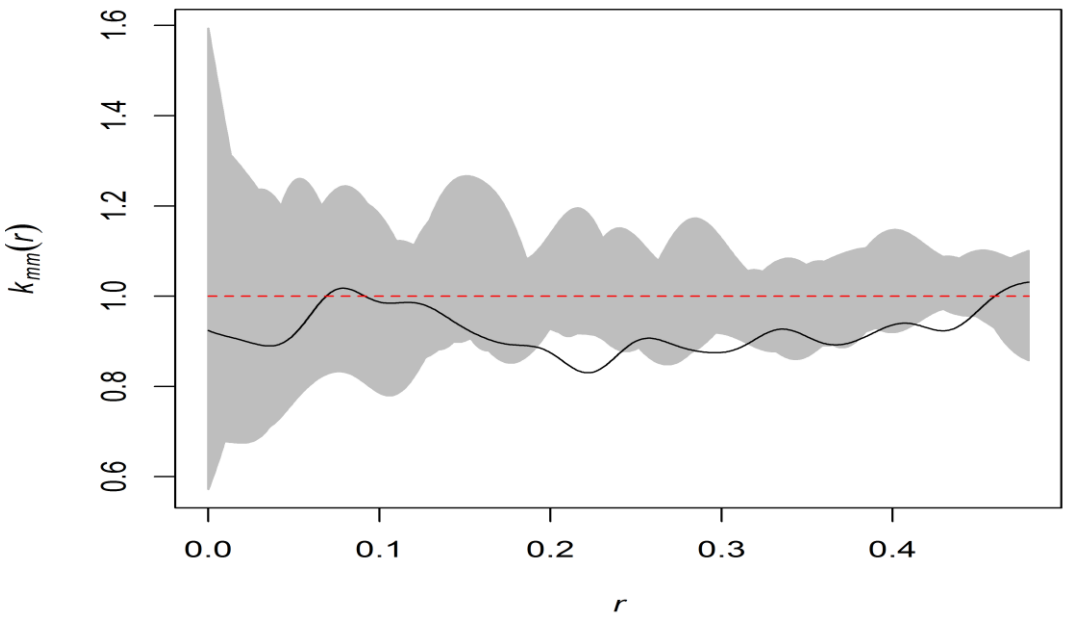
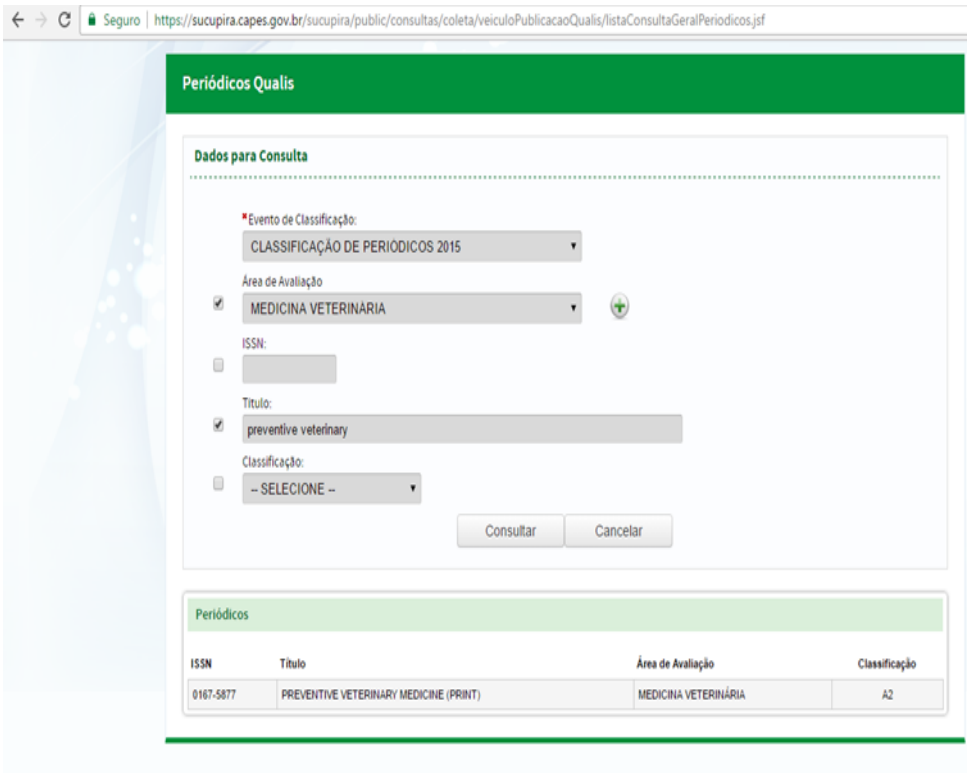


Figure 5: Marked spatial distribution function of the farms and their prevalences of anti-*Neospora caninum* antibodies, in the Pantanal ecoregion of the state of Mato Grosso, during September to December 2014.

APÊNDICE B – Qualis da Revista



APÊNDICE C – Comprovante de Submissão

Manuscript Details

Manuscript number	PREVET_2017_106
Title	Seroprevalence, spatial analysis and risk factors of infection with Neospora caninum in cattle from the Brazilian Pantanal
Article type	Research Paper

Abstract

Neosporosis is caused by an obligate intracellular protozoan, Neospora caninum. It is considered one of the most widespread and frequent causes of abortion in cattle throughout the World. To evaluate the prevalence of anti-Neospora caninum antibodies and associated risk factors, serum samples of 2452 bovines were collected from 262 farms in the Pantanal ecoregion, state of Mato Grosso, Brazil, an epidemiological questionnaire was given to each farmer for epidemiological data analysis. Antibodies of N. caninum were detected using the Indirect Immunofluorescent Assay (IFA), using the cut-off dilution of 1:100. Overall prevalence of N. caninum was 25.44% (IC 95%, 20.10%, 30.78%), and prevalence per herd was 76.72% (IC 95%, 71.60%, 81.84%), Presence of dogs, occurrence of abortion in cows, sale of cattle for breeding, and the risk of females being seropositive increased with age were statistically associated with seropositive animals. Spatial analysis demonstrated that the relative risk of the disease is constant in space and farms with the highest prevalences are located to the south and west of the region studied.

Keywords	neosporosis; antibodies; epidemiology; indirect Immunofluorescent assay.
Corresponding Author	Richard Pacheco
Corresponding Author's Institution	UFMT - Universidade Federal do Mato Grosso
Order of Authors	Ana Carolina Schmidt, THÁBATA DOS ANJOS PACHECO, Janice Elena Ioris Barddal, Anderson Castro Soares de Oliveira, Daniel Moura Aguiar, Rísia Lopes Negreiros, Richard Pacheco

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Cover letter.docx [Cover Letter]

Schmidt et al.,2017_Epidemiology_neosporosis_Panatanal.doc [Manuscript File]

Figure 1.tif [Figure]

Figure 2.tif [Figure]

Figure 3.tif [Figure]

Figure 4.tif [Figure]

Figure 5.tif [Figure]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

ANEXO A – QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO APLICADO NAS PROPRIEDADES AMOSTRADAS

01 – Identificação: _____ Município: _____ UF: _ Proprietário: _____	03 – Código do rebanho no estudo (8 dígitos) . . . . .
02 – Data da visita e colheita: ____/____/____	04 – Coordenadas **Lat:** _____**Lon:** _____ Altitude

05- Tipo da Exploração: ☐ corte ☐ leite ☐ mista

06- Tipo de Criação: ☐ confinado ☐ semi-confinado ☐ extensivo
07- Usa inseminação artificial? ☐ não ☐ usa inseminação artificial e touro ☐ usa só inseminação artificial
08- Raça predominante - Bovinos: ☐ zebu ☐ europeu de leite ☐ europeu de corte ☐ mestiço ☐ outras raças
Bubalinos: ☐ murrah ☐ mediterrâneo ☐ carabao ☐ jaffarabadi ☐ outras raças

12(a)- Bovinos existentes									**12(b)- Bubalinos existentes**								
Machos Castrados	**Machos inteiros (meses)**				**Fêmeas (meses)**				**Machos Castrados**	**Machos inteiros (meses)**				**Fêmeas (meses)**			
Total	0-6	6-12	12-24	> 24	0-6	6-12	12-24	> 24	Total	0-6	6-12	12-24	> 24	0-6	6-12	12-24	> 24

09- Outras espécies na propriedade: ☐ ovinos/caprinos ☐ equídeos ☐ suínos ☐ aves ☐ cão ☐ gato
10- Espécies silvestres em vida livre na propriedade: ☐ não tem ☐ cervídeos ☐ capivaras ☐ outras:.....
11- Alguma vaca/búfala abortou nos últimos 12 meses? ☐ não ☐ sim ☐ não sabe
12- O que faz com o feto abortado e a placenta? ☐ enterra/joga em fossa/queima ☐ alimenta porco/cão ☐ não faz nada
13- Compra fêmeas ou machos com finalidade de reprodução? ☐ não ☐ sim
Onde/de quem: ☐ em exposição ☐ em leilão/feira ☐ de comerciante de gado ☐ diretamente de outras fazendas
14- Vende fêmeas ou machos para reprodução? ☐ não ☐ sim
A quem/onde: ☐ em exposição ☐ em leilão/feira ☐ a comerciante de gado ☐ diretamente a outras fazendas
15- Vacina contra brucelose? ☐ não ☐ sim, apenas fêmeas até 8 meses de idade ☐ sim, fêmeas de qualquer idade
16- (A) Realiza abate de bovinos (qualquer idade) na propriedade? ( )não ( ) sim
Qual frequência? ( )semanal ( )quinzenal ( )mensal ( ) semestral
16- (B) Local de abate das fêmeas e machos adultos no fim da vida reprodutiva:
( )na própria fazenda ( ) em estabelecimento sem inspeção veterinária
( )em estabelecimento de abate com inspeção veterinária ( ) não abate
17- Aluga pastos em alguma época do ano? ☐ não ☐ sim
18- Tem pastos em comum com outras propriedades? ☐ não ☐ sim
19- Existem na propriedade áreas alagadiças às quais o gado tem acesso? ☐ não ☐ sim
20- Tem piquete separado para fêmeas na fase de parto e/ou pós-parto? ☐ não ☐ sim
21-Tem assistência veterinária? ☐ não ☐ sim de que tipo? ☐ Veterinário da cooperativa ☐ veterinário particular
NOME DO VETERINÁRIO: _____

ASSINATURA: _____

Nº	NÚMERO DO FRASCO Cód. do estudo + Nº sequêncial (11 dígitos)	Espécie (1)	Idade (anos)	Nº de parições	Já Abortou? SIM	Já Abortou? Não
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						

Códigos e instruções para preenchimento desta tabela

(1) Bovino = 1; Bubalino = 2;