

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

**Soroprevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* e
Neospora caninum em suínos de propriedades de
subsistência no Estado de Mato Grosso.**

Make KawatakeMinetto

Cuiabá – MT
2018

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

**Soroprevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* e
Neospora caninum em suínos de propriedades
subsistência no Estado de Mato Grosso.**

Autora: Make Kawatake Minetto

Orientador: Prof. Dr. Richard de Campos Pacheco

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

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

K22s Kawatake Minetto, Make.
Soroprevalência de infecção por T / Make Kawatake
Minetto. -- 2018
103 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Prof Dr. Richard de Campos Pacheco.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato
Grosso, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Cuiabá, 2018.
Inclui bibliografia.

1. toxoplasmose. 2. neosporose. 3. anticorpos. 4. 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.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
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: "Soroprevalência de infecção por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em suínos de propriedades de subsistência do Estado de Mato Grosso"

AUTOR : Mestranda Make Kawatake Minetto

Dissertação defendida e aprovada em 30/05/2018.

Composição da Banca Examinadora:

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

Examinador Interno Doutora Michelle Igarashi Watanabe
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Examinador Externo Doutora Andréia Lima Tomé Melo
Instituição : UNIVERSIDADE DE CUIABÁ-UNIC

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

CUIABÁ, 30/05/2018.



CERTIFICADO

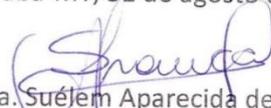
Certificamos que o Protocolo Nº 23108.215014/2017-80, sobre “Levantamento sorológico, epidemiológico e caracterização genética de *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) em animais e humanos no estado de Mato Grosso”, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. RICHARD DE CAMPOS PACHECO**, está de acordo 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 **12/05/2017**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº 23108. 215014/2017-80, entitled “Serological survey, epidemiological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) in animals and humans in the state of Mato Grosso”, 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 **May, 2017**.

Cuiabá-MT, 31 de agosto de 2017.


Prof. Dr. Daniel Moura de Aguiar
Presidente


Prof. Dra. Suélem Aparecida de França
Vice-Presidente

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Issao Kawatake e Maria da Silva Kawatake. Ao meu marido e filhos João Augusto Minetto, João Vitor e João Paulo Minetto, agradeço por esse amor incondicional e confiança sempre escancarada em seu coração. Aos meus irmãos Issao Filho, Harume e Heije pela torcida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que guia os meus passos sempre, sem ele eu não seria ninguém e nada disso teria sido possível

Ao meu orientador Professor Dr. Richard de Campos Pacheco. Obrigada por me aceitar como orientada e a oferecer condições de realizar este trabalho, que desde o início se mostrou bastante entusiasmado com este estudo. Obrigada pela dedicação e compreensão, principalmente nessa etapa final.

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 e ao Governo do Estado de Mato Grosso pela licença para a realização da pesquisa, pela disponibilização das amostras de soros suínos utilizadas na pesquisa e por acreditar na qualificação profissional do seu corpo técnico.

A Universidade Federal de Mato Grosso, instituição na qual me formei em 2002, e que hoje retornei para continuar meu aprendizado.

Aos colegas dos Laboratórios de Virologia e Rickettsioses e Parasitologia da UFMT, Ísis Taques, Alice, Thábata, Leodil, agradeço de coração pelos momentos que passamos juntos, pelas discussões científicas, pelas dúvidas resolvidas e pelo companheirismo, especialmente a doutoranda Rute Witter pelos ensinamentos na execução da técnica de diagnóstico.

A todos os meus amigos, especialmente da Coordenadoria de Defesa Sanitária Animal do Instituto de Defesa Agropecuária de Mato Grosso. Obrigada Daniela Schentino coordenadora do programa de suínos no Estado de Mato Grosso.

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

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

Ao meu marido João Augusto Minetto e meus filhos, os amores da minha vida, pelo apoio, por entender que apesar da ausência formamos uma família unida e feliz.

A todos que direta ou indiretamente, ajudaram nesse trabalho.

EPÍGRAFE

“O otimista é um tolo. O pessimista um chato. O bom mesmo é ser um realista
esperançoso”.

Ariano Suassuna.

RESUMO

Para avaliar a prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* e identificar os fatores de risco associados a essas infecções, foram coletadas amostras de soro de 1.070 suínos de 320 estabelecimentos de criação de suínos no Estado de Mato Grosso, Brasil. Cada agricultor foi solicitado a preencher um questionário para posterior análise dos dados epidemiológicos. Anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* foram detectados utilizando a Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) com diluições de corte de 1:64 e 1:50, respectivamente. A prevalência total de anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* foi 32,48% e 13,49%, respectivamente, enquanto a prevalência por rebanho foi de 55,63% para *T. gondii* e 27,81% para *N. caninum*. Os suínos alimentados com sobras foram 1,0989 vezes mais propensos a terem anticorpos anti-*T. gondii*, por outro lado a idade dos suínos e alimentação com sobras foram as variáveis, significativamente associadas com resultados positivos para anticorpos anti-*N. caninum*. Além disso, as fazendas que forneciam restos de comida eram 38,13% menos propensas a ter suínos reagentes para *N. caninum*. Novos estudos são necessários para avaliar o impacto da infecção por *T. gondii* na produção de suinocultura de fundo de quintal, sua importância como fonte de infecção para os humanos no Estado de Mato Grosso e o papel dos suínos domésticos na epidemiologia da neosporose.

Palavras-chave: toxoplasmose; neosporose; anticorpos; Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

ABSTRACT

To evaluate the prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies and identify the risk factors associated with these infections, serum samples were collected from 1,070 pigs from 320 backyard pig farming establishments in the state of Mato Grosso, Brazil. Each farmer was asked to fill out a questionnaire for subsequent epidemiological data analysis. Anti-*T. gondii* and anti-*N. caninum* antibodies were detected using the indirect immunofluorescent assay (IFA) with cut-off dilutions of 1:64 and 1:50, respectively. The overall prevalence of anti-*T. gondii* and anti-*N. caninum* antibodies was 32.48% and 13.49%, respectively, while the prevalence per herd was 55.63% for *T. gondii* and 27.81% for *N. caninum*. Pigs fed with leftovers were 1,0989 times more likely to test positive for anti-*T. gondii* antibodies, while age of the pigs and feeding with leftovers were the significant variables associated with positive results for anti-*N. caninum* antibodies. Furthermore, farms that provided leftover food s were 38.13% less likely to have pigs testing positive for *N. caninum*. Further studies are necessary to evaluate the impact of *T. gondii* infection in backyard pig farming production, its importance as a source of toxoplasmosis infection in humans in the Mato Grosso state, and the role of domestic pigs in the epidemiology of neosporosis.

Key words: toxoplasmosis; neosporosis; antibodies; Indirect Immunofluorescence Assay (IFA).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Ocorrência de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos no Brasil e outros países.....	31
Tabela 2.	Ocorrência de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> em suínos no Brasil e outros países.....	33
Tabela 3.	Amostragem de suínos adultos (≥ 8 meses de idade) nos criatórios selecionados pelo Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso (INDEA/MT), durante o período de setembro a dezembro de 2014, no Estado de Mato Grosso.....	42
Tabela 4.	Variáveis qualitativas analisadas nos testes de associações como potenciais fatores de risco para propriedades positivas para anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> e <i>Neospora caninum</i> em propriedades de subsistência do Estado de Mato Grosso, 2014.....	47
Tabela 5.	Variáveis qualitativas analisadas nos testes de associações como potenciais fatores de risco para suínos positivos (≥ 8 meses de idade) para anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> e <i>Neospora caninum</i> em propriedades de subsistência do Estado de Mato Grosso, 2014.....	47
Tabela 6.	Total de animais positivos para anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> , de acordo com os títulos apresentados pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) no Estado de Mato Grosso, 2014.....	49
Tabela 7.	Resultados da análise univariada dos possíveis fatores de risco para propriedades positivas para anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos de propriedade de subsistência do Estado de Mato Grosso, 2014.....	50
Tabela 8.	Resultado do modelo de regressão logística para os fatores de risco associados com a prevalência de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos de propriedades de subsistência do Estado de Mato Grosso, 2014.....	51
Tabela 9.	Resultado do modelo de regressão logística para os fatores de risco associados com a prevalência de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em 1070 suínos (≥ 8 meses) do Estado de Mato Grosso durante setembro a dezembro de 2014.....	51

Tabela 10.	Total de suínos positivos para anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> , de acordo com os títulos apresentados pela reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) no Estado de Mato Grosso, 2014.....	59
Tabela 11.	Resultados do teste Qui-quadrado das possíveis associações para propriedades positivas para anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> em suínos de propriedade de subsistência do Estado de Mato Grosso, 2014.....	60
Tabela 12.	Resultado do modelo de regressão logística para os fatores de risco associados com a prevalência de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> em suínos nas 320 propriedades amostradas no Estado de Mato Grosso.....	61
Tabela 13.	Resultado do modelo de regressão logística para os fatores de risco associados com a prevalência de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> em 1070 suínos (≥ 8 meses) do Estado de Mato Grosso durante setembro a dezembro de 2014.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo de transmissão de <i>Toxoplasma gondii</i>	25
Figura 2.	Ciclo biológico da espécie <i>Neospora caninum</i>	26
Figura 3.	Formas infecciosas dos protozoários <i>Toxoplasma gondii</i> e <i>Neospora caninum</i>	27
Figura 4.	Mapa do Estado de Mato Grosso, divisas de Estados e Bolívia.Fonte: Secretaria de Estado de Meio Ambiente. Superintendência de Biodiversidade. Coordenadoria de Ecossistemas. Mapa do Estado de Mato Grosso. Cuiabá, 2011.....	40
Figura 5.	Mapa de propriedades amostradas no Estado de Mato Grosso nos criatórios selecionados pelo Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso (INDEA/MT), durante o período de setembro a dezembro de 2014.....	42
Figura 6.	Distribuição das propriedades rurais amostradas, segundo resultado da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), para pesquisa de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos (≥ 8 meses) no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.....	49
Figura 7.	Estimador Kernel do risco relativo da toxoplasmose suína no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.....	52
Figura 8.	Estimador Kernel da densidade de propriedades negativas na pesquisa a pesquisa de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos (≥ 8 meses de idade) em propriedades de subsistência no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.....	53
Figura 9.	Estimador Kernel da densidade de propriedades positivas na pesquisa de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos (≥ 8 meses de idade) de propriedades de subsistência no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.....	54
Figura 10.	Função de correlação marcada da distribuição espacial das propriedades positivas e negativas na pesquisa de	

	anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos (≥ 8 meses de idade) de propriedades de subsistência no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.....	55
Figura 11.	Distribuição espacial das prevalências intra-rebanho das propriedades positivas na pesquisa de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos (≥ 8 meses de idade) de propriedades de subsistência no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.....	56
Figura 12.	Estimador Kernel da prevalência de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos (≥ 8 meses de idade) de propriedades de subsistência no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.....	57
Figura 13.	Função de correlação marcada da distribuição espacial das propriedades positivas na pesquisa de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos (≥ 8 meses de idade) de propriedades de subsistência no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.....	58
Figura 14.	Distribuição das propriedades rurais amostradas, segundo resultado da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), para pesquisa de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> em suínos (≥ 8 meses) no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014	59
Figura 15.	Estimador Kernel do risco relativo da neosporose suína no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.....	62
Figura 16.	Estimador Kernel da densidade de propriedades negativas na pesquisa a pesquisa de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> em suínos (≥ 8 meses de idade) em propriedades de subsistência no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.....	63
Figura 17.	Estimador Kernel da densidade de propriedades positivas na pesquisa de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> em suínos (≥ 8 meses de idade) em propriedades de subsistência no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.....	64
Figura 18.	Função de correlação marcada da distribuição espacial das propriedades positivas e negativas na pesquisa de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> em suínos (≥ 8 meses de	

- idade) em propriedades de subsistência no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014..... 65
- Figura 19. Distribuição espacial das prevalências intra-rebanho das propriedades positivas na pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em suínos (≥ 8 meses de idade) em propriedades de subsistência no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014..... 66
- Figura 20. Estimador Kernel da prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em suínos (≥ 8 meses de idade) em propriedades de subsistência no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014..... 67
- Figura 21. Função de correlação marcada da distribuição espacial das propriedades positivas na pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em suínos (≥ 8 meses de idade) em propriedades de subsistência no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014..... 68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
FAO	Food and Agriculture Organization
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
INDEA	Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso
LASAMT	Laboratório de Saúde Animal de Mato Grosso
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OR	Odds Ratio
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
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	21
2.1 HISTÓRICO.....	21
2.1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	21
2.1.2 <i>Neospora caninum</i>	22
2.2 ETIOLOGIA.....	23
2.3 HOSPEDEIROS.....	24
2.4 CICLO BIOLÓGICO.....	25
2.5 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS	29
2.6 EPIDEMIOLOGIA.....	30
2.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	33
2.8 CONTROLE.....	36
3 OBJETIVO	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 ÁREA DE ESTUDO.....	39
4.2 AMOSTRAGEM.....	40
4.3 COLETA DE SORO E INFORMAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS.....	43
4.4 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI).....	43
4.5 PREVALÊNCIA, ANÁLISE ESTATÍSTICA E ANÁLISE ESPACIAL.....	45
5 RESULTADOS	48
5.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	48
5.2 <i>Neospora caninum</i>	58
6 DISCUSSÃO	68
7 CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	74
APÊNDICE A – Artigo submetido	83
APÊNDICE B – Qualis da revista	99

APÊNDICE C - Comprovante de submissão.....	100
ANEXO A – Questionário epidemiológico.....	101

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas as preocupações com nutrição e segurança alimentar levaram a um forte interesse em riscos biológicos relacionados ao consumo de alimentos (SCHLUNDT et al., 2004; DJURKOVIC-DJAKOVIC et al., 2013).

O conceito de Saúde Única (*One Health*) surgiu para traduzir a união indissociável entre a saúde animal, humana e ambiental, propondo que a saúde animal e a saúde humana são interdependentes e necessitam, também, de um ecossistema saudável (OIE, 2016). A carne suína produzida em todo o mundo (com exceção de países onde há restrição ao consumo) é caracterizada, principalmente, por dois sistemas de produção: especializado intensivo e o sistema extensivo ou orgânico (FAO, 2014). No sistema especializado intensivo os suínos são mantidos em ambientes fechados (confinamento) com controle cuidadoso de temperatura, ventilação e densidade, enquanto que no sistema extensivo ou orgânico os suínos são criados em contato com solo, onde buscam por parte da alimentação. De acordo com a FAO a carne de porco é a carne mais consumida no mundo e sua produção representa uma parte importante do setor agropecuário (FAO, 2014).

O Estado de Mato Grosso apresenta forte desenvolvimento da agricultura e pecuária, representando metade do produto interno bruto do Estado. Mato Grosso é o quinto maior produtor de suínos no Brasil, com 2.613.925 milhões de animais em 34.093 propriedades rurais e, deste total,

98,78% são pequenas propriedades sem tecnificação compreendendo 16,76% da população total de suínos (INDEA, 2016).

Zoonoses transmitidas por alimentos são definidas como doenças, naturalmente, transmitidas entre animais e seres humanos através dos alimentos, água ou contato com qualquer tipo de contaminação e estima-se que mais de 10% da população mundial é, anualmente, infectada com algum patógeno transmitido por alimentos (SCHLUNDT et al., 2004; DJURKOVIC-DJARKOVIC et al., 2013).

A toxoplasmose, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, coccídeo do filo Apicomplexa, de distribuição cosmopolita é capaz de infectar cronicamente um grande número de hospedeiros vertebrados, entre aves, mamíferos marinhos e terrestres e com prevalência sorológica muito alta (DUBEY, 2010). É um dos parasitos mais comuns em seres humanos, causando doenças graves, principalmente, em indivíduos imunologicamente comprometidos. A epidemiologia complexa deste protozoário reconhece várias vias de infecção, que para os seres humanos pode ser a vertical ou horizontal. A infecção horizontal envolve, principalmente, o consumo por um hospedeiro intermediário de cistos teciduais em carne infectada (DUBEY, 2010; GUO et al., 2015; BELLUCO et al., 2016).

Em diversos países, incluindo o Brasil, os suínos são considerados a mais importante fonte de infecção de *T. gondii* para humanos. A alta produção e consumo de carne suína, a elevada disseminação e prevalência do *T. gondii*, associada ao fato de que os cistos não são detectáveis ao abate; torna este

alimento, quando ingerido cru ou malcozido, uma importante via de transmissão do protozoário ao homem (DUBEY et al., 1995; DUBEY, 2010).

Os levantamentos sorológicos da toxoplasmose em suínos servem para avaliar, além da ocorrência desta infecção, o risco a que estão expostos os humanos que ingerem carne crua ou malcozida desses animais (FIALHO e ARAÚJO, 2002). Nos Estados Unidos, Dubey et al. (1991) observaram uma prevalência de infecção por *T. gondii* de 42% em criações não comerciais. No entanto, dados do Estado de Mato Grosso, importante produtor no Brasil, são escassos, restringindo a informação sobre a ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* em suínos de criações tecnificadas dos municípios de Diamantino e Nova Mutum (MURARO et al., 2010).

A neosporose é causada pelo *Neospora caninum*, um protozoário recentemente reconhecido, sendo, até 1988, diagnosticado, erroneamente, como *T. gondii*. É estruturalmente, antígenicamente e molecularmente relacionado ao *T. gondii*, mas estes organismos são biologicamente distintos (DUBEY et al., 2017). Desde o seu primeiro reconhecimento como uma doença clínica de cães na Noruega em 1984 (BJERKAS et al., 1984), a neosporose tem sido amplamente estudada como causa de doença neuromuscular em cães e aborto em bovinos (DUBEY et al., 1999). O *N. caninum* é encontrado parasitando extensa faixa de hospedeiros, incluindo espécies de herbívoros, bem como animais de companhia e silvestres, sendo a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* já descritos em amostras de soro de várias espécies (cães, gatos, humanos, suínos e aves). O aborto é um problema mundial na indústria pecuária, que contabiliza perdas econômicas anuais de bilhões de dólares e *N. caninum* é uma das principais causas destes abortos (DUBEY et al., 2017).

A infecção experimental em suínos levou a transmissão transplacentária de *N. caninum* (JENSEN et al.,1998), e a infecção natural em suínos foi descrita pela primeira vez no Brasil por Azevedo et al, 2010.

O objetivo do trabalho foi realizar o estudo epidemiológico da toxoplasmose e neosporose suína por meio da prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* e caracterizar os fatores de risco em suínos (≥ 8 meses) de propriedades de subsistência do Estado de Mato Grosso, além da análise espacial de distribuição dos animais sororeagentes e áreas de maior risco de ocorrência da doença no Estado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

2.1.1 Toxoplasma gondii

Toxoplasma gondii foi descoberto em 1908 em dois países diferentes, no Brasil por Splendore em coelhos de laboratório em São Paulo, que acreditou tratar-se de *Leishmania* e no norte da África por Nicolle e Manceaux em um roedor (*Ctenodactylus gundi*), comumente usados em laboratório durante pesquisas de leishmaniose no Instituto Pasteur da Tunísia. Porém, logo, perceberam que se tratava de um novo organismo, o qual foi nomeado de *Toxoplasma gondii*, baseado em sua morfologia (toxó: arco, plasma: vida) e no seu hospedeiro (*Ctenodactylus gundi*) (DUBEY, 2010).

A toxoplasmose natural em suínos foi inicialmente descrita por Farrel et al. (1952) em Ohio, nos Estados Unidos, em um rebanho que apresentava elevada mortalidade. Weinman e Chandler (1954) em seus estudos confirmaram a hipótese sobre a possibilidade de transmissão horizontal da toxoplasmose por ingestão de cistos teciduais presentes na carne crua de suínos, fato também observado por Jacob et al. (1960).

No Brasil, o primeiro relato da doença em suínos foi feito por Silva (1959) em Minas Gerais e, posteriormente, também em Minas Gerais, Schenk et al. (1969) encontraram uma frequência de anticorpos anti-*T. gondii* em suínos de 23,8%.

Os felídeos são os únicos hospedeiros definitivos que eliminam oocisto do parasita, formas estas que resultantes da fase sexuada do ciclo. As condições climáticas são fundamentais para a esporulação dos oocistos no meio-ambiente e, conseqüentemente, na propagação da infecção, por meio da contaminação de água e alimentos (AMENDOEIRA et al., 1999)

No período de 1975-1976, foi descrito o ciclo selvático do parasito, evidenciando que não só os felinos domésticos eram os responsáveis pela perpetuação do protozoário (FIALHO et al., 2009).

2.1.2 *Neospora caninum*

O primeiro relato de *Neospora caninum* foi feito por Björkas et al. (1984) na Noruega, onde foi identificado protozoário em um grupo de seis cães da raça Boxer que apresentavam sintomatologia neurológica levando à paresia

após vários meses, sendo esses animais soronegativos para *T. gondii*. Posteriormente, parasito semelhante foi encontrado por Dubey et al. (1988) em tecidos de dez cães nos Estados Unidos, que foi isolado e descrito como um novo gênero e espécie – *Neospora caninum*.

Lindsay e Dubey (1989) desenvolveram a técnica de imunohistoquímica, tornando possível o diagnóstico da infecção em diversas espécies animais a partir de amostras armazenadas.

Em 1998, o cão (*Canis lupus familiaris*) é definido como hospedeiro definitivo de *N. caninum* (MCALLISTER et al., 1998). No mesmo ano, Jensen et al. (1998) comprovaram, através de infecção experimental de porcas, a transmissão transplacentária de *N. caninum* em suínos.

Posteriormente, outros canídeos foram comprovados como hospedeiros definitivos de *N. caninum*, sendo eles, o coiote (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004), o Dingo australiano (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e o lobo cinzento (*Canis lupus lupus*) (DUBEY et al., 2011).

2.2 Etiologia

T. gondii e *N. caninum* pertencem ao reino Protista, Sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidiorida, Subordem Eimeiina e família Sarcocystidae (DUBEY, 2002). O gênero *Neospora* possui uma segunda espécie, o *N. hughesi*, isolado de um cavalo em 1998 (MARSH et al., 1998).

2.3 Hospedeiros

A família Felidae, são os únicos hospedeiros definitivos (HD) para *T. gondii*, onde são capazes de realizar a fase sexuada com produção de oocistos (DUBEY, 1994).

T. gondii é um parasito com pouca especificidade quanto ao hospedeiro intermediário (HI) incluindo o homem e várias espécies animais (domésticos, silvestres, marinhos e aves) (TENTER; WEISS, 2000).

Os HD do *N. caninum* são membros da família Canidae incluindo o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) (MCALLISTER et al., 1998), o coiote (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004), o dingó australiano (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e o lobo cinzento (*Canis lupus lupus*) (DUBEY et al., 2011).

Os HI de maior importância do *N. caninum* são os bovinos, sendo também os mais acometidos pela neosporose (MCALLISTER et al., 1998). No entanto, outras espécies podem atuar como HI, dentre eles, suínos, ovinos, caprinos, equinos, bubalinos, galinhas, raposas vermelhas, veados, zebras, marsupiais, roedores, coelhos, aves silvestres, entre outros (DUBEY et al., 2003; RODRIGUES et al., 2004; COSTA et al., 2008; DONAHOE et al., 2015).

O *N. caninum* parece estar amplamente distribuído em muitas espécies animais, embora seja mais bem estudado apenas em bovinos e cães. A transmissão transplacentária foi documentada em bovinos, ovelhas, cabras, cães, várias espécies de cervos, e induzida, experimentalmente, em bovinos, cães, ovelhas, cabras, macacos, porcos, gatos e camundongos (DUBEY et al., 2017).

2.4 Ciclo biológico

Os ciclos de vida do *T. gondii* e do *N. caninum* são heteróxeos e envolve HD (um felídeo na toxoplasmose ou canídeo na neosporose), no qual ocorre a replicação sexual, e HI onde acontece a reprodução assexuada (DUBEY et al., 2007) (Figuras 1 e 2).

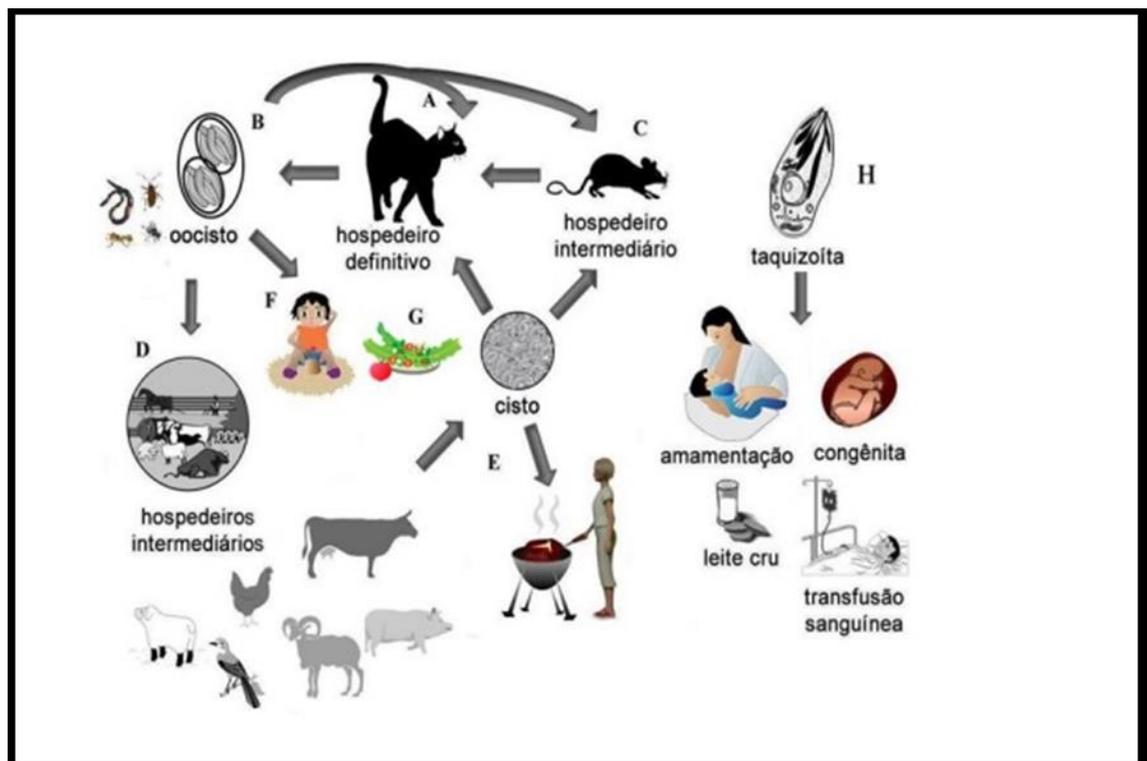


Figura 1. Ciclo de transmissão de *Toxoplasma gondii*.
Fonte: Amendoeira e Mattos, 2012. Laboratório de Toxoplasmose – IOC-Fiocruz.

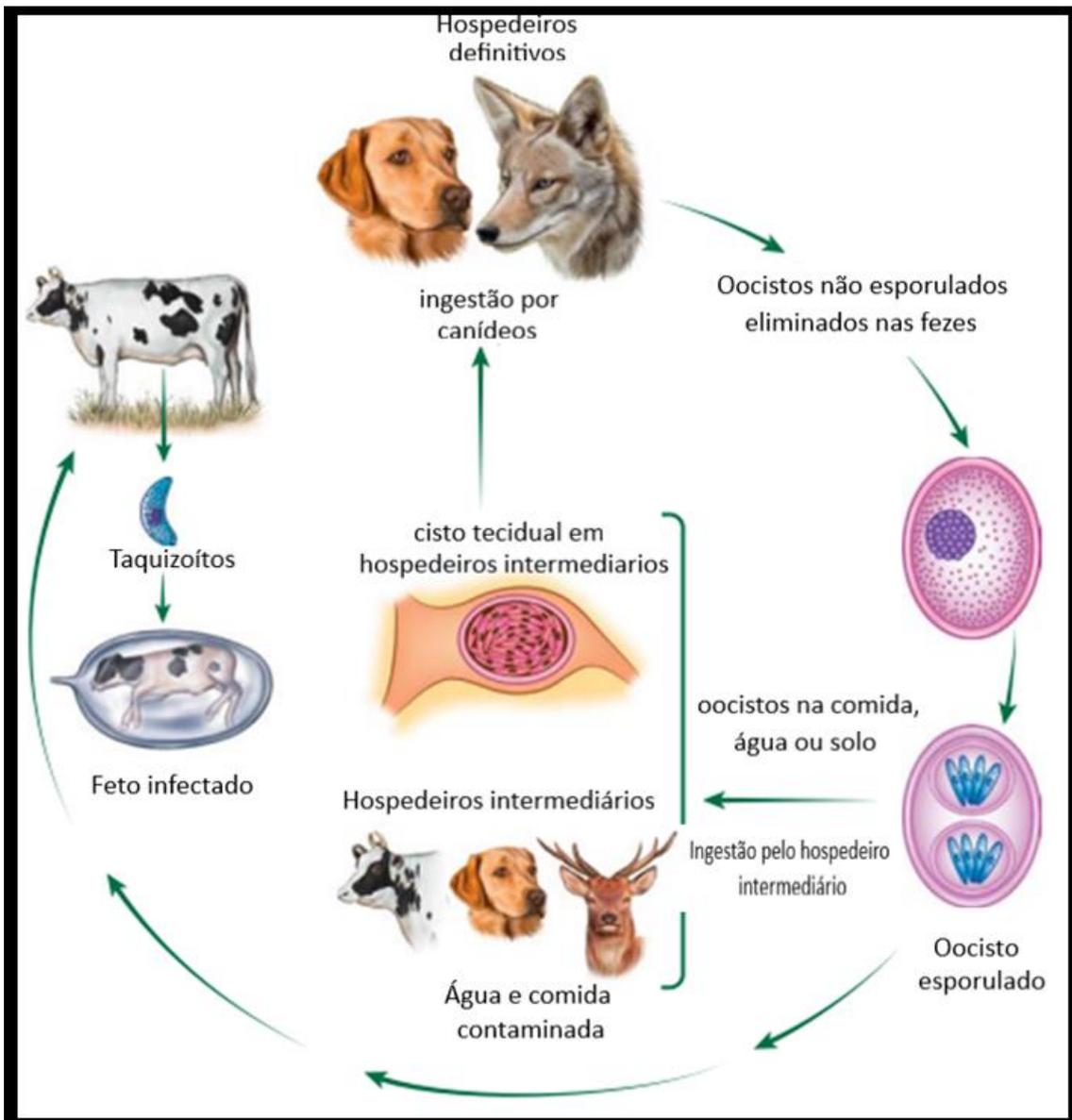


Figura 2. Ciclo biológico de *Neospora caninum*.
 Fonte: adaptado de Dubey et al. (2017).

O ciclo biológico de *T. gondii* e *N. caninum* é complexo e envolve três formas infecciosas: taquizoítos, bradizoítos (no interior de cistos teciduais) e oocistos (DUBEY e LINDSAY, 1996; DUBEY et al., 2002) (Figura 3).

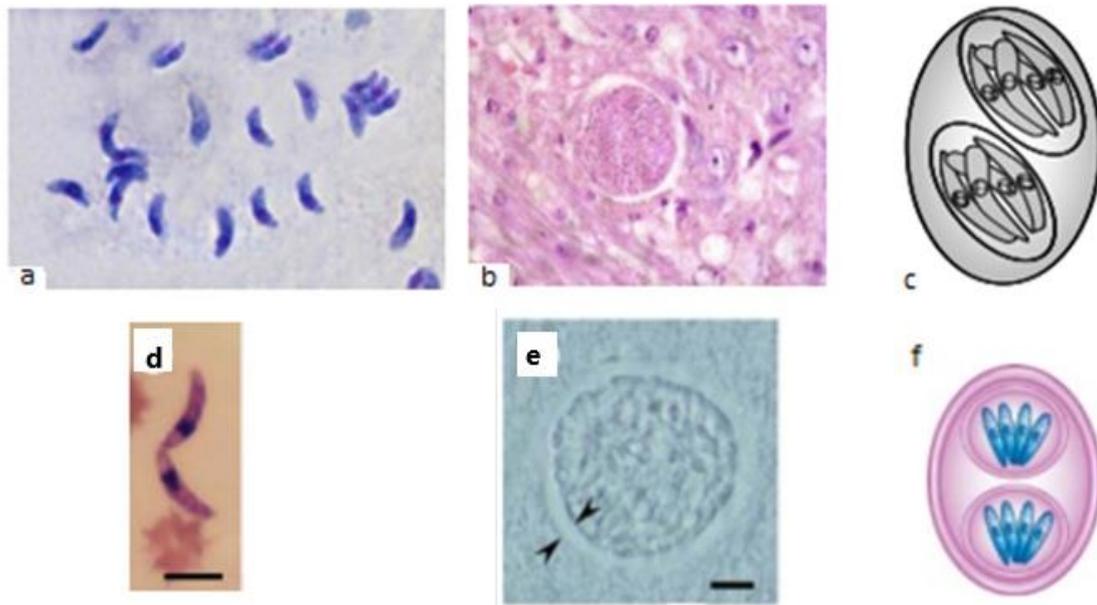


Figura 3. Formas de desenvolvimento dos protozoários *T. gondii* e *N. caninum*. (A) Taquizoítos de *Toxoplasma gondii* em exsudato peritoneal de camundongos, corado pelo método de May-Gruwald-Giemsa, 1000X. (B) Cisto de *Toxoplasma gondii* em corte histológico de cérebro de camundongo, corado por hematoxilina eosina, 1000X. (C) Desenho esquemático do oocisto maduro de *T. gondii*, com dois esporocistos, cada um deles com quatro esporozoítas. (D) Taquizoítos de *N. caninum* corados com Giemsa. (E) Cisto de *N. caninum* em corte histológico de cérebro de camundongo, sem coloração. (F) Desenho esquemático do oocisto maduro de *N. caninum*. Fonte: adaptado de Amendoeira et al. (2012) e Dubey et al. (2017).

Taquizoítos e cistos teciduais ocorrem intracelularmente, sendo estágios encontrados nos hospedeiros intermediários, onde ocorrem duas fases do desenvolvimento assexuado: na primeira fase, taquizoítos responsáveis pela fase aguda da infecção, invadem as células e se multiplicam rapidamente por endodiogenia, rompendo as células e liberando os taquizoítas que disseminam para vários tecidos. Sem uma resposta imunológica efetiva do hospedeiro, taquizoítos causam uma forte resposta inflamatória e destruição de tecidos com a manifestação clínica da doença (fase aguda) com o início de uma resposta imune do hospedeiro, os taquizoítos diferenciam-se em bradizoítos e estabelecem um cisto tecidual persistente (TENTER et al., 2000; BUXTON et al., 2002).

Bradizoítos são considerados os organismos de multiplicação lenta ou de latência e, também, multiplicam-se por endodiogenia, formando os cistos teciduais intracelulares, predominantemente, em tecidos neurais e musculares, podendo persistir por toda a vida do hospedeiro (fase crônica). (DUBEY e LINDSAY, 2006; TENTER et al., 2000).

Na transmissão horizontal, os cistos teciduais quando ingeridos por hospedeiros definitivos (felídeos para *T. gondii* e canídeos para *N. caninum*) tem a parede cística digerida por enzimas proteolíticas liberando bradizoítas, que invadem células epiteliais do intestino delgado e iniciam o desenvolvimento da fase assexuada (esquizogonia) com formação de esquizontes e liberação de merozoítas, que se diferenciam em gametas masculino e feminino, os quais iniciam a fase sexuada onde o gameta feminino é fertilizado pelo gameta masculino formando o oocisto, e estes são liberados na luz intestinal do hospedeiro definitivo (TENTER et al., 2000; DUBEY e LINDSAY, 2006).

No hospedeiro definitivo oocistos são liberados para o meio ambiente na forma não esporulada, medindo 10 a 11 µm de diâmetro (*N. caninum*) e 10 a 12 µm de diâmetro (*T. gondii*), são esféricos a subesféricos, e sob condições favoráveis de pH, temperatura e umidade a esporulação ocorre em um a cinco dias, embora dados relativos à resistência ambiental dos oocisto de *N. caninum* sejam limitados, é provável que seja semelhante a de outros oocistos de coccídeos, permanecendo viáveis no solo por longo período (DUBEY et al., 2002; DUBEY e LINDSAY, 2006; MCALLISTER et al., 1998; GOODSWEN et al., 2013).

Na transmissão vertical de *N. caninum*, os taquizoítos atingem a placenta podendo causar 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 (DUBEY et al., 2017).

A transmissão transplacentária de *N. caninum* foi documentada em bovinos, ovelhas, cabras, cães, várias espécies de cervos, e induzida experimentalmente em bovinos, cães, ovelhas, cabras, macacos, porcos, gatos e camundongos (DUBEY et al., 2017).

A transmissão transplacentária (congênita) foi a primeira forma conhecida de transmissão do *T. gondii*. O feto é infectado usualmente por taquizoítas que cruzam a placenta, a partir da circulação materna durante a infecção primária, mas cistos teciduais dormentes de infecção passada podem reiniciar o ciclo de vida do parasito em fêmeas imunossuprimidas (DUBEY, 2010).

Comparado ao *T. gondii*, cujo ciclo de vida já está bem descrito e elucidado, alguns aspectos do ciclo biológico de *N. caninum* ainda não estão completamente descritos (DUBEY et al., 2017).

2.5 Patogenia e sinais clínicos

A manifestação clínica da toxoplasmose no homem, assim como em outros animais depende, principalmente, da resposta imune do hospedeiro infectado e da virulência do *T. gondii* (AMENDOEIRA; COSTA; SAPLDING, 1999). A infecção por *T. gondii* é, geralmente, leve e auto limitante em

indivíduos imunocompetentes, no entanto, o risco de infecção grave é elevado em grupos específicos, incluindo fetos infectados congenitamente e recém-nascidos, indivíduos imunologicamente prejudicados (por exemplo, aqueles com AIDS ou doença de Hodgkin) (DJURKOVIC-DJARKOVIC et al., 2013).

Em suínos os sinais da toxoplasmose são inespecíficos, a doença manifesta-se com um conjunto de sintomas caracterizados por: dispneia, anorexia, hipertermia, taquipneia, tosse, cianose, diarreia e até a morte (DUBEY, 2009). Além disso, existem os prejuízos causados pelos abortamentos, infertilidade, bem como a redução da produção dos animais infectados pela via congênita (ARAÚJO et al., 1996).

Em estudo de infecção experimental em fêmeas suínas prenhes com *N. caninum* foi observada hepatite necrotizante intralobular multifocal, útero com endometrite necrotizante granulomatosa e focal com uma necrose multifocal correspondente dos trofoblastos de dois fetos. Os fetos infectados via placenta, apresentaram encefalite necrotizante multifocal e hepatite, juntamente com miocardite, pneumonia, nefrite e hepatite não supurativas. Além disso, *N. caninum* foi re-isolado na cultura de células de um desses fetos. Um terceiro feto revelou apenas necroses disseminadas e localizadas no fígado. Pela Imuno-histoquímica, taquizoítos de *N. caninum* foram detectados em associação com alterações histopatológicas no fígado e endométrio das mães, no cérebro, fígado e alantocórion dos três fetos (JENSEN et al., 1998).

2.6 Epidemiologia

A toxoplasmose é, do ponto de vista epidemiológico, uma infecção de ampla distribuição geográfica, pois está presente em todo o planeta (DUBEY, 2009), com índices de soropositividade em suínos variando de zero (PEZERICO et al., 2007) à 67% (OLIVEIRA et al., 2014) (Tabela 1).

Tabela 1. Ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em suínos no Brasil e outros países.

País	Estado	N° amostras	Soropositivos%	Teste sorológico	Referência
Brasil	RJ	406	7,64%	RIFI*	Luciano et al., 2011
Brasil	MT	708	12,8%	RIFI	Muraro et al., 2010
Brasil	BA	465	18,27%	ELISA**	Bezerra et al., 2009
Brasil	AL	342	26,9%	RIFI	Valença et al., 2011
Brasil	MG/RJ	431	13,45%	RIFI	Almeida et al., 2015
Brasil	SP	500	0% e 48%	RIFI	Villalobos et al., 2011
Brasil	RO	80	43,7%	RIFI	Cavalcante et al., 2006
Brasil	RS	100	36,0%	RIFI	Cademartori et al., 2014
Brasil	RS	12	67,0%	RIFI	Oliveira et al., 2014
Brasil	PE	224	37,9%	RIFI	Samico Fernandes et al., 2017
Brasil	PE	327	9,78	RIFI	Samico Fernandes et al., 2011
Brasil	PB	130	36,2%	RIFI	Azevedo et al., 2010
Brasil	PB	190	19,5%	RIFI	Feitosa et al., 2014
Brasil	SP	550	20,18	MAD***	Oliveira et al., 2007
Brasil	RJ	38	65,8%	RIFI	Bonna et al., 2006
Brasil	MG/SP	262	0%	MAD	Pezerico et al., 2007
Brasil	PR	1.131	37,8%	RIFI	Vidotto et al., 1990
Brasil	RS	240	33,75%	RIFI	Fialho et al., 2003
Brasil	PR	408	25,5%	RIFI	Millar et al., 2008
Brasil	PA	110	50,0%	HAI****	Freitas et al., 2009
Brasil	PR	424	4%	RIFI	Carletti et al., 2005
Brasil	PE		54,12%	RIFI	Porto et al., 1999
Uruguai	-	600	70,0%	Sabin-Feldman	Freyre et al., 1991
China	Central	2277	29,6%	ELISA	Duo et al., 2012
Tailândia	-	14	71,43%	Latexaglut	Thiptara., 2006
Suíça	-	108	24,1%	IHQ*****	Basso et al., 2015
República Checa	-	551	36,0%	ELISA	Bàrtova et al., 2011
Itália	Sul	1.681	16,3%	ELISA	Villari et al., 2009
Portugal	Norte	254	9,8	MAD	Lopes et al., 2013

*RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

**ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

***MAD – Microaglutinação direta

****HAI – Hemaglutinação Indireta

*****IHQ - Imunohistoquímica

De acordo com os inquéritos soropidemiológicos, os seguintes fatores de risco foram considerados para a infecção por *T. gondii* em suínos: idade

(DUBEY et al., 1995; VILARI et al., 2009); contato com gatos (FEITOSA et al., 2014; DU et al., 2012); sistema de criação (FEITOSA et al., 2014; BEZERRA et al., 2009; CAVALCANTI et al., 2011; WEIGEL et al., 1999) sexo (BAMBA et al., 2017); e idade (DUBEY et al., 1995; ARKO-MANSAH et al., 2000).

Os gatos desempenham um papel central na epidemiologia da toxoplasmose, provavelmente a principal fonte de infecção, pois produzem grandes números de oocistos e sua resistência à destruição asseguram a contaminação ambiental por meses a anos (DUBEY, 2010).

A primeira descrição que envolve a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em suínos no Brasil, foi feita por Azevedo, et al., 2010 em 130 suínos criados em sistema de confinamento em Patos, Estado da Paraíba. Neste estudo, o autor encontrou uma prevalência de 3,1%. Posteriormente, na mesma região do Brasil, um estudo semelhante foi realizado por Feitosa et al., 2014 com 190 amostras de soro suíno chegando a prevalência também semelhante de 3,2%.

Pesquisas realizadas em todo o mundo mostraram que a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em suínos são baixas. Usando o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) como teste de triagem e uma técnica de Imunotransferência como teste confirmatório, um animal positivo foi detectado em 2041 amostras de soro suíno de Hesse, Alemanha (DAMRIYASA et al., 2004). Todas as 454 porcas reprodutoras que abortaram ou foram consideradas inférteis na Inglaterra e País de Gales foram negativas pela RIFI, sendo que 40 foram positivas no teste de ELISA (HELMICK et al., 2002). Na Suíça, observou-se soroprevalência de 3 e 0% em porcas e porcos de engorda,

respectivamente, por ELISA, no entanto, nenhum caso foi confirmado por Reação em cadeia da Polimerase (PCR) (WYSS et al., 2000) (Tabela 2).

Tabela 2. Ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em suínos no Brasil e outros países.

País	Região	Nº amostras	Soropositivos %	Teste sorológico	Referência
Brasil	Paraíba	130	3,1%	RIFI	Azevedo et al., 2010
Brasil	Paraíba	190	3,2%	RIFI	Feitosa et al., 2014
Reino Unido	Wales	454	0%	Elisa	Helminck et al., 2002
República Checa	-	551	3,0%	Elisa	Bártova et al., 2011
Alemanha	-	2.041	0,048%	Elisa	Damriyasa et al., 2004
Suíça			3%	Elisa	Wyss et al., 2000

2.7 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial de *T. gondii* e *N. caninum* baseia-se em testes citológicos, detecção de anticorpos específicos em animais, histopatológico, imuno-histoquímica, molecular e isolamento (DUBEY et al., 2007; 2017).

Os testes sorológicos são importantes ferramentas e tem a vantagem de poderem ser aplicados antemortem, podendo fornecer informações sobre o estágio da infecção, sendo mais comumente utilizados na detecção de anticorpos IgG. Diversos testes podem ser empregados, incluindo a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio Imunoenzimático (ELISA), teste de aglutinação (NAT) e Immunoblots (DUBEY e SCHARES, 2006; DUBEY et al., 2007; 2017).

A RIFI foi o primeiro teste sorológico utilizado, sendo a prova de referência para pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum*, considerada como padrão ouro (DUBEY et al., 1988b; BJORKMAN e UGGLA, 1999).

A RIFI é amplamente utilizada para o diagnóstico de toxoplasmose em humanos e animais (CAMARGO, 1964). O antígeno utilizado é constituído por taquizoítas intactos, formalizados e fixados em lâminas, que revela uma fluorescência periférica e brilhante após a incubação com amostras de soros (anticorpo primário) e anticorpos secundários espécie-específicos marcados com fluorocromos (conjugado fluorescentes). A fluorescência somente na extremidade apical é considerada com reação não-específica devido às reações cruzadas com outros parasitos do filo Apicomplexa (DUBEY et al., 2007).

O teste de Sabin-Feldman foi o primeiro teste a ser utilizado para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, embora apresentasse boa reprodutibilidade e alta sensibilidade, alguns inconvenientes de execução o tornaram pouco utilizado, como necessidade de parasitos vivos e soro fresco. Contudo, este teste ainda é empregado em como teste sorológico, principalmente, em animais silvestres, pois não necessita de anticorpos secundários ou conjugados espécie-específicos (AMENDOEIRA et al., 1999).

Testes de aglutinação foram desenvolvidos para o diagnóstico sorológico de toxoplasmose e neosporose, têm sido largamente utilizados em animais silvestre por não necessitarem de anticorpos secundário e espécie-específicos, como teste de aglutinação direta (DAT), teste de aglutinação direta modificada

(MAT) e o teste de hemaglutinação indireta (IHAT) (DUBEY e SCHARES, 2006; DUBEY et al., 1998).

O teste de ELISA é bastante utilizado em sorologias para vários agentes infecciosos, entre eles *T. gondii* e *N. caninum* e baseia-se na reação de soros testes com antígenos sensibilizados em microplacas, sendo a reação antígeno-anticorpo visualizada pela adição de uma enzima secundária. A reação pode ser avaliada objetivamente pela quantificação da cor. É um teste de baixo custo que permite testar grande número de amostras (DUBEY, 2010; DUBEY et al., 2017).

O exame histopatológico é, comumente, utilizado para o diagnóstico de *T.gondii* e *N. caninum* em fetos abortados, sendo que as amostras a serem remetidas são pulmão, cérebro e musculatura esquelética, e apresentam um papel importante no aumento da probabilidade de diagnosticar a infecção (DUBEY e LINDSAY, 2006; DUBEY, 2003).

Durante as últimas décadas os métodos moleculares têm sido utilizados para detecção e a identificação do parasito ou do seu ácido nucleico nas amostras teciduais, como cérebro ou placenta (DUBEY,2008). Na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), um fragmento específico do genoma do parasito é amplificado e o produto da amplificação é visualizado em gel de agarose ou de poliacrilamida após coloração específica ou diretamente através de PCR em Tempo Real (*real time* PCR). A sensibilidade e a especificidade são geralmente altas, mas dependem de vários fatores, tais como as técnicas para a extração do material genético das amostras, as condições de manipulação e armazenamento das amostras, as características da sequência de DNA

escolhidas para amplificação e os parâmetros da reação de amplificação (SWITAJ et al., 2005). A principal vantagem da PCR é a rapidez na obtenção dos resultados, principalmente, para a PCR em tempo real (< 4horas), mas como desvantagem protocolos específicos precisam ser estabelecidos em cada laboratório ajustado aos reagentes e equipamentos disponíveis (DUBEY et al., 2017).

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* e *T. gondii* de tecidos animais (DUBEY et al., 1988; DUBEY et al., 2017). Bioensaios, geralmente, utilizam camundongos (*Mus musculus*) para detecção de *T. gondii* e gerbil (*Meriones unguiculatus*) para *N. caninum*. 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).

2.8 Controle

A toxoplasmose em suínos requer adoção de medidas a ser realizada em quatro níveis: propriedades, abate, pós abate e a nível de consumidores (BERARDINIS et al., 2017).

Nas propriedades, as estratégias adequadas para prevenir a infecção de suínos devem incluir um plano de controle de roedores, restrição do acesso a gatos, água e alimentos para os suínos protegidos do acesso de outros animais

e insetos. Implantação de um manejo correto, tecnologias modernas de produção de suínos mostraram uma acentuada diminuição da infecção por *T. gondii*, no entanto, a demanda pública em alimentos de origem animal com base em criações orgânica (campo livre) pode levar a um aumento na prevalência de *T. gondii* (KIJLSTRA e JONGER, 2008; VILLARI et al., 2009).

Em relação ao abate, como as inspeções *pós mortem* são incapazes de garantir a ausência de cistos em carcaças de suínos, portanto, se fazem necessários o uso de testes laboratoriais sorológico ou molecular para diagnóstico, seguido de um tratamento de congelamento dessas carcaças de animais positivos para *T. gondii* como melhor opção, embora os detalhes deste procedimento precisem ser validados. Após o abate, a última frente é a prevenção a nível de consumidor individual, que depende de cozimento suficiente da carne (KIJLSTRA e JONGER, 2008; DJURKOVIC-DJAKOVIC et al., 2013; BELLUCO et al., 2016). Novas técnicas alternativas não podem ser consideradas tratamento de inativação de *T. gondii*, devido à falta de informações sobre a eficácia tais como: fermentação, secagem, utilização de especiarias e ácidos orgânicos (BERARDINIS et al., 2017).

A imunização é um método eficaz para prevenir a infecção por *T. gondii* e a formação de cistos nos tecidos em animais e humanos. Lu et al. (2009) sustenta que a imunização com organismos vivos inteiros e atenuados de mutações não reversíveis induz resposta imune potente, associados ao controle de toxoplasmose. Na atualidade, a única vacina disponível contra toxoplasmose é uma vacina viva atenuada estirpe S48, licenciado para uso em ovinos na Europa e Nova Zelândia (BERARDINIS et al., 2017), que mantém a imunidade por dezoito meses (BUXTON, 1993), mas o uso de vacina viva

aumenta a preocupação de segurança para uso em animais de produção de carne, uma vez que esta vacina poderia reverter para um tipo selvagem, podendo causar a formação de cistos nos tecidos (BERARDINIS et al., 2017).

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 infecção por *N. caninum* ou abortos em bovinos (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, 2002; REICHEL et al., 2014).

A ingestão de oocistos é o único modo demonstrado para transmissão pós-natal (horizontal) em herbívoros. Portanto, os oocistos são a chave na epidemiologia da neosporose. Embora os dados relativos de resistência ambiental dos oocistos de *N. caninum* são limitados, é provável que seja semelhante a outros oocistos coccidianos (DUBEY et al., 2017).

O *N. caninum* geralmente parasita o hospedeiro, tanto definitivo quanto intermediário, sem produzir sinais clínicos e raramente, causa manifestações clínicas graves. As infecções naturais são, provavelmente, adquiridas pela

ingestão de cistos teciduais em carne infectada ou oocistos de alimentos e água contaminados com fezes de cachorro (DUBEY et al, 2017).

3 OBJETIVO

Realizar o estudo epidemiológico da toxoplasmose e neosporose suína, por meio da prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum*, determinação dos fatores de risco em propriedades rurais de subsistência do Estado de Mato Grosso, assim como, da distribuição espacial dos animais sororreagentes e propriedades com pelo menos um animal sororreagentes

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de Estudo

O Estado de Mato Grosso está localizado na região Centro Oeste, ocupa uma área de 903.366,192 km² do território brasileiro e localiza-se a oeste do Meridiano de Greenwich e a sul da Linha do Equador, fazendo divisas com os Estados de Mato Grosso do Sul, Goiás, Pará, Amazonas, Rondônia e Tocantins, além de fronteira com a Bolívia (Figura 4).

O Estado apresenta clima tropical úmido, com elevada temperatura média anual, superior a 24°C e alta pluviosidade (2.000 mm anuais). O relevo apresenta grandes superfícies aplainadas, talhadas em rochas sedimentares, enquanto que a vegetação do estado de Mato Grosso se caracteriza por uma área de pantanal ao sul, vegetação de cerrado na região mais central e,

prosseguimento, de floresta amazônica ao norte do Estado (MATO GROSSO, 2011).



Figura 4. Mapa do Estado de Mato Grosso, divisas de Estados e Bolívia.
Fonte: Secretaria de Estado de Meio Ambiente. Superintendência de Biodiversidade. Coordenadoria de Ecossistemas. Mapa do Estado de Mato Grosso. Cuiabá, 2011

4.2 Amostragem

A amostragem foi realizada em duas etapas. A primeira envolveu a seleção aleatória de um número pré-determinado de criatórios (unidade primária de amostragem), objetivando detectar se a infecção ocorre na zona alvo. Posteriormente, foi selecionado um número pré-determinado de suínos com idade superior a oito meses (unidade secundária de amostragem).

O sorteio aleatório foi realizado na propriedade pelo médico veterinário oficial responsável pela colheita de material, levando em consideração o número total de suínos com idade superior a oito meses, conforme descrito

abaixo. Para calcular o tamanho da amostra de propriedades, considerou-se a expressão algébrica utilizada na estimação de proporções $n = [Np(1-p)] / (N-1)(d/Za/2)^2 + p(1-p)$. *deff.*, onde N é o tamanho da população suína (2.613.925 milhões de suíno), p é a prevalência estimada, d é a margem de erro ou erro máximo da estimativa, z é um valor tabulado da distribuição normal e *deff* é o efeito do desenho amostral. Considerando a prevalência absoluta de 50% para anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum*, erro máximo da estimativa de 5%, Intervalo de confiança (IC) de 95%, e efeito do desenho (*deff*) de 1,2.

Recomendou-se que fossem selecionados criatórios distribuídos geograficamente no município, evitando estabelecimentos vizinhos. Não devendo ser escolhidos criatórios em uma mesma unidade epidemiológica. De acordo com a OIE, unidade epidemiológica designa um grupo de animais com determinada relação epidemiológica e, aproximadamente, a mesma probabilidade de exposição a um agente patogênico, seja porque compartilham o mesmo espaço (currais ou propriedades comunitárias, por exemplo), ou porque pertencem a uma mesma exploração.

Um total de 1070 amostras de soro de suínos de 320 propriedades rurais (Figura 5), criados para consumo próprio, em explorações de subsistência familiar, sem característica industrial, foram coletados de setembro a dezembro de 2014 pelo Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso (INDEA-MT) em todo o Estado de Mato Grosso, sendo uma alíquota de soro disponibilizada para a realização do presente estudo.

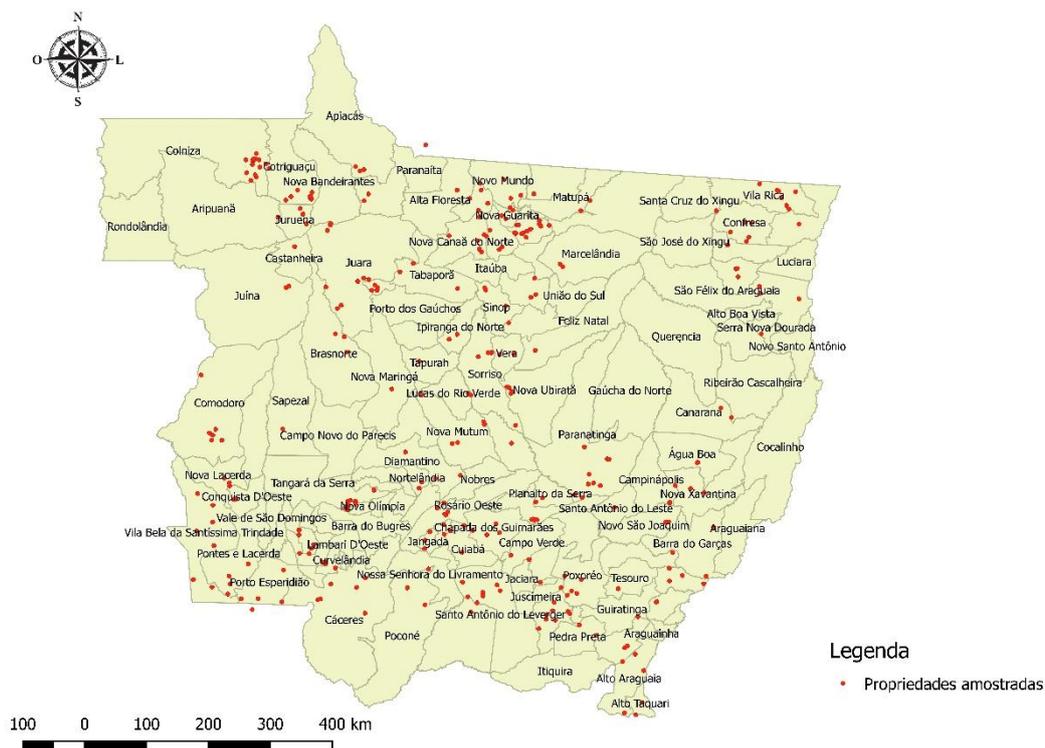


Figura 5: Mapa de propriedades amostradas no Estado de Mato Grosso nos criatórios selecionados pelo INDEA/MT, durante o período de setembro a dezembro de 2014 (INDEA, 2014).

Para a amostragem dos animais, em cada criatório selecionado, foram considerados apenas animais adultos (≥ 8 meses de idade) ou que já estiveram em fase reprodutiva. A amostragem dos animais foi realizada de acordo com a tabela 3.

Tabela 3: Amostragem de suínos adultos (≥ 8 meses de idade) nos criatórios selecionados pelo INDEA/MT, durante o período de setembro a dezembro de 2014, no Estado de Mato Grosso.

Nº de suínos adultos	Nº de suínos adultos a serem amostrados
Até 15	Total existente
16 a 20	15
21 a 30	20
31 a 50	23
51 a 80	26
Mais de 80	30

4.3 Coleta de soro e informações epidemiológicas

As 1070 amostras de soro suíno analisadas foram disponibilizadas pelo Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso (INDEA/MT) e provenientes de um estudo prévio intitulado: “Inquérito soroepidemiológico em criatório de suídeos no Estado de Mato Grosso” (Peste suína Clássica), realizado no período de setembro a dezembro de 2014.

As amostras de sangue dos suínos selecionados foram colhidas por meio de punção da veia jugular, utilizando um conjunto (agulha, seringa e tubo à vácuo previamente identificado) para cada animal. Os soros obtidos foram identificados e armazenados a -20°C até o momento das análises sorológicas. Durante a coleta foi preenchido um questionário epidemiológico para cada propriedade, conforme anexo A.

4.4 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Os soros foram submetidos à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), para se verificar a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* (CAMARGO, 1964). Taquizoítos de *T. gondii* mantidos em cultura de células VERO foram utilizados como antígenos na RIFI. Os soros dos suínos foram diluídos a 1:64 em tampão fosfato pH 7,2 (0,0084M Na_2HPO_4 , 0,0018M NaH_2PO_4 e 0,147M NaCl), sendo em seguida distribuídos 20 μl por orifício em lâminas contendo o antígeno específico fixado. Após 30 minutos de incubação em estufa a 37°C , as lâminas foram lavadas com solução tampão fosfato pH 7,2 (0,0084M

Na₂HPO₄, 0,0018M NaH₂PO₄ e 0,147M NaCl) por três vezes e, em seguida, incubadas com conjugado IgG de coelho, anti-IgG de suíno (diluição de 1:100), marcado com isotiocianato de fluoresceína. As lâminas foram novamente incubadas por 30 minutos a 37°C e lavadas 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 reações foram consideradas positivas, quando os taquizoítos apresentarem fluorescência periférica total. Reações com fluorescência parcial ou apical foram interpretadas como negativas. As amostras dos soros consideradas positivas na diluição inicial (1:64) foram, sucessivamente, diluídas, na razão dois, para obtenção do título final. Em cada série foram incluídos soros controles positivo e negativo. Após a realização das análises laboratoriais, foi realizada a análise estatística para apresentação dos dados e a análise espacial da ocorrência de *T. gondii*.

As mesmas amostras de soros suínos foram analisadas, também pela RIFI buscando detectar a presença de anticorpos anti-*N. caninum*, conforme descrito por Dubey et al. (1988). Taquizoítos de *N. caninum* mantidos em cultura de células VERO foram utilizados como antígenos na RIFI, assim como conjugado anti-IgG de suíno na diluição de 1:1100.

Os soros dos suínos foram diluídos a 1:50 em tampão fosfato pH 7,2 (0,0084M Na₂HPO₄, 0,0018M NaH₂PO₄ e 0,147M NaCl) acrescentando soroalbumina bovina, sendo em seguida distribuídos 10 µl por orifício em lâminas contendo o antígeno específico fixado. Após 30 minutos de incubação

em estufa a 37 °C, 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 lâminas secas, foi acrescentado em cada poço, o conjugado IgG de coelho anti-IgG suíno marcado com isotiocianato de fluoresceína e Azul de Evans (5 µl). As lâminas foram novamente incubadas por 30 minutos a 37 °C 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 1:50. Reações com fluorescência parcial ou apical foram interpretadas como negativas. Em todas as séries, incluiu-se em cada lâmina soros controles, sabidamente positivo e negativo para *N. caninum*. Em cada série foram incluídos soros testemunhas de títulos positivo e negativo, previamente conhecidos.

4.5 Prevalência, análise estatística e análise espacial

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). Com intuito de corrigir o efeito da seleção de animais, a seguinte expressão foi utilizada para determinar o peso de cada animal: número total de suínos com mais de 8 meses / total de suínos com mais de 8 meses de idade

amostrado X total de suínos com mais de 8 meses de idade na propriedade) / total de suínos com mais de 8 meses de idade na propriedade amostrado.

Para análise de propriedades foi considerado que a mesma seria positiva, se houvesse pelo menos um animal positivo. Assim, foi construído um modelo de regressão logística múltipla seguindo uma série de etapas: I. Para as variáveis contínuas foi realizado um teste de linearidade, por meio do gráfico de Log-Odds. Quando a avaliação visual indicou uma tendência não linear, a variável contínua foi categorizada; II. Para as variáveis categóricas foi realizada um teste de Qui-quadrado ou exato de Fisher, entre o resultado e as várias variáveis preditoras, e todas as variáveis com um valor de $p < 0,20$ foram incorporadas ao modelo. III. As variáveis selecionadas foram testadas quanto à colinearidade, incluindo a análise de multicolinearidade para assegurar um fator de inflação de variância média (VIF) < 10 antes de ser utilizado nos modelos; IV. O modelo foi construído inserindo todas as variáveis selecionadas nas etapas anteriores, sendo que as variáveis menos significativas (de acordo com a estatística de Wald) foram removidas e a análise de regressão logística foi repetida. Este processo foi repetido, o modelo ajustado comparado com o anterior por meio do teste de razão de verossimilhança, para verificar o confundimento. Nos casos em que houve uma alteração nas estimativas dos parâmetros de mais de 30% a variável removida foi considerada um fator de confundimento e, novamente, incluída no modelo

As variáveis que obtiveram valor de $p < 0,20$, 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). As variáveis analisadas encontram-se listadas na Tabela 4.

Tabela 4. Variáveis qualitativas analisadas nos testes de associações como potenciais fatores de risco para propriedades positivas para anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* em propriedades de subsistência do Estado de Mato Grosso, 2014.

Variáveis
Propriedade em área rural ou próximo de reservas indígenas (sim ou não)
Propriedades em áreas peri-urbana ou comunidades carentes (sim ou não)
Suínos criados extensivamente (sim ou não)
Fornecimento de resíduos alimentares (sim ou não)
Presença do gato na propriedade (sim ou não)
Propriedade próxima de lixões (sim ou não)
Cria ou engorda (sim ou não)
Propriedade próxima de reservas ambientais (sim ou não)
Abate na propriedade (sim ou não)

Para análise individual o modelo de regressão logística foi construído seguindo os mesmos passos da análise de propriedades. As variáveis analisadas por animais encontram-se listadas na Tabela 5.

Tabela 5. Variáveis qualitativas analisadas nos testes de associações como potenciais fatores de risco para suínos positivos (≥ 8 meses) para anticorpos anti- *T. gondii* e anti-*N. caninum* em propriedades de subsistência do Estado de Mato Grosso, 2014.

Variáveis
Sexo (M ou F)
Fornecimento de resíduos alimentares (sim ou não)
Presença de gatos/cães (sim ou não)
Propriedade próxima de lixões (sim ou não)

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 a 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 23108.128787/2016-46.

5 RESULTADOS

5.1 *Toxoplasma gondii*

Anticorpos anti-*T. gondii* foram detectados em pelo menos um suíno em 178 das 320 propriedades amostradas (Figura 6), obtendo-se assim uma soroprevalência de rebanho de 55,62% (IC 95%; 50,18%; 61,07%).

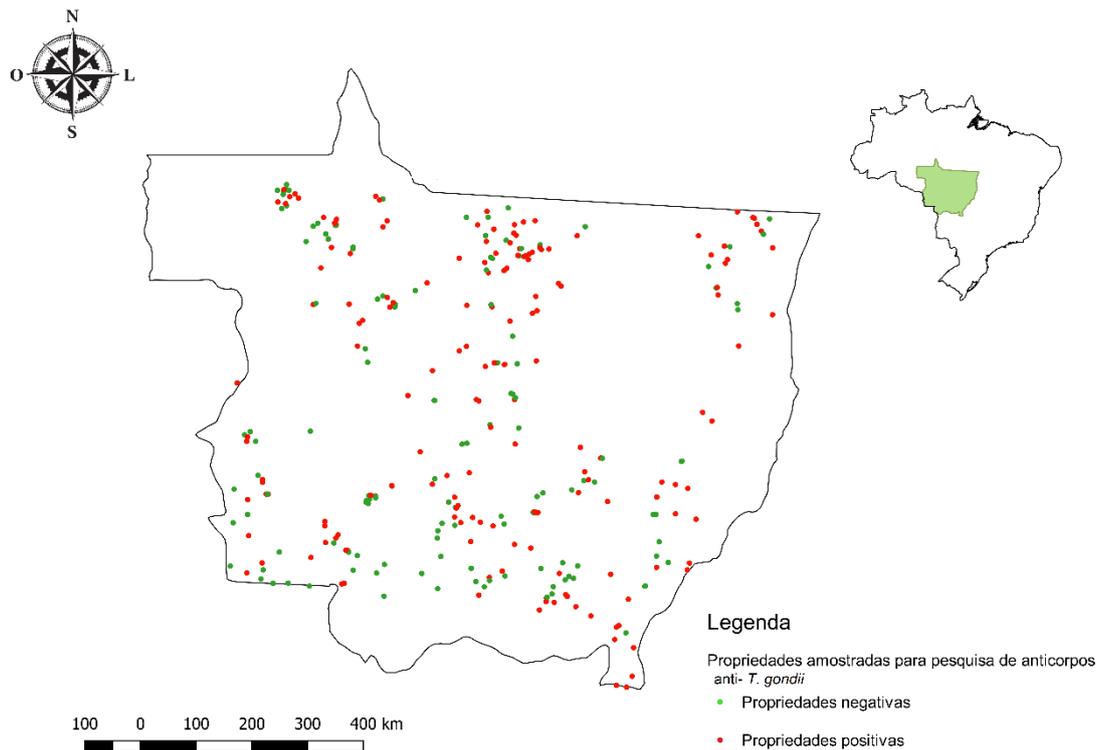


Figura 6. Distribuição das propriedades rurais amostradas, segundo resultado da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* em suínos (≥ 8 meses) no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.

Foram positivos 345 dos 1070 suínos avaliados neste estudo. A prevalência na população de anticorpos anti-*T. gondii* foi de 32,4% (IC 95%; 28,49%; 36,46%) com títulos variando de 64 a 8.192 (Tabela 6).

Tabela 6: Total de animais positivos para anticorpos anti-*T. gondii*, de acordo com os títulos apresentados pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) no Estado de Mato Grosso.

Títulos	Número de suínos positivos (percentual)
64	82 (23,76%)
128	114 (32,85%)
256	79 (22,89%)
512	45 (13,04%)
1.024	8 (2,3%)
2.048	9 (2,6%)
4.096	7 (2,02%)
8.192	3 (0,86%)
Total	345 (100,00%)

No teste de Qui-quadrado 4 variáveis foram selecionadas (Tabela 7), posteriormente, na análise multivariada, após a aplicação do modelo, nenhuma variável foi significativamente associada à prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* nas propriedades. As variáveis “Fornecimento de resíduos alimentares aos suínos” e “cria/engorda” nos seus respectivos intervalos de confiança inclui o número 1, portanto, não possuem significância estatística (tabela 8).

Tabela 7. Resultados do teste Qui-Quadrado dos possíveis fatores de risco para propriedades positivas para anticorpos anti-*T. gondii* em suínos de propriedade de subsistência do Estado de Mato Grosso, 2014.

Variável	Total de propriedades	Propriedades positivas	Valor de p
Propriedade em assentam rural ou reserva indígena			
Não	141	85	0,14
Sim	179	96	
Área periurbana ou comunidade carente			
Não	274	151	0,65
Sim	46	27	
Áreas com suínos criados extensivamente			
Não	240	136	0,52
Sim	80	42	
Fornecimento de resíduos alimentares			
Não	117	120	0,12
Sim	203	58	
Proximidade de lixões			
Não	310	172	0,52
Sim	10	6	
Proximidade de reservas naturais			
Não	191	108	0,69
Sim	129	70	

Presença de gatos			
Não	228	128	0,77
Sim	92	50	
Cria/engorda			
Não	309	175	0.066
Sim	11	3	
Abate na propriedade			
Não	292	166	0,16
Sim	28	12	

Tabela 8. Resultado do modelo de regressão logística para os fatores de risco associados com a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em suínos (≥ 8 meses) de 320 propriedades em Mato Grosso durante setembro a dezembro de 2014.

Variáveis	Estimativa	Valor-p	OR	IC 95%	
Fornecimento de resíduos aos suínos	0,3598	0,12	1,4330	0,9037	2,2755
Cria/engorda	-1,1898	0,08	0,3043	0,0654	1,0819

Quanto à análise individual, a variável “Fornecimento de resíduos aos suínos” mostrou-se, significativamente, associada com a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* nos animais (Tabela 9).

Tabela 9. Resultado do modelo de regressão logística para os fatores de risco associados com a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em 1070 suínos (≥ 8 meses) do Estado de Mato Grosso durante setembro a dezembro de 2014.

Variáveis	Estimativa	Valor-p	OR	IC 95%	
Idade	0,0028	0,0767	1,0028	0,9997	1,0060
Fornecimento de resíduos aos suínos	0,0943	0,0193	1,0989	1,0159	1,1888
Proximidade com lixões	-0,1072	0,1691	0,8984	0,7713	1,0463

Na análise espacial, observou-se que o risco da presença de anticorpos anti-*T.gondii* varia de 0 a 2,2 na área estudada, e que a distribuição espacial do risco relativo pode ser considerada não constante no espaço (valor $p=0,15$), conforme Figura 7.

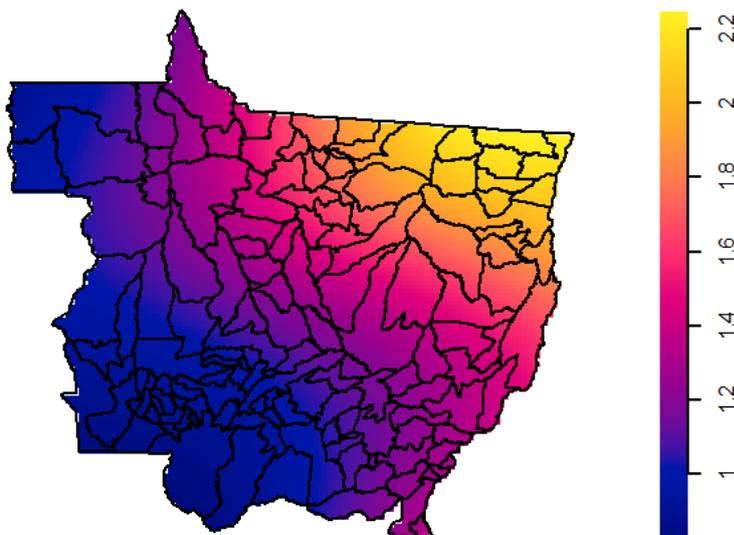


Figura 7. Estimador Kernel do risco relativo da toxoplasmose suína no estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.

Na Figura 8 é apresentada a distribuição espacial das propriedades negativas obtida por meio do estimador kernel, em que se verifica uma variação de 0 a 2,5 propriedade negativas, e que a maior concentração se encontra ao sul do Estado de Mato Grosso.

Negativos

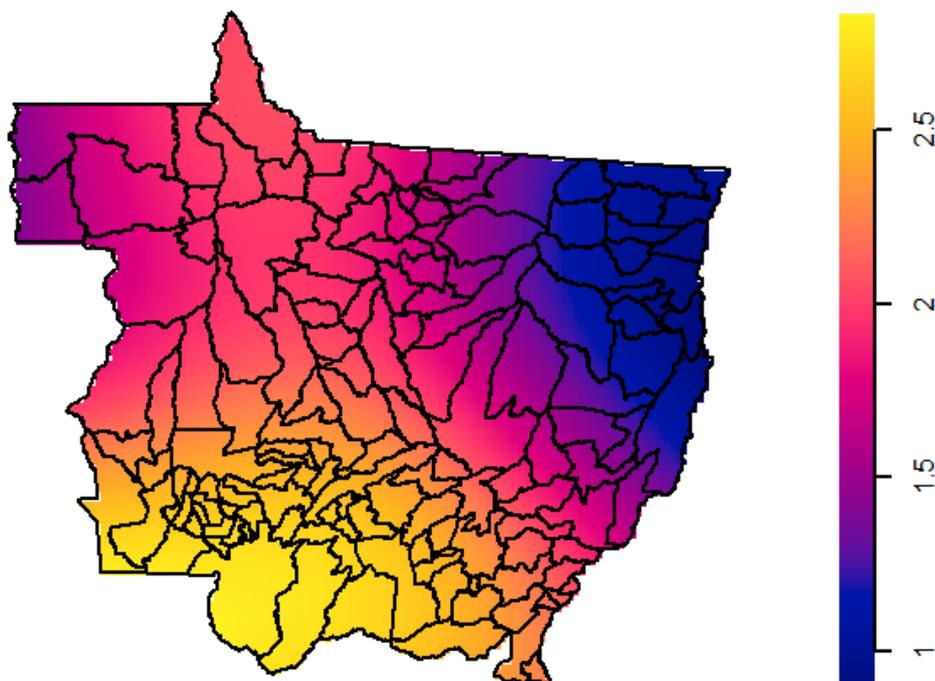


Figura 8. Estimador Kernel da densidade de propriedades negativas na pesquisa a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* em suínos (≥ 8 meses) em propriedades de subsistência no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.

Na Figura 9 é apresentada a distribuição espacial das propriedades positivas obtida por meio do estimador kernel, onde se observa uma variação de 0 a 3 propriedade positivas, sendo que a maior concentração se encontra ao Norte e Sudoeste do Estado de Mato Grosso.

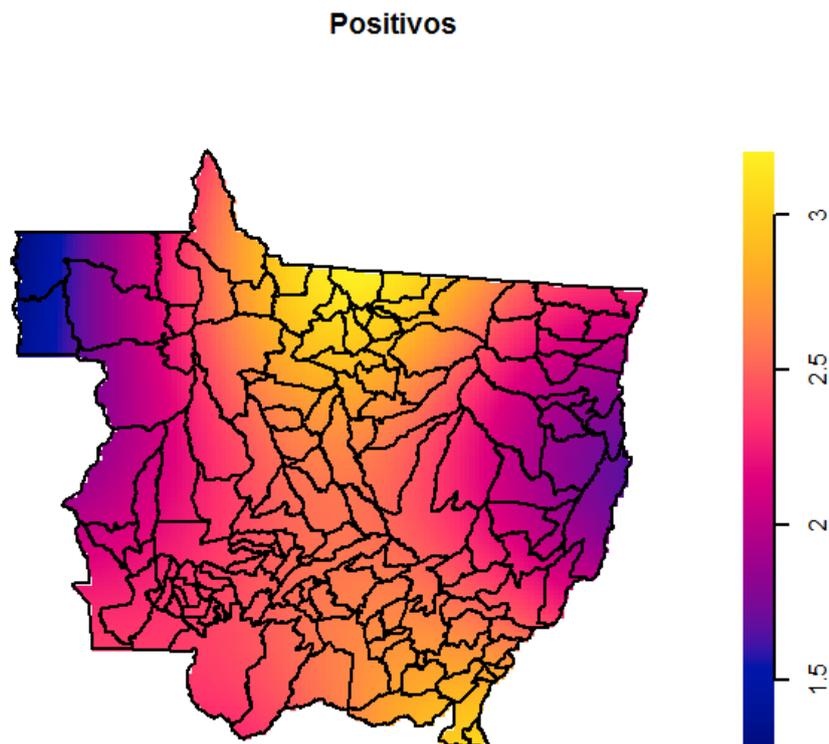


Figura 9. Estimador Kernel da densidade de propriedades positivas na pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* em suínos (8 meses) de propriedades de subsistência no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.

A função de correlação marcada da distribuição espacial das propriedades e a sua positividade verificou que não há relação entre a localização da propriedade e a prevalência, pois não existem pontos fora do intervalo de confiança, indicando que a prevalência da propriedade não está relacionada a sua localização (Figura 10).

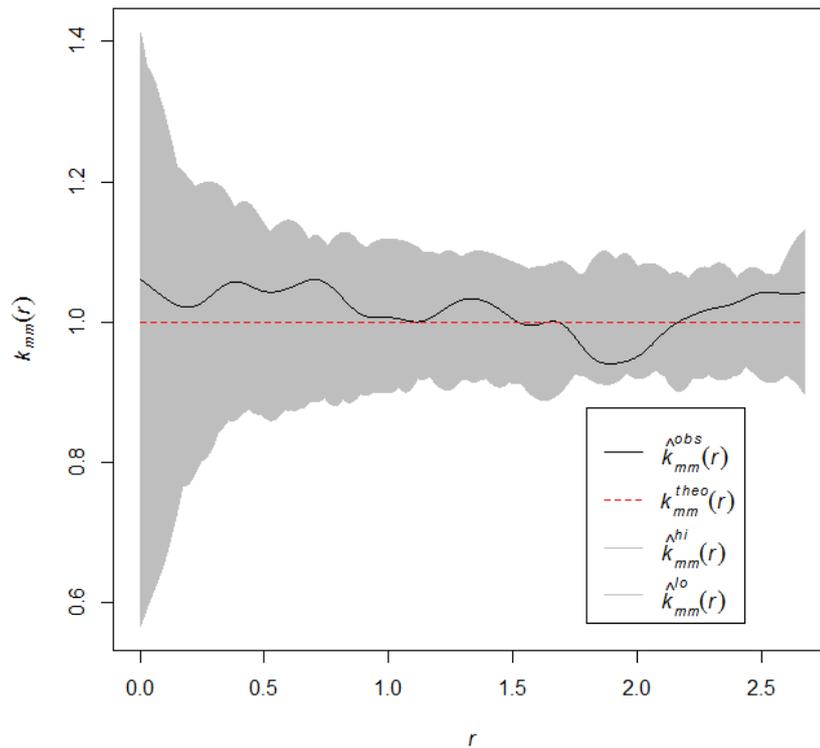


Figura 10. Função de correlação marcada da distribuição espacial das propriedades positivas e negativas na pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* em suínos (≥ 8 meses) de propriedades de subsistência no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.

Na Figura 11 é apresentada a distribuição espacial das prevalências intra-rebanho de *T. gondii* nas propriedades amostradas no Estado de Mato Grosso, onde observa-se uma variação na prevalência entre 0 a 1.

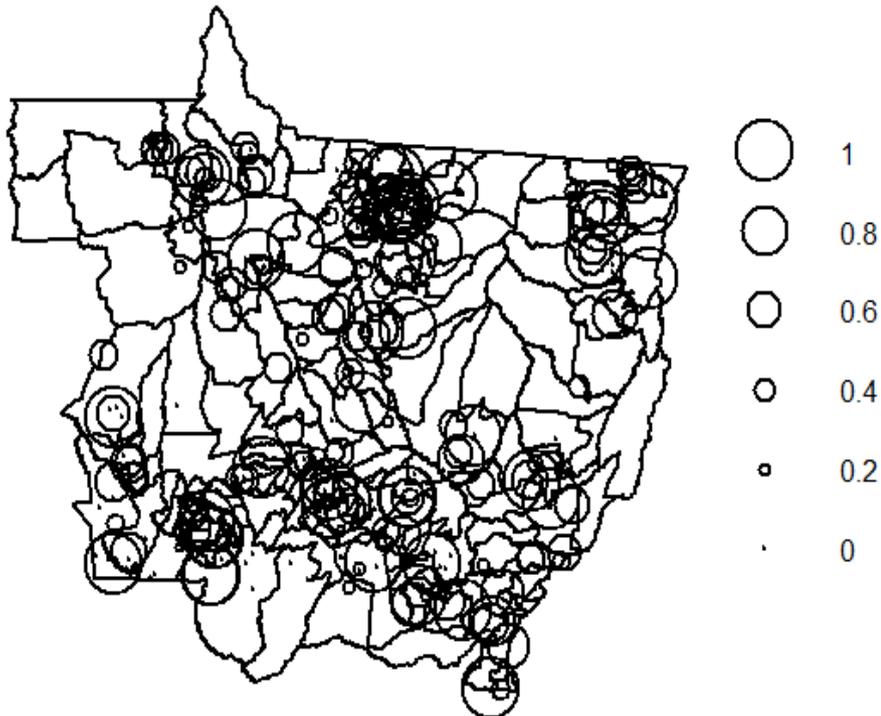


Figura 11. Distribuição espacial das prevalências intra-rebanho das propriedades positivas na pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* em suínos (8 meses) de propriedades de subsistência no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.

Na Figura 12 é apresentada a distribuição espacial das prevalências das propriedades obtida, por meio do estimador kernel, em que se verifica uma variação de prevalência 0 a 0,6 e que as maiores prevalências intra-rebanho estão localizadas a leste do Estado de Mato Grosso.

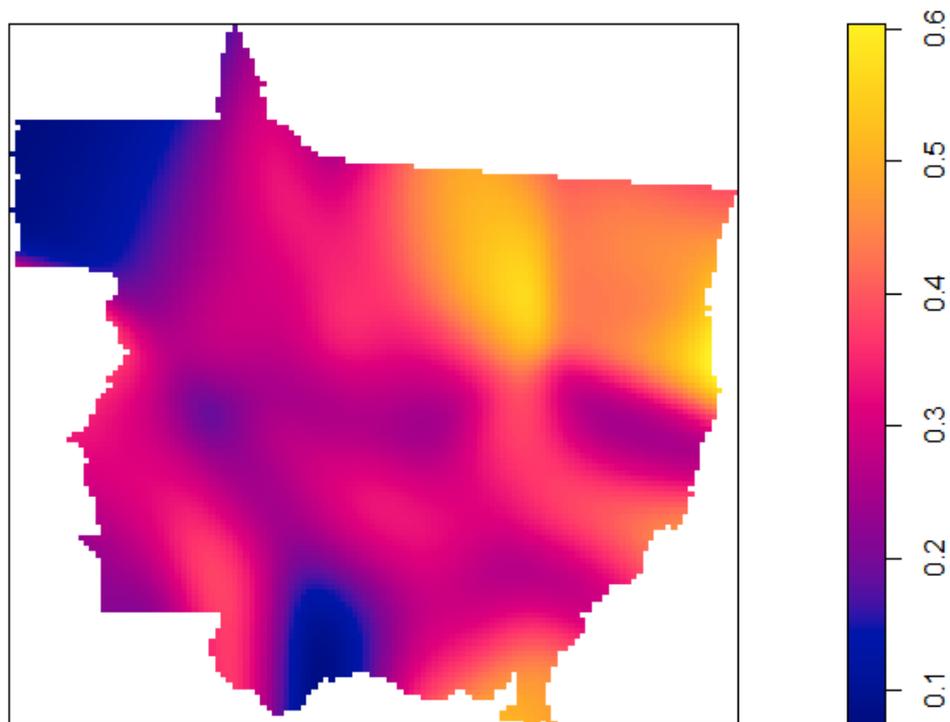


Figura 12. Estimador Kernel da prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em suínos (≥ 8 meses) de propriedades de subsistência no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.

Na Figura 13 é apresentada a função de correlação marcada da distribuição espacial das propriedades para a prevalência de animais positivos para anticorpos anti-*T. gondii*. Observa-se que não há relação entre a localização da propriedade e a prevalência, pois não existem pontos fora do intervalo de confiança, sugerindo que a prevalência intra-rebanho não está relacionada com a localização da propriedade.

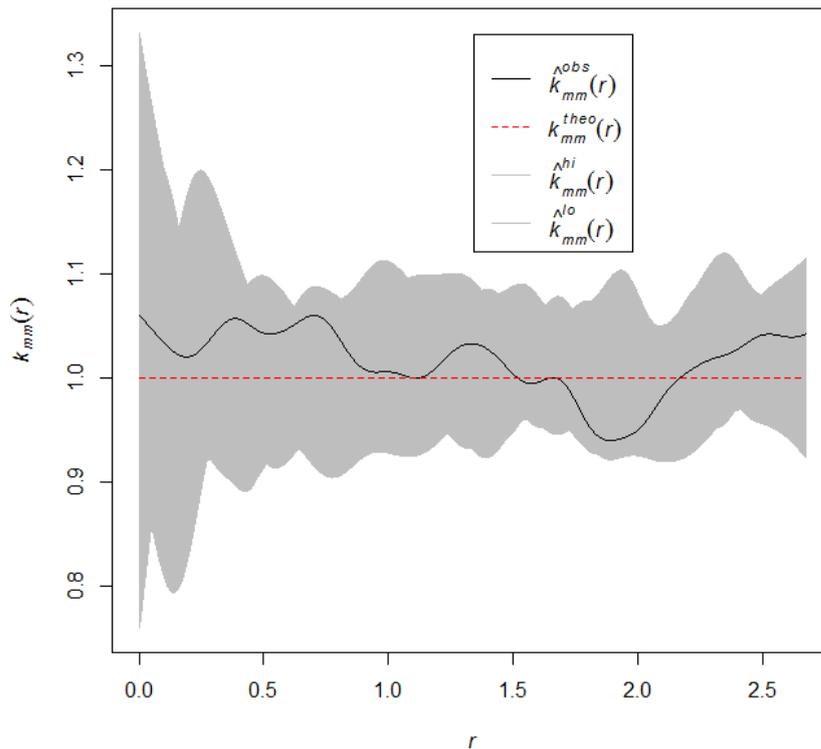


Figura 13. Função de correlação marcada da distribuição espacial das propriedades positivas na pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* em suínos acima de 8 meses de propriedades de subsistência no estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.

5.2. *Neospora caninum*

Anticorpos anti-*N. caninum* foram detectados em pelo menos um suíno em 89 das 320 propriedades amostradas (Figura 14), obtendo-se assim uma soroprevalência de rebanho de 27,81% (IC 95%; 22,9%32,72%).

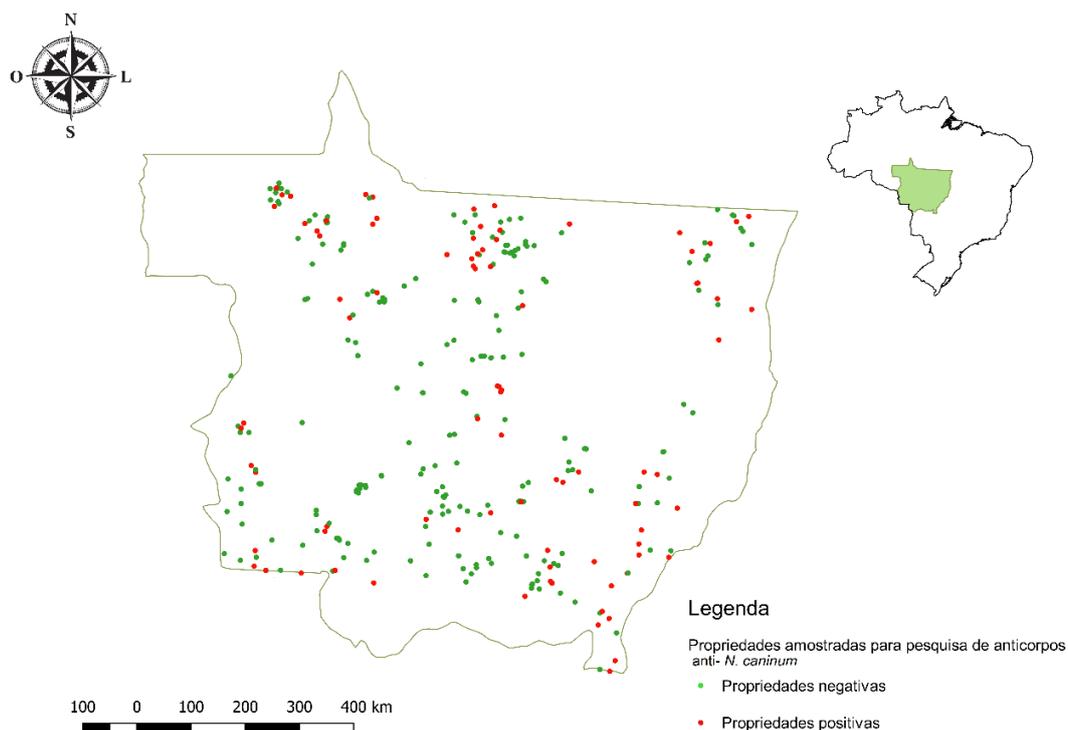


Figura 14. Distribuição das propriedades rurais amostradas, segundo resultado da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), para pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* em suínos (≥ 8 meses) no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.

Foram positivos 144 dos 1070 suínos avaliados neste estudo. A prevalência animal de anticorpos anti-*N. caninum* foi de 13,49% (IC 95%; 10,89%; 16,02%) e os títulos observados variaram de 50 a 6400 (Tabela 10).

Tabela 10: Total de suínos positivos para anticorpos anti-*Neospora caninum*, de acordo com os títulos apresentados pela reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) no Estado de Mato Grosso, 2014.

Títulos	Número de suínos positivos (percentual)
50	65 (45,13%)
100	47 (32,63%)
200	16 (11,11%)
400	11 (7,63%)
800	1 (0,69%)
1600	3 (2,08)
3200	0 (0%)
6400	1 (0,69%)
Total	144 (100%)

Na estimativa para o modelo de regressão logística, quatro variáveis foram selecionadas pelo teste de Qui-Quadrado, posteriormente, na análise multivariada, após aplicação do modelo, uma variável mostrou-se significativamente associada à soroprevalência de anticorpos anti-*N. caninum* nas propriedades: fornecimento de resíduos alimentares. As demais variáveis: propriedade em área rural, proximidade de lixões, e proximidade com reserva natural, como os seus respectivos intervalos de confiança incluem o 1, não possuem significância estatística (Tabela 11).

Tabela 11. Resultados do teste Qui-quadrado das possíveis associações para propriedades positivas para anticorpos anti-*N. caninum* em suínos de propriedade de subsistência do Estado de Mato Grosso, 2014.

Variável	Total de propriedades	Número de propriedades positivas a pesquisa de <i>N. caninum</i>	Valor de p
Propriedades em assentam rural ou reserva indígena			
Não	141	48	0,037
Sim	179	41	
Área periurbana ou comunidade carente			
Não	274	74	0,544
Sim	46	15	
Áreas com suínos criados extensivamente			
Não	240	60	0,071
Sim	80	29	
Fornecimento de resíduos alimentares			
Não	117	45	0,001
Sim	203	44	
Proximidade de lixões			
Não	310	83	0,51
Sim	10	6	

Proximidade de reservas naturais			
Não	191	46	0,092
Sim	129	43	
Presença de cão			
Não	97	30	0,493
Sim	223	59	
Cria/engorda			
Não	309	85	0,506
Sim	11	4	
Abate na propriedade			
Não	292	82	0,898
Sim	28	7	

Tabela 12: Resultado do modelo de regressão logística para os fatores de risco associados com a prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em suínos nas 320 propriedades amostradas no Estado de Mato Grosso.

Variáveis	Estimativa	Valor-p	OR	IC 95%	
Assentamento rural ou reserva indígena	-0,0337	0,0888	0,6187	0,3671	1,0401
Fornecimento de resíduos alimentares aos suínos	0,0029	0,0082	0,6187	0,2687	0,7505
Proximidade de lixão	0,0424	0,2055	3,2490	0,8368	13,9011
Próximo de reserva natural	-0,0559	0,0339	1,6636	0,9931	2,7926

Quanto à análise individual, duas variáveis foram estatisticamente significativas, a variável “idade” foi positivamente associada (fator de risco) e a variável “Fornecimento de resíduos alimentares (lavagem) aos suínos” foi negativamente associada à prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* nos animais (Tabela 13).

Tabela 13. Resultado do modelo de regressão logística para os fatores de risco associados com a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em 1070 suínos (≥ 8 meses) do Estado de Mato Grosso durante setembro a dezembro de 2014.

Variáveis	Estimativa	Valor-p	OR	2,5%	97,5%
Sexo	-0,0337	0,0888	0,9669	0,9302	1,0050
Idade	0,0029	0,0082	1,0029	1,0008	1,0051
Áreas com suínos criados extensivamente	0,0424	0,2055	1,0433	0,9771	1,1140
Fornecimento de resíduos aos suínos	-0,0559	0,0339	0,9456	0,8981	0,9955

Neste estudo 43 suínos estavam simultaneamente positivos para anticorpos anti-*N. caninum* e anticorpos anti-*T. gondii*, segundo a RIFI.

Na análise espacial a Figura 15 é apresentado a distribuição espacial do risco relativo, em que se verifica que o risco da doença varia de 0 a 2, desta forma pode ser considerado não constante no espaço (valor-p=0,048).

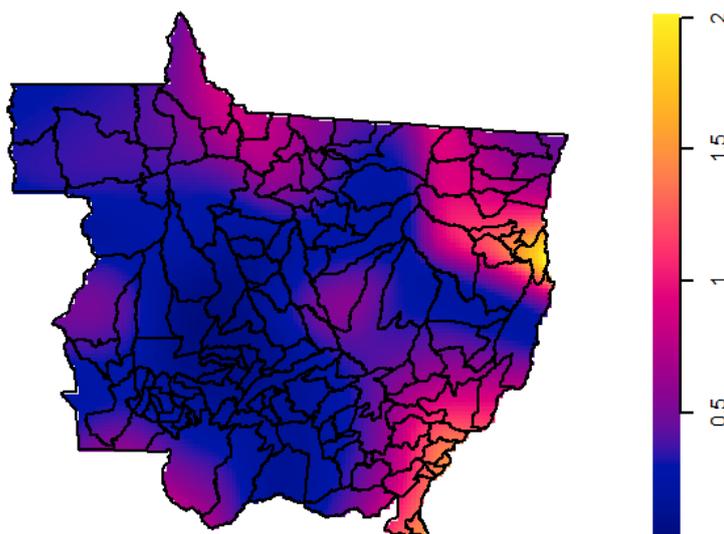


Figura 15. Estimador Kernel do risco relativo da neosporose suína no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.

Na Figura 16 é apresentado a distribuição espacial das propriedades negativas obtida por meio do estimador kernel, em que se verifica uma variação de 0 a 6 propriedade negativas, e que a maior concentração se encontra ao Norte e Centro do Estado de Mato Grosso.

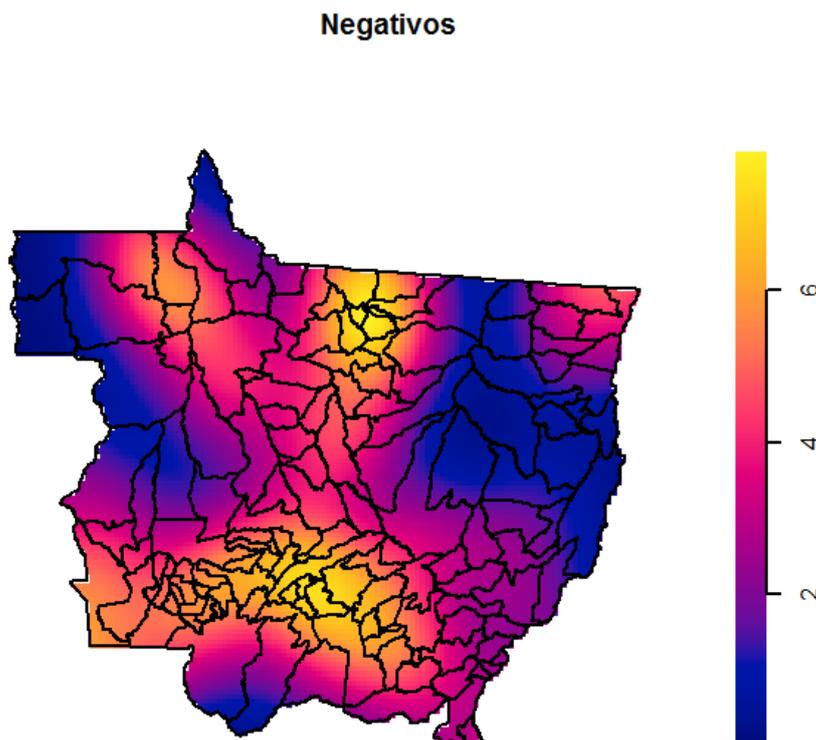


Figura 16. Estimador Kernel da densidade de propriedades negativas na pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* em suínos (≥ 8 meses) em propriedades de subsistência no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.

Na Figura17 é apresentada a distribuição espacial das propriedades positivas obtida por meio do estimador kernel, onde se observa uma variação de 0 a 4 propriedade positivas, sendo que a maior concentração se encontra ao Norte e Sudoeste do Estado de Mato Grosso.

Positivos

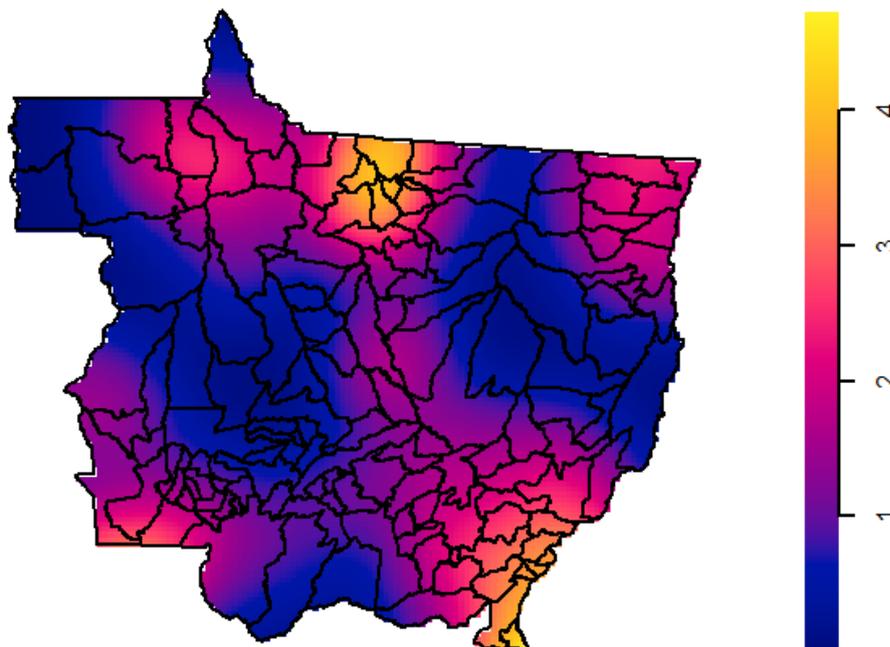


Figura 17. Estimador Kernel da densidade de propriedades positivas na pesquisa de anticorpos anti-*N.caninum* em suínos (≥ 8 meses) em propriedades de subsistência no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.

Na Figura 18 é apresentado função de correlação marcada da distribuição espacial das propriedades e a sua prevalência, em que verifica-se que não há relação entre a localização da propriedade e a prevalência pois não existem pontos fora do intervalo de confiança, indicando que a prevalência da propriedade não está relacionada a sua localização

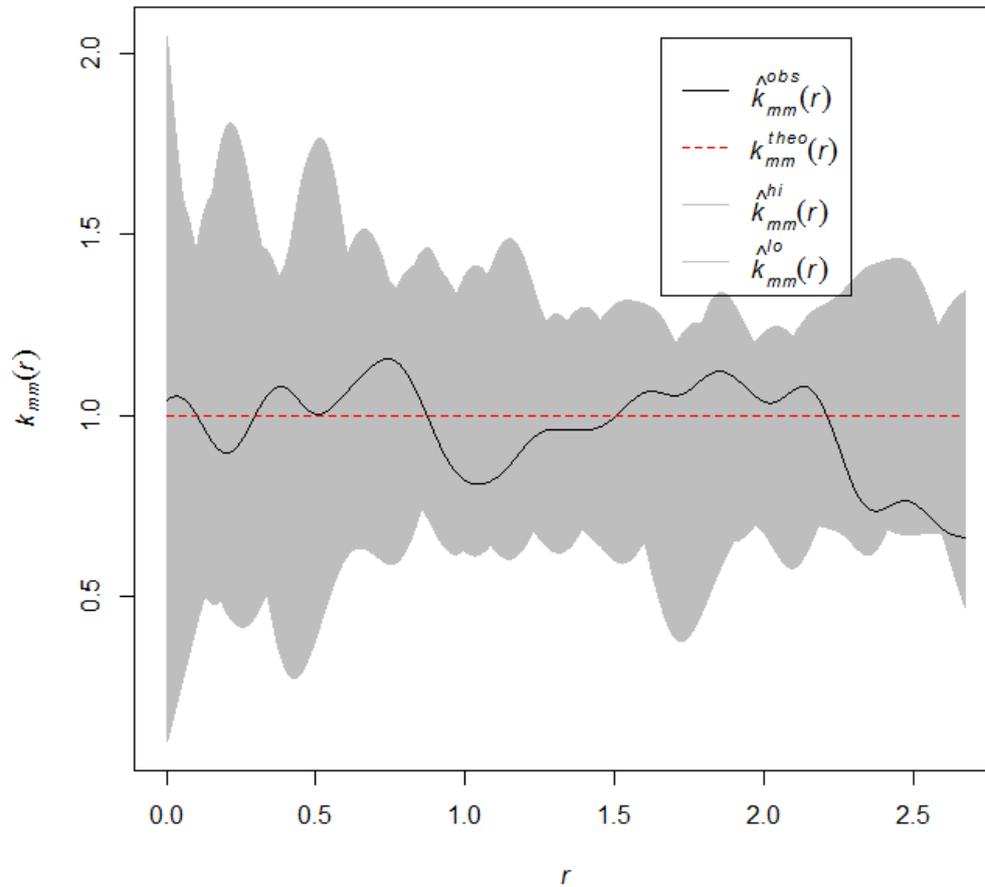


Figura 18. Função de correlação marcada da distribuição espacial das propriedades positivas e negativas na pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* em suínos (≥ 8 meses) em propriedades de subsistência no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.

Na Figura 19 é apresentada a distribuição espacial das prevalências intra-rebanho nas propriedades amostradas no Estado de Mato Grosso, onde observa-se uma variação na prevalência entre 0 a 1.

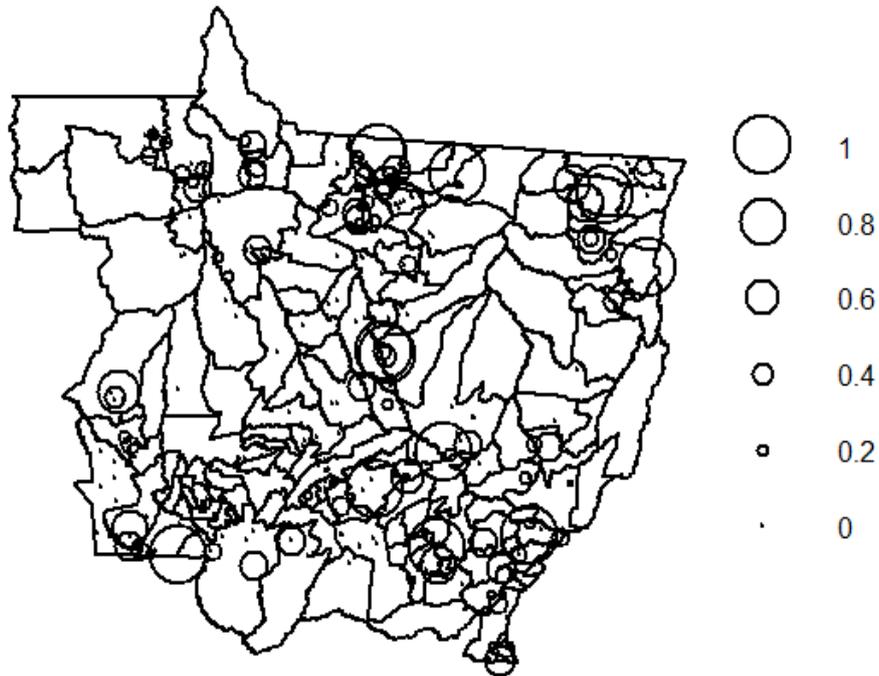


Figura 19. Distribuição espacial das prevalências intra-rebanho das propriedades positivas na pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* em suínos (≥ 8 meses) em propriedades de subsistência no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.

Na Figura 20 é apresentado a distribuição espacial das prevalências das propriedades obtida por meio do estimador kernel, em que se verifica uma variação de prevalência 0 a 0,4 e que as maiores prevalências intra-rebanho estão localizadas a nordeste do estado de Mato Grosso.

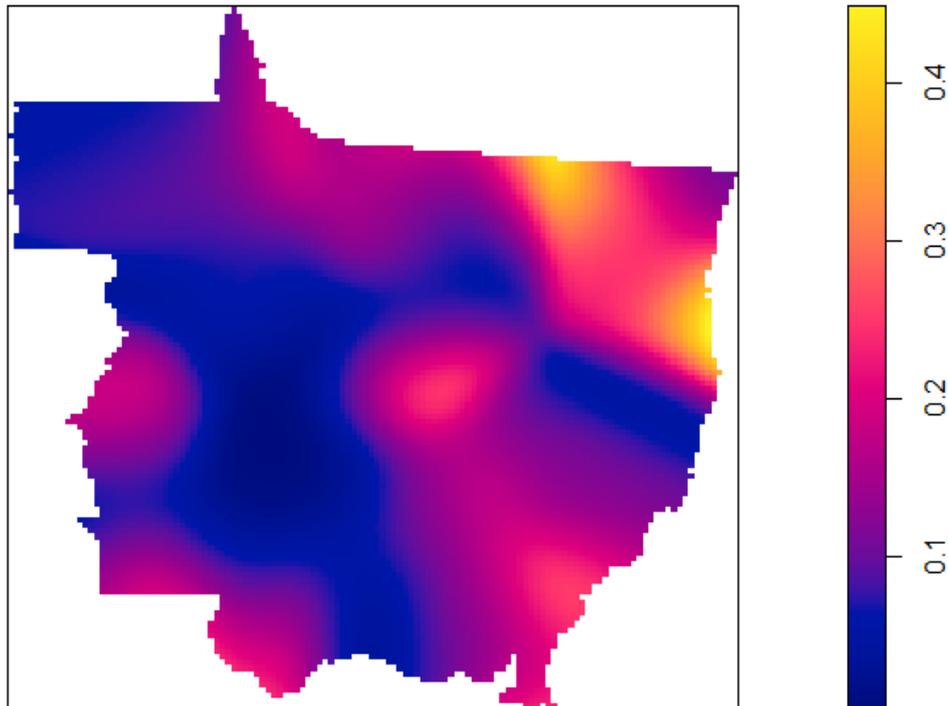


Figura 20. Estimador Kernel da prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em suínos (≥ 8 meses) em propriedades de subsistência no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.

Na Figura 21 é apresentado função de correlação marcada da distribuição espacial das propriedades e a sua prevalência de animais positivos para *N. caninum*, em que verifica-se que não há relação entre a localização da propriedade e a prevalência e não existem pontos fora do intervalo de confiança, indicando que a prevalência da propriedade não está relacionada a sua localização.

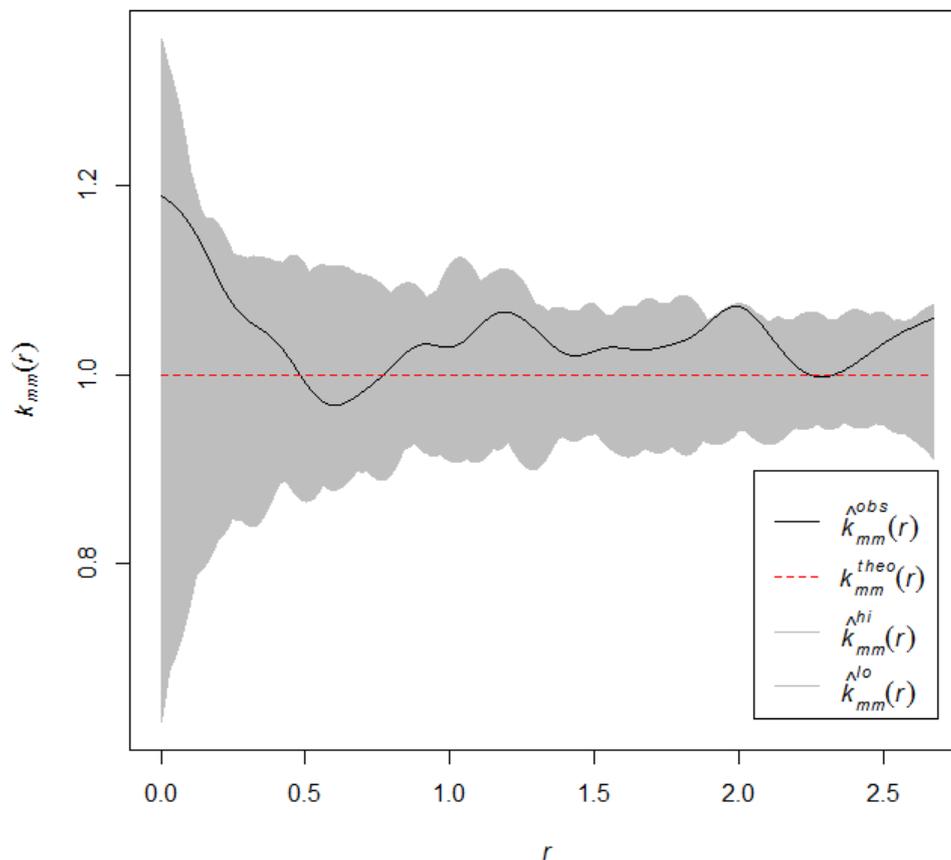


Figura 21. Função de correlação marcada da distribuição espacial das propriedades positivas na pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* em suínos (≥ 8 meses) em propriedades de subsistência no Estado de Mato Grosso, durante o período de setembro a dezembro de 2014.

6 DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato da infecção por *T. gondii* e *N. caninum* em suínos de propriedades subsistência no Estado de Mato Grosso. A frequência de anticorpos anti-*T. gondii* de 32,4% é similar à encontrada em estudos anteriores com suínos de pequenas propriedades no Brasil (CADERMATORI et al., 2014; VILLALOBOS et al., 2011, BEZERRA et al., 2009; CAVALCANTE et al., 2006). Em estudos onde as propriedades de criação de suínos são tecnificadas, a prevalência é notavelmente mais baixa, como as observadas

por Muraro et al. (2010) e Samico Fernandes et al. (2011), que descreveram frequências de 12,8% e 9,78%, respectivamente. Estes resultados podem refletir a influência de diferentes condições de manejo as quais estes animais encontram-se submetidos, particularmente, relacionada a alimentação e aos cuidados sanitários.

Neste estudo os suínos amostrados eram adultos (≥ 8 meses) e com sistema de criação sem características comerciais, o que pode aumentar a prevalência de toxoplasmose suína (WEIGEL et al., 1999; BERARDINIS et al., 2017; ASSID-RAD et al., 1995), onde suínos mantido em confinamento total tinham risco 29,2 vezes menor de ter anticorpos para *T. gondii* do que aqueles mantido em confinamento parcial, tendo acesso ao pasto (DUBEY et al., 1995). Além disso, o maior título observado foi de 8.192 (0,86%) e os mais frequentes foram de 128 (32,85%) e 64 (23,76%), sugerindo uma possível infecção crônica na maioria dos animais, semelhante aos dados encontrados por Millar et al. (2008), onde 408 suínos da região sudoeste do Paraná apresentaram título de 64 (74%) como mais freqüente. No entanto, comparações entre estudos de prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* devem ser feitos com precaução, devido à adoção de diferentes técnicas sorológicas, adoção de diferenças no ponto de corte, sistemas de criação, tamanho da amostra e idade dos animais (CADEMARTORI et al., 2014).

De acordo com os resultados, aproximadamente, 55,62% das propriedades amostradas apresentou pelo menos um suíno positivo na RIFI para anticorpos anti-*T. gondii*, além do valor elevado da soroprevalência nos animais (32,4%), mostrando a ampla distribuição do protozoário em propriedades de subsistência no Estado de Mato Grosso. Uma característica

importante dessas propriedades amostradas é seu caráter não comercial, no entanto, é possível o comércio de pequenos excedentes.

Considerando que animais infectados possuem grande quantidade de cistos de *T. gondii* em diversos órgãos e tecidos (DUBEY et al., 1998), e que os cistos não são detectados no abate durante a inspeção sanitária (WYSS, et al., 2000), é possível a exposição de produtores rurais ou pessoas que abatem ou mesmo consomem carne dos suínos. Millar et al. (2007; 2008) observaram altos índices de soropositividade (58,6%) em magarefes e funcionários que lidam diretamente com suínos e seu abate, enquanto Belluco et al. (2016) confirmaram o papel da carne como fonte de *T. gondii*, destacando a necessidade de um sistema de controle para este parasito a ser implementado ao longo da cadeia de produção de carne. Além disso, o conhecimento do consumidor deve ser reforçado a fim de reduzir o impacto da doença.

Valença et al. (2011) observaram uma maior frequência de animais soropositivos em granjas de suínos com presença de gatos, contudo não foi observado uma associação significativa entre a presença de gatos e o índice de infecção por *T. gondii* ($p= 0,866$), ainda que 28,75% (92/320) das propriedades relataram presença de gatos. No entanto, a alta prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* pode ser explicada por uma possível contaminação ambiental com oocistos de *T. gondii*, fato já observado em outros estudos (DUBEY et al., 2008; FEITOSA et al., 2016), que utilizaram galinhas domésticas como indicadores desta contaminação ambiental.

Embora neste estudo a idade e o sexo não deram associação positiva com a infecção por *T. gondii*, a ausência de diferença na prevalência de anticorpos contra *T. gondii* entre a idade e sexo pode sugerir que a exposição

ao parasita é onipresente, ainda que estudos observaram que a prevalência de toxoplasmose em suínos aumenta proporcionalmente de acordo com a faixa etária (DUBEY et al., 1995; ARKO-MANSAH et al., 2000). Além disso, Bamba et al. (2017) observaram que fêmeas foram mais infectadas do que machos.

O maior risco de infecção de *T. gondii* em animais foi associado ao fornecimento de resíduos alimentares aos suínos, o que aumenta a chance de ocorrência da mesma em 1,0989, conforme observado, também por Giraldi et al. (1996) e Feitosa et al. (2014). Resíduos alimentares que são fornecidos aos suínos muitas vezes contém carnes cruas ou malcozidas promovendo a infecção destes animais (GIRALDI et al., 1996)

Observou-se altos índices de prevalência de *T. gondii* em animais e rebanhos em propriedades de subsistências no Estado, fornecendo importantes informações relacionadas a saúde animal e pública, além da necessidade de uma maior conscientização de produtores e consumidores em relação aos possíveis risco de infecção.

A soroprevalência de *N. caninum* foi de 13,49% (IC 95%; 10,89%; 16,02%), com 144/1070 das amostras de soro positivas para *N. caninum* com títulos variando de 50 a 6400 (Tabela 7).

No Brasil, a soroprevalência da neosporose suína varia de 3,1% a 3,2% (AZEVEDO, 2010 e FEITOSA, 2014), enquanto em outros países, os valores variam de 1 a 3%, como na Suíça (WYSS et al., 2000). Já Damriyasa et al. (2004) observaram prevalência de 0,048% na Alemanha.

Helmick et al. (2002) examinaram amostras de soro de 454 porcas reprodutoras abortadas ou consideradas inférteis, e todas elas foram negativas de acordo com RIFI. Porcos domésticos no Nordeste do Brasil foram

examinados para presença anti-*N. caninum*, onde observaram-se taxas de ocorrências de 3,1% (AZEVEDO et al., 2010) e 3,2% (FEITOSA et al., 2014), menores do que os observados no presente estudo, usando a mesma técnica e ponto de corte.

Neste estudo, a idade em meses do animal fez com que aumentasse as chances de o animal ter anticorpos anti-*N. caninum* em 1,0029, contrário aos observados por Soares et al. (2016), que não identificou tal associação.

A variável “fornecimento de resíduos alimentares aos suínos” teve uma associação negativa com a presença de anticorpos anti-*N. caninum* tanto na análise estatística de animais quanto de propriedades, este resultado demonstra que a transmissão horizontal talvez não seja tão importante na epidemiologia desta doença, assim como ocorre para *T. gondii*, onde esta mesma variável teve associação positiva. *T. gondii* e *N. caninum* são organismos biologicamente distintos (DUBEY et al., 1995), sendo que para *N. caninum* a transmissão congênita é mais comum (DUBEY et al., 2017).

Neste estudo, a análise exploratória indica que a distribuição das propriedades, quanto ao risco relativo da toxoplasmose e neosporose em suínos de pequenas propriedades do Estado de Mato Grosso não é constante no espaço. Observou-se que não há relação entre a localização da propriedade e a prevalência, pois não existem pontos fora do intervalo de confiança, sugerindo que a prevalência não está relacionada com a localização da propriedade.

Estudos realizados sugerem que há diferença no risco de infecção tanto para *T. gondii* quanto para *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 entre rebanhos é maior em áreas com maiores temperaturas para *N. caninum* (SHARES et al., 2003; RINALDI et al., 2005) e para *T. gondii* em regiões com altas temperaturas e chuvas moderadas (LIMON et al., 2017).

O fato das propriedades estarem submetidas ao mesmo risco para os agentes *T. gondii* e *N. caninum* em todo o Estado de Mato grosso, é sugestivo de similaridade no manejo para a produção de suínos nas propriedades e expostas as mesmas condições climáticas.

7 CONCLUSÃO

Nós identificamos uma alta prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* em suínos criados em fazendas rústicas, com ampla distribuição por todo o estado. A taxa de infecção por ambos os protozoários foi diretamente relacionada à alimentação com resíduos alimentares. Além disso, as taxas de soroprevalência de *N. caninum* aumentaram com a idade.

Mais estudos são necessários para avaliar o impacto do *T. gondii* na produção de suinocultura de quintal, bem como sua importância como fonte de infecção para toxoplasmose em humanos no Estado de Mato Grosso, além do papel dos suínos domésticos na epidemiologia da neosporose.

8 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, W. M. et al. Suínos sororreagentes a *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) enviados para abate e destinados ao consumo humano. **Rev Bras Med Vet.** v.37, n. 4, p.397-400, 2015.

AMENDOEIRA, M. R. R.; COSTA, T.; SPALDING S. M. *Toxoplasma gondii* Nicolle e Manceaux, 1990 (Apicomplexa: Sarcocystidae) e a Toxoplasmose. **Rev. Souza Marques.** v. 1, n.1, p. 15-29, 1999.

ARAÚJO, F. A. P.; SOUZA W. J. S. Prevalência de toxoplasmose em suínos da região de Erechim (RS), detectados pela Imunofluorescência Indireta. In: Congresso Panamericano de Ciência Veterinárias, 15 Campo Grande. **Anais. Campo Grande: Assoc. Pan-americana de Ciênc Vet Soc Brasil Med Vet.** p. 335, 1996.

ARKO-MANSAH et al. The soroprevalence of toxoplasmosis in pigs in Ghana. **Acta Tropical**, v.76: p. 27-31, 2000.

ASSADI-RAD, A.M.; NEW, J.C.; PANTON, S. Risk factors associated with transmission of *Toxoplasma gondii* to sows kept in different management systems in Tennessee. **Vet Parasitol.**, v. 57, p.289-297, 1995.

AZEVEDO, S. S. et al.2010. Prevalence de anti-*Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* antibodies in swine from Northeastern Brazil. **Rev. Bras Parasitol Vet.**; v. 19, n.2, p.80-84, 2010.

BADDELEY, A.; TUNER, R. Spatstat: An R Package for Analyzing Spatial Point Patterns. **J Stat Softw**, v.12 n.6, p.1-42, 2005.

BAMBA, S. et al. Soroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection among slaughtered pigs, cattle and goats for human consumption in Bobo-Dioulasso, Burkina Fasso. **J Parasitol and Vector Biol.**, v.9, n.8, p. 106-110, 2017.

BARTOVÁ, E.; SEDLÁK, K.; LITERÁK, I. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in wild boars in the Czech Republic. **Vet Parasitol.**, v.142: p.150-153, 2006.

BERARDINIS, A.; PALUDI, D.; PENNISI, L.; VERGARA, A. *Toxoplasma gondii*, a foodborne pathogen in the swine production chain form a Europe perspective. **Foodborne Pathog Dis.**, v.14, n. 11, p. 637-648, 2017.

BJÆRKAS, I.; MOHN, S.F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming protozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Z Parasitenkd.**, v.70, n.2, p.271-274, 1984.

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

BELLUCO, S. et al. Determinants for *Toxoplasma gondii* Prevalence in Meat: A Systematic Review and Meta-Regression. **PubMed J.**, PLoS ONE, v.11, n.4, e0153856. 2016.

BEZERRA, R. A. et al. Detecção de anticorpos anti- *Toxoplasma gondii* em suínos criados e abatidos no Estado da Bahia, Brasil. **Rev Bras Parasitol Vet.**, v.19, p.1-5, 2009.

BONNA, I.C.F. et al. Estudo soroepidemiológico da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos e frangos, para abate, em região rural do Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Ci. Vet.**, v.13, n.3, 186-189.

BUXTON D. Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. **Parasitol Today**, v. 9, p.335–337, 1993.

CADERMATORI, B. G., et al. Isolation and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* in naturally infected (rustic farm) pigs in southern Brazil. **Vet Parasitol.**, v. 203, p.207-211, 2014.

CAMARGO, M.E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Rev Inst Med Trop.**, v.6, p.117-118, 1964.

CAVALCANTE, G.T., et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Cats and Pigs from Rural Western Amazon, Brazil. **J. Parasitol.**, v..92, n.4, p.863-864, 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, 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, 1993.

COSTA, K. S. et al. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol.**, v. 38, p. 157-159, 2008.

DAMRIYASA, I. M., et al. Cross-section survey in pig breeding farms in Hesse, Germany: seroprevalence and risk factors of infection with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. And *Neospora caninum* in sows. **Vet Parasitol.**, v.126, p.271-286. 2004.

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

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, 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, 1988.

DUBEY, J.P et al. National seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs. **J Parasitol.**, v.77, p.517-521, 1991.

DUBEY J.P. et al. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. **J. Parasitol.**, v.81 p.723-729, 1995.

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

DUBEY, J.P. Refinement of pepsin digestion method for isolation for *Toxoplasma gondii* form infected tissues. **Vet Parasitol.**, v.74; p.75-77, 1998.

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

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

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. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* Isolates from chickens from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.157, p.299-305, 2008.

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

DUBEY, J. P. et al. Neosporosis, Toxoplasmosis and Sarcocystosis in ruminants. **Elsevier Vet Clin food Anim.**, v. 22 p.645-671, 2006.

DUBEY JP. Toxoplasmosis in pig – the last 20 years. **Vet Parasitol.**, v.164, p.89-103, 2009.

DUBEY JP. **Toxoplasmosis of Animals and Humans**. 2nd ed. CRC Press, 2010, Boca Raton, p. 313.

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

DUBEY, J.P. et al. **Neosporosis in Animals**. CRC Press, 2017. Boca Raton, Florida, USA., p. 31, 37, 42.

DU, F. et al. Soil contamination of *Toxoplasma gondii* oocysts in pig farms en central China. **Vet Parasitol.**, v.187, p.53-56, 2012.

DJURKOVIC-DJAKOVIC, O. et al. Pork as a source of human parasitic infection. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.19, p.586-584, 2013.

FAO, 2014. Food and Agriculture organization of the United Nations. Animal production and health Division: Pig and animal production, 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/pigs/production.html>. Acesso em 17/03/2017.

FARREL, R.L. et al. *Toxoplasma* isolated from swine. **Am J Vet Res.**, v.5, n.3, p.181-185, 1952.

FEITOSA, T. F. et al *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast, Brazil. **Vet Parasitol.**, v.202, p.305-309, 2014.

FEITOSA, T.F. et al. First study on seroepidemiology and isolation of *Toxoplasma gondii* in free-range chickens in the semi-arid region of Paraíba state. **Rev. Bras. Parasitol.**, v.115, p. 3983-3990, 2016.

FIALHO, C. G.; ARAÚJO, F. A. P. Comparação entre os testes de imunofluorescência indireta e hemaglutinação indireta para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em soros de suínos. **Acta Sci. Vet.**; v.30, n.3, p.185-189, 2002.

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

GIRALDI S. M. Estudo da toxoplasmose congênita natural em granjas de suínos em Londrina, Paraná. **Arq Bras Med Vet. Zootec.**, v.48, n.1, p. 634-640, 1996.

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

GONDIM, L. F. P. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol.**, v. 34, n. 2, p. 159-161, 2004.

GUO, M. et al. Systematic Meta-Analysis of *Toxoplasma gondii* Prevalence in Food Animals in the United States. **Food Borne Pathog. Dis.**, v.13, n.3, p.1-10, 2015.

HELMINCK, B.et al. Serological investigation of aborted sheep and pigs for infection by *Neospora caninum*. **Rev Vet Sci.**, v.73, p.187-189, 2002.

INDEA/MT. Instituto de Defesa Agropecuária de Mato Grosso. Banco de Dados do Sistema Informatizado de Animais. Cuiabá-MT, 2016.

JACOB, L.; REMINGTON, J.S.; MELTON, M.L.; The resistance of the encysted form of *T. gondii*. **J Parasitol.**, v.46, p.11-21, 1960.

JENSEN, L. et al. Experimental porcine neosporosis. **APMIS**, v.106 p.475-482, 1998.

KELSALL, J. E.; DIGGLE, P. J. Non-parametric estimation of spatial variation in relative risk. **Statistics in Medicine**, v.14, p.559–573, 1995.

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

KIJLSTRA, A.; JONGERT, E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. **Int J Parasitol.**, v.38, p.1359-1370, 2008.

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, 1989.

LIMON G, et al. Cross-sectional study of *Toxoplasma gondii* infection in pig farms in England. **Food borne Pathog Dis.**, v.20 p.1–13, 2017.

LU, F.; HUANG, S.; KASPER, L. The temperature-sensitive mutants of *Toxoplasma gondii* and ocular toxoplasmosis. **Elsevier Vaccine**, v.27 p.573-580, 2009.

LUCIANO, D. M. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in cattle and pigs slaughtered, State of Rio de Janeiro. **Rev Bras Parasitol Vet.**, v.20, p.351-353, 2001.

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

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

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

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

MILLAR, P.R; et al. Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em trabalhadores de um matadouro de suínos e indivíduos com outras atividades na cidade de Palmas, Paraná, Brasil. **Ciênc Rur.** v..37,n.1, p. 292-295, 2007.

MILLAR, P. R. *Toxoplasma gondii*: estudo soroepidemiológico de suínos da região sudoeste do Paraná. **Pesq Vet Brasil.**, v.28, n.1, p.15-18, 2008.

MURARO, S.L. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in swine matrices in Nova Mutum and Diamantino, Mato Grosso, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet.** v.19, n.4, p.254-255, 2010.

OIE, World Organization for Animal Health. 2016. Disponível em:<<http://www.oie.int/for-the-media/press-releases/2016>>. Acesso em: 14 out.16.

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.

OLIVEIRA, K. R. et al. Detecção de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soros de suínos criados sob condições rústicas na microrregião de Registro-SP, pelo método de aglutinação direta (MAD). **Vet. e Zootec.** v.14, n.2, p. 169-175, 2007.

OLIVEIRA, P. A. et al. Patogenicidade e virulência de *Toxoplasma gondii* isolado de suínos de criação artesanal no sul do Brasil. **Pesq Vet Bras**, v.34, n.12, p.1186-1190, 2014.

PEZERICO, G.B. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Leptospira* spp. em suínos abatidos em três abatedouros dos Estados de Minas Gerais e São Paulo. **Arq Inst Biol**, v.74, n.3, p. 267-270, 2007.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2015.

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, 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, p.219-230, 2005.

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, 2004.

SAMICO-FERNANDES, E.; Anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em suínos abatidos em matadouros da região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. **Arq Inst Biol**, v.78, n.3, p.425-428, 2011.

SAMICO-FERNANDES E, SAMICO-FERNANDES M, DE ALBUQUERQUE P. *Toxoplasma gondii* in backyard pigs: seroepidemiology and mouse bioassay. **Acta Parasitol**. v.62(2): 466-470. 2017.

SCHARES, G. et al. Potential risk factors for bovine *Neospora caninum* infection in Germany are not under the control of the farmers. **Parasitol** v. 129, p. 301–309, 2004.

SCHLUNDT J., TOYOFUKU H., JANSEN J., HERBST S.A. Emerging foodborne zoonoses. **Rev. Sci. Tech**.v. 23, 513-533. 2004.

SILVA, J.L.M. Sobre um caso de toxoplasmose espontânea em suínos. **Arq. Esc. Vet. UFMG**, v.12 p. 425-428, 1959.

SOARES, H. S. et al. Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* in wild pigs (*Sus scrofa*) in the Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v.53, n.1, p.112-116, 2016

SWITAJ, K., et al. Recent trends in molecular diagnostics for *T. gondii* infections. **Clin Microbiol Infect**. v.11, n.3, p.170-176, 2005.

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int J Parasitol**, v. 30, p.1217-1258, 2000.

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

VALENÇA, R. M. et al. Prevalência e fatores de risco associados à infecção por *Toxoplasma gondii* em granjas suinícolas tecnificadas no Estado de Alagoas. **Pesq Vet Bras**, v.31, n.2, p.1291-1296, 2011.

VIDOTTO, O. et al. Estudos epidemiológicos da toxoplasmose em suínos em Londrina-PR. **Semina: Ciên. Agrár.** v. 11, n.1, p.53-59, 1990.

VILLALOBOS, E. M. C. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em soros de suínos de propriedades Rurais do Estado de São Paulo. **Inst. Biológico**, v.73, n.2, p.129-180, 2011.

VILLARI, S. et al. Risk factors for toxoplasmosis in pigs bred in Sicily, Southern Italy. **Vet Parasitol**, v.161, p1-8, 2009.

WEIGEL, R. M. Risk factors for infection with *Toxoplasma gondii* for residents and workers on swine farms in Ilions. **Am J Trop Medi. and Hyg**, v.60, n.5, p. 793-798, 1999.

WYSS, R. et al. Untersuchungen zum vorkommen von *Toxoplasma gondii* und *Neospora caninum* unter fleisch hygienischen Aspekten. **Schweiz ArchievesTierheilk**, v. 142, p. 95-108, 2000.

APÊNDICE A – Artigosubmetido

Toxoplasma gondii and *Neospora caninum* infection in backyard pig farms in the state of Mato Grosso in midwestern Brazil

Infecção por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em fazendas de suinocultura de fundo de quintal no estado do Mato Grosso no centro-oeste do Brasil

Make Kawatake Minetto^{1,2}, Rute Witter^{1,3}, Anderson Castro Soares de Oliveira¹, João Augusto Minetto^{II}, Daniel Moura de Aguiar^I, Richard de Campos Pacheco^{I*}

ABSTRACT: To evaluate the prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies and identify the risk factors associated with these infections, serum samples were collected from 1,070 pigs from 320 backyard pig farming establishments in the state of Mato Grosso, Brazil. Each farmer was asked to fill out a questionnaire for subsequent epidemiological data analysis. Anti-*T. gondii* and anti-*N. caninum* antibodies were detected using the indirect immunofluorescent assay (IFA) with cut-off dilutions of 1:64 and 1:50, respectively. The overall prevalence of anti-*T. gondii* and anti-*N. caninum* antibodies was 32.48% and 13.49%, respectively, while the prevalence per herd was 55.63% for *T. gondii* and 27.81% for *N. caninum*. Pigs fed with leftovers were 1,0989 times more likely to test positive for anti-*T. gondii* antibodies, while age of the pigs and feeding with leftovers were the significant variables associated with positive results for anti-*N. caninum* antibodies. Furthermore, farms that provided leftover foods were 38.13% less likely to have pigs testing positive

^{1*}Post-Graduate Program in Veterinary Sciences (PPGVET), Faculty of Veterinary Medicine (FAVET), Federal University of Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, MT, Brazil. Email: richard@ufmt.br. Corresponding author

²Mato Grosso Institute for Agricultural Defense (INDEA-MT), Cuiabá, MT, Brazil.

³Federal Institute of Rondônia (IFRO), Jaru, RO, Brazil

for *N. caninum*. Further studies are necessary to evaluate the impact of *T. gondii* infection in backyard pig farming production, its importance as a source of toxoplasmosis infection in humans in the Mato Grosso state, and the role of domestic pigs in the epidemiology of neosporosis.

Key words: toxoplasmosis; neosporosis; antibodies; indirect immunofluorescence assay (IFA).

RESUMO: Para avaliar a prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* e identificar os fatores de risco associados a essas infecções, foram coletadas amostras de soro de 1.070 suínos de 320 estabelecimentos de criação de suínos no Estado de Mato Grosso, Brasil. Cada agricultor foi solicitado a preencher um questionário para posterior análise dos dados epidemiológicos. Anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* foram detectados utilizando a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com diluições de corte de 1:64 e 1:50, respectivamente. A prevalência total de anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* foram 32,48% e 13,49%, respectivamente, enquanto a prevalência por rebanho foi de 55,63% para *T. gondii* e 27,81% para *N. caninum*. Os suínos alimentados com sobras foram 1,0989 vezes mais propensos a testar positivo para anticorpos anti-*T. gondii*, enquanto a idade dos suínos e alimentação com sobras foram as variáveis, significativamente, associadas com resultados positivos para anticorpos anti-*N. caninum*. Além disso, as fazendas que forneciam restos de comida eram 38,13% menos propensas a ter suínos testando positivos para *N. caninum*. Novos estudos são necessários para avaliar o impacto da infecção por *T. gondii* na produção de suinocultura de fundo de quintal, sua importância como fonte de infecção por toxoplasmose em humanos no estado de Mato Grosso e o papel dos porcos domésticos na epidemiologia da neosporose.

Palavras-chave: toxoplasmose; neosporose; anticorpos; reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii is a coccidian parasite with cats as definitive hosts, and warm-blooded animals as intermediate hosts (DUBEY, 2010). Serological surveys have reported *T. gondii* infection to be prevalent in pigs worldwide (DUBEY, 2009), and its prevalence varied dramatically among the different classes surveyed, such as market pigs vs. sows and indoor pigs from bio secure housing systems vs. free-range (DUBEY, 2010). Tissue cysts of *T. gondii* found in meat, meat-derived products, or offal, mainly from pigs, sheep, and goats, may be important sources of infection in humans (TENTER, 2009).

Neospora caninum is a recently recognized protozoan parasite that was misidentified as *T. gondii* until 1988. This coccidian parasite uses canids (dogs, coyotes, dingoes and grey wolves) as definitive hosts and warm-blooded animals as intermediate hosts (DUBEY et al., 2017). Information on serological prevalence of anti-*N. caninum* antibodies in domestic pigs is limited in Brazil (AZEVEDO et al., 2010; FEITOSA et al., 2014), which has low rates of infection.

Mato Grosso state in midwestern Brazil is the fifth largest producer of pigs in the country, with 2,613,925 million animals distributed in 34,093 farms; of this total, 98.78% are backyard pig farming, and make up 16.76% of the total population of pigs from the state (INDEA, 2016). In the present study, we evaluated the presence of anti-*T. gondii* and anti-*N. caninum* antibodies in pigs from backyard pig farming

establishments in Mato Grosso State, Brazil, and identified the risk factors associated with these infections.

MATERIAL AND METHODS

Study area, serum collection and epidemiological information

Blood samples had been collected for a previous study (September 2014 to December 2014) on the epidemiology of classical swine fever (CSF) or hog cholera, by the Mato Grosso Institute for Agricultural Defense (INDEA/MT) in the state of Mato Grosso, midwestern Brazil. The stored samples were made available for the present study.

Sampling

Sampling was done in 2 stages. The first stage (primary sampling units) involved selecting a pre-established number of random farms to estimate disease foci. This resulted in a sample of 320 farms, characteristically with pigs reared for their own consumption, in family-run farms with no industrial features. Following this, a pre-established number of pigs (secondary sampling units) aged over 8 months were selected.

The random draw was carried out at the farm by the official veterinarian responsible for sampling. The sample size was calculated using the algebraic expression $n = [Np(1-p) / (d / z_{\alpha/2})^2 + p(1-p)] \cdot deff$ (SCHAEFFER et al., 2011), where, N is size of the swine population (2,613,925 million pigs), p is the prevalence to be estimated, d is the margin of error or maximum error of the estimation, $z_{\alpha/2}$ is a tabulated value of the normal distribution and $deff$ is the effect of the sample design. This is used to estimate proportions, considering 50% as absolute prevalence of anti-*T. gondii* and *N. caninum* antibodies, 5% as an estimate of maximum error, 95% as

confidence interval (CI) and 1.2 as experimental design effect. Sampling of animals from each farm remained the same as in the study conducted by INDEA/MT on the epidemiology of CSF. Concomitant to sampling, each farmer was asked to fill out a questionnaire for subsequent epidemiological data analysis.

For the secondary sampling unit, sample size was pre-established considering the number of pigs older than 8 months on each farm. The criteria was as follows: all pigs were sampled from farms with up to 15 pigs; 15 pigs were sampled from farms with 16-20 pigs; 20 from farms with 21-30 pigs; 23 from farms with 31-50 pigs; 26 from farms with 51-80 pigs; and finally, 30 were sampled from farms with over 80 pigs. Thus, total 1070 serum samples were randomly collected.

Indirect immunofluorescence assay

Serum samples were tested by means of IFA to detect the presence of anti-*T. gondii* and anti-*N. caninum* antibodies, as described by CAMARGO (1964) and AZEVEDO et al. (2010), respectively. *T. gondii* (RH strain) and *N. caninum* (isolate NC-1) tachyzoites maintained in Vero cell cultures were used as antigens, along with anti-pig IgG conjugate (Sigma, St Louis, MO, USA), at a 1:100 dilution. Serum samples were considered positive when most of the fixed tachyzoites (>50%) showed total peripheral fluorescence at 1:64 (GARCIA et al., 1999) and 1:50 (AZEVEDO et al., 2010) dilutions for *T. gondii* and *N. caninum*, respectively. All the seropositive serum samples were retested using 2-fold serial dilutions. Positive and negative pig sera were used as controls.

Prevalence and statistical analysis

The prevalence of anti-*T. gondii* and anti-*N. caninum* antibodies on the farms and among the animals was expressed in the form of CIs (THRUSFIELD, 2007). The prevalence of anti-*T. gondii* and *N. caninum* antibodies among the animals was

calculated using weighted values (DOHOO et al., 2003). The following expression was used to determine the weighted value for each animal: (total number of > 8-month-old pigs) / (total of >8 month-old pigs sampled) X (total of > 8 month-old pigs on the farm) / (total of > 8 month-old pigs sampled on the farm).

The prevalence of anti-*T. gondii* and anti-*N. caninum* antibodies on each farm was analyzed, considering that a farm would be determined positive even if one animal tested positive for the respective antigen. A multiple logistic regression model was created as follows: step I – for the continuous variables, a linearity test was performed using Graphs for Log Odds. When the visual evaluation indicated a non-linear trend, the continuous variable was categorized. The optimization methodology of the software package CatPredi R was used (BARRIO et al., 2017); step II – for the categorical variables, a chi-square or exact Fisher test was performed on the results and the various predictor variables, and all the variables with a value of $p < 0.20$ were incorporated into the model; step III – the selected variables were tested for collinearity including multi-collinearity analysis (VATCHEVA et al., 2016), to ensure a mean variance inflation factor (VIF) < 10 before applying them in the models; step IV – the model was constructed by inserting all the variables selected from the previous steps. The less significant variables (according to the Wald test) were then removed and the logistic regression analysis was repeated. This process was repeated, and the adjusted model was compared to the previous one using the likelihood ratio test to check for confounding factors. Whenever there was a change of more than 30% in the parameter estimates, the removed variable was considered to be a confounding factor and re-included in the model.

The variables used to construct the herd model were: farm is in the rural areas or near indigenous reserves (yes or no); farm is in the peri-urban areas or poor

communities (yes or no); pigs were raised extensively (yes or no); feeding with leftovers (yes or no); presence of a cat (yes or no), (variable used only for *T. gondii*); presence of a dog (yes or no), (variable used only for *N. caninum*); farm is located near dumps (yes or no); creates or fattens (yes or no); farm is close to environmental reserves (yes or no); slaughtering on the farm (yes or no).

The animals were analyzed following the same steps as those used to analyze the farms. However, complex analysis was applied to the tests in order to correct the effect of the selection of animals (KORN & GRAUBARD, 1999). For this, weighted values were used as described above.

The model was built using the following variables: sex (male or female); feeding with leftovers (yes or no); presence of a cat (yes or no), (variable used only for *T. gondii*); presence of a dog (yes or no), (variable used only for *N. caninum*); farm is located near dumps (yes or no). Statistical analysis was performed using the R statistical software package (R Core Team, 2013).

RESULTS

Of the 320 farms analyzed, anti-*T. gondii* and anti-*N. caninum* antibodies were detected in at least one animal in 178 and 89 farms, respectively; this resulted in a herd prevalence of 55.63% (CI 95%; 50.18%; 61.07%) and 27.81% (CI 95%; 22.90%; 32.72%), respectively. Moreover, the seroprevalence of anti-*T. gondii* antibodies in the total population was 32.48% (CI 95%; 28.49%; 36.46%), with titers ranging from 64 to 8,192, while that of anti-*N. caninum* antibodies was 13.49% (CI 95%; 10.89%; 16.02%), and titers ranged from 50 to 6,400.

Distribution of endpoint titers among the positive animals for *T. gondii* and *N. caninum* respectively, were as follows: 82 (23.76%) serum samples showed titers of 64, 65 (45.13%) showed titers of 50; 114 (32.85%) showed titers of 128, 47 (32.63%) titers of 100; 79 (22.89%) had titers of 256, 16 (11.11%) had titers of 200; 45 (13.04%) showed titers of 512, 11 (7.63%) titers of 400; 8 (2.3%) serum samples had titers of 1,024, only 1 (0.69%) had titers of 800; 9 (2.6%) showed titers of 2,048, 3 (2.08%) showed titers of 1,600; 7 (2.02%) serum samples showed titers of 4,096, none had titers of 3,200; finally, 3 (0.86%) had titers of 8,192 and only 1 (0.69%) showed titers of 6,400.

In the multivariate analysis, after the model was applied, no variable was found to be significantly associated with the prevalence of toxoplasmosis on farms. However, feeding with leftovers was found to be significantly associated with the prevalence of neosporosis on farms. Table 1 describes the relationship between the positive farms and the variables of the logistic model. Farms with feeding with leftovers were 38.13% less likely to have pigs testing positive for *N. caninum*.

Only one variable (feeding with leftovers) was found to be significantly associated with the prevalence in the total population for anti-*T. gondii* antibodies. Table 1 describes the relationship between the prevalence of anti-*T. gondii* antibodies in the pig population and the variables of the logistic model for the 1,320 animals sampled. Pigs that were fed with leftovers were 1,0989 times more likely to test positive for anti-*T. gondii* antibodies than those that were not.

Feeding with leftovers and the age of pigs were the variables significantly associated with animal testing positive for anti-*N. caninum* antibodies. Pigs feeding with leftovers were 5.44% less likely to test positive for anti-*N. caninum* antibodies.

Furthermore, in 8 month old pigs, with each added month of life, the animals were 1,0029 times more likely to test positive for anti-*N. caninum* antibodies.

DISCUSSION

Here, we provide a serological survey for infections by *T. gondii* and *N. caninum* in rustic farms with no technological improvements. We observed that more than half of studied farms (55.63% of herd prevalence) had at least one animal positive for *T. gondii*. Moreover, a high rate seroprevalence (32.48%) in the total population of the present study was similarly observed in a previous survey performed in the western Amazon (CAVALCANTE et al., 2006); southern (CADEMARTORI et al., 2014) and northeastern (SAMICO-FERNANDES et al., 2017) regions from Brazil, where pigs were raised in similar conditions. Besides that, the authors observed a low prevalence as compared to the previous serological survey performed at 3 commercial farms of Nova Mutum and Diamantino municipalities, state of Mato Grosso in 2010 (MURARO et al., 2010 found that 12.8% of the tested animals were seropositive). Probably, the higher prevalence rate was influenced by the management systems (BEZERRA et al., 2009). According to BEZERRA et al. (2009), the level of technology is a determining factor for infection by *T. gondii* in pig farms.

Notably, the sampled farms raised pigs for their own consumption, where the animals were slaughtered on the farm without any inspection. This type of management causes exposure of farmers or people, who slaughter or even consume pork meat, to *T. gondii* infection, as pigs are considered an important source of toxoplasmosis infection in humans (DUBEY, 2010). Indeed, humans may get infected by several routes, and there are numerous reports tracing toxoplasmosis to the consumption of infected meat

with some serological surveys incriminating meat more strongly than cats, as a source of human infection (DUBEY, 2010). On the other hand, humans may also get infected during evisceration and handling of the meat (TENTER, 2009).

Feeding the animals with leftovers increases the probability of the presence of anti-*T. gondii* antibodies in pigs by 1,0989-fold. This practice has already been associated with risk factors for *T. gondii* seropositivity (ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2014; FEITOSA et al., 2014), suggesting that food containing raw or undercooked meat, as well as, unwashed vegetables (ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2014; FEITOSA et al., 2014), accounts in part for the *T. gondii* infection in pigs. However, this hypothesis needs evidence. Indeed, the type of food can influence *T. gondii* seropositivity rates, and DUBEY et al. (1992) observed that garbage-fed pigs had a higher seroprevalence of *T. gondii* antibodies (67.3%) than grain-fed pigs (33.8%), in a study conducted in Hawaii.

The prevalence of anti-*N. caninum* antibodies is relative higher (13.49%) with animals presenting titers up to 6,400, when compared to previous studies conducted in Brazil using the same diagnostic method (IFA) and cut-off (1:50). The prevalence varied from 3.1% to 3.2% in domestic pigs in the country (AZEVEDO et al., 2010; FEITOSA et al., 2014). However, except for these serological evidences, currently there is no credible proof on the actual role of pigs in the epidemiology of *N. caninum*. In fact, only 1 study demonstrated experimental neosporosis in pigs with transplacental transmission of *N. caninum* (JENSEN et al., 1998), but there has not been any isolation of *N. caninum* from pigs in natural conditions till date.

In the present study, farms that provided leftover food were less likely to have animals testing positive for *N. caninum*, as well as, decreased the probability of detection of anti-*N. caninum* antibodies in pigs. We are not aware of any study in

literature reporting such an association; though *T. gondii* and *N. caninum* are closely related, further studies are needed to evaluate these differences in the management (feeding with leftovers) to explain this protective factor. In cattle, for example, both parasites can infect this animal species, but there are differences in the main routes of transmission between *N. caninum* (mainly vertical) and *T. gondii* (mainly horizontal) (DUBEY et al., 2017). Furthermore, *N. caninum* seroprevalence rates increased with age. Though this variable was never found to be associated with *N. caninum* infection in pigs (CERQUEIRA-CÉZAR et al., 2017), several studies demonstrated that age was a statistically significant factor, probably due to the increase in probability of horizontal transmission by ingestion of sporulated oocysts. We believe that management facilities allow greater exposure of contaminated environments, since most farms (69.68%) recorded the presence of dogs, a known definite host for *N. caninum*.

CONCLUSION

We identified a high prevalence of anti-*T. gondii* and anti-*N. caninum* antibodies in pigs raised on rustic farms, which were widely distributed throughout the entire state. The rate of infection by both parasites was directly related to feeding with leftovers. Furthermore, *N. caninum* seroprevalence rates increased with age. Further studies are necessary to evaluate the impact of *T. gondii* on backyard pig farming production, as well as, its importance as a source of toxoplasmosis infection in humans in the Mato Grosso state, and the role of domestic pigs in the epidemiology of neosporosis.

BIOETHICS AND BIOSECURITY COMMITTEE

Bioethical Committee for Animal Research of the Federal University of Mato Grosso approved the present study, under protocol no. 23108.215.014/2017-80.

DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS

The authors declare no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge FAPEMAT, Foundation for Research Support of the State of Mato Grosso (grant #0214057/2017) for its financial support, and CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) for the doctoral scholarships granted to D. Aguiar and R.C. Pacheco.

REFERENCES

ALVARADO-ESQUIVEL, C. et al. Seroprevalence and correlates of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in Veracruz State, México. **Tropical Animal Health Production**, v. 46, p. 705-709, 2014. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0551-3>. Accessed: Sept. 23, 2017. doi: 10.1007/s11250-014-0551-3.

AZEVEDO, S.S. et al. Prevalence de anti-*Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* antibodies in swine from Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 80-84, 2010. Available from: <http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01902002>. Accessed: Sept. 23, 2017. doi: 10.4322/rbpv.01902002.

BARRIO, I. et al. A new approach to categorizing continuous variables in prediction models: proposal and validation. **Statistical Methods in Medical Research**, v. 26, n. 6,

p. 2586-2602, 2017. Available from: <https://doi.org/10.1177/0962280215601873>>. Accessed: Sept. 23, 2017. doi: 10.1177/0962280215601873.

BEZERRA, R.A. et al. Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos criados e abatidos no Estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 1-5. Available from: <http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01803015>>. Accessed: Sept. 23, 2017. doi: 10.4322/rbpv.01803015.

CADEMARTORI, B.G. et al. Isolation and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* in naturally infected (rustic farm) pigs in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 1-2, p. 207-211, 2014. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.009>>. Accessed: Sept. 23, 2017. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.02.009.

CAMARGO, M.E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, p. 117-118, 1964.

CAVALCANTE, G.T. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats and pigs from rural western Amazon, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 4, p. 863-864, 2006. Available from: <https://doi.org/10.1645/GE-830R.1>>. Accessed: Sept. 23, 2017. doi: 10.1645/GE-830R.1.

CERQUEIRA-CÉZAR, C.K. et al. All about neosporosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 3, p. 253-279. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612017045>>. Accessed: Sept. 23, 2017. doi: 10.1590/S1984-29612017045.

DOHOO I.R.; MARTIN S.W.; STRYHN H. **Veterinary Epidemiologic Research**. AVC Inc. Charlottetown: Prince Edward Island. 2003, 706p.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis in pig – the last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2-4, p. 89-103, 2009. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.018>>. Accessed: Sept. 23, 2017. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.018.

DUBEY, J.P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. 2.ed. Boca Raton (FL): CRC, 2010, 336p.

DUBEY, J.P. et al. **Neosporosis in Animals**. 1.ed. Boca Raton (FL): CRC. 2017, 530p.

FEITOSA, T.F. et al. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 202, n. 3-4, p. 305-309, 2014. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.015>>. Accessed: Sept. 23, 2017. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.03.015.

GARCIA, J.L. et al. Seroepidemiologia de toxoplasmose em cães e gatos de propriedades rurais do município de Jaguapitã- PR, Brasil. **Ciência Rural**, v. 29, n. 1, p. 99-104, 1999. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84781999000100018>>. Accessed: Sept. 23, 2017. doi: 10.1590/S0103-84781999000100018.

INDEA, MT. Banco de dados do sistema informatizado de animais. Cuiabá-MT: Instituto de Defesa Agropecuária de Mato Grosso. 2016.

JENSEN, L. et al. Experimental porcine neosporosis. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v.106, n.4, p. 475-482, 1998.

KORN, E. L.; GRAUBARD, B. I. **Analysis of Health Surveys**. 1 ed. New York, NY: Johan Wiley & Sons. 1999. doi:10.1002/9781118032619.

MURARO, S.L. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in swine matrices in Nova Mutum and Diamantino, Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de**

Parasitologia Veterinária, v. 19, n. 4, p. 254-255, 2010. Available from: <https://doi.org/10.1089/fpd.2015.2070>>. Accessed: Sept. 23, 2017. doi: 10.1089/fpd.2015.2070.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing, reference index version 2.14.0. Vienna: **R Foundation for Statistical Computing**, 2013. Accessed: Dec. 11, 2017. Available from: <<http://www.R-project.org>>.

SCHAEFFER, R.L. et al. **Elementary Survey Sampling**. 7. ed. Boston: PWS-Kent. 2011, 480p.

SAMICO-FERNANDES, E. et al. *Toxoplasma gondii* in backyard pigs: seroepidemiology and mouse bioassay. **Acta Parasitologica**, v. 62, n. 2, p. 466-470, 2017. Available from: <https://doi.org/10.1515/ap-2017-0054>>. Accessed: Sept. 23, 2017. doi: 10.1515/ap-2017-0054.

TENTER, A. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 364-369, 2009. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000200033>>. Accessed: Sept. 23, 2017. doi: 10.1590/S0074-02762009000200033.

THRUSFIELD, M. **Veterinary Epidemiology**. 3 ed. Oxford: Blackwell Science, 2007, 624p.

VATCHEVA, K.P. Multicollinearity in Regression Analyses Conducted in Epidemiologic Studies. **Epidemiology**, v. 6, n. 2, p. 1-20, 2016. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000200033>>. Accessed: Sept. 23, 2017. doi: 10.4172/2161-1165.1000227.

Table 1. Results of the logistical regression model for risk factors associated with the prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* anti-*Neospora caninum* antibodies in 1070

swines (≥ 8 months) and farms of the state of Mato Grosso, Brazil, between September and December 2014.

Associated variable	Estimate	p-value	Odds Ratio	CI 95%	
Feeding with leftovers ^a	-0,7989	0,0023	0,6187	0,2687	0,7505
Feeding with leftovers ^b	0,094317	0,0193	1,0989	1,0159	1,1888
Feeding with leftovers ^c	-0,055988	0,0339	0,9456	0,8981	0,9955
Age ^c	0,002938	0,0082	1,0029	1,0008	1,0051

^adata on variable significantly associated with the prevalence of neosporosis on farms.

^bdata on variable significantly associated with the prevalence in the total population for anti-*T. gondii* antibodies.

^cdata on variable significantly associated with the prevalence in the total population for anti-*N. caninum* antibodies.

APÊNDICE B – *Qualis* da revista

PLATAFORMA
Sucupira

INÍCIO » Qualis » Qualis Periódicos

Qualis Periódicos

Evento de Classificação:
CLASSIFICAÇÕES DE PERIÓDICOS QUADRIÊNIO 2013-2016

Área de Avaliação:
 MEDICINA VETERINÁRIA

ISSN:

Título:
 CIENCIA RURAL

Classificação:
 -- SELECIONE --

[Consultar](#) [Cancelar](#)

Periódicos

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
1678-4596	CIENCIA RURAL	MEDICINA VETERINÁRIA	B1

APÊNDICE C – Comprovante de submissão

23/05/2018

Gmail - Ciência Rural - Manuscript ID CR-2018-0416



Richard Pacheco <pachecorc@gmail.com>

Ciência Rural - Manuscript ID CR-2018-0416

1 mensagem

Ciência Rural <onbehalfof@manuscriptcentral.com>

23 de maio de 2018 17:21

Responder a: cienciarural@gmail.com

Para: richard@ufmt.br, pachecorc@gmail.com

Cc: make.indea@hotmail.com, rutewitter@hotmail.com, andersoncso@gmail.com, vet.minetto@gmail.com, danmoura@ufmt.br, richard@ufmt.br, pachecorc@gmail.com

23-May-2018

Dear Dr. Pacheco:

Your manuscript entitled "Toxoplasma gondii and Neospora caninum infection in backyard pig farms in the state of Mato Grosso in midwestern Brazil" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the *Ciência Rural*.

Your manuscript ID is CR-2018-0416.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/cr-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/cr-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the *Ciência Rural*.

Sincerely,
Ciência Rural Editorial Office

ANEXO A – Questionário epidemiológico



Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
RURAL E

Secretaria de Defesa Agropecuária AGRICULTURA
DEPARTAMENTO DE SAÚDE ANIMAL - DSA INSTITUTO DE
GROSSO – INDEA MT



SECRETARIA DE ESTADO DE DESENVOLVIMENTO

FAMILIAR- SEDRAF
DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DE MATO

Sistema de vigilância sanitária na zona livre de peste suína clássica
Formulário de colheita de amostras - Inquérito por amostragem em CRIATÓRIOS DE SUÍDEOS 2014

1. Identificação da propriedade e do proprietário

1.1 UF	1.2 Município	1.3 Cod. MAPA _____ - _____											
		UF N° sequencial											
1.4 Nome do estabelecimento		1.5 Código do estabelecimento na UVL											
1.6 Nome do proprietário		1.7 Código do proprietário na UVL											
1.8 Coor. geográficas		1.9 Telefone(s) de contato (DDD + número)											
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%;">Grau</td> <td style="width: 33%;">Minut.</td> <td style="width: 33%;">Segundos</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">Latitude (S)</td> </tr> </table>	Grau		Minut.	Segundos	Latitude (S)			<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%;">Grau</td> <td style="width: 33%;">Minut.</td> <td style="width: 33%;">Segundos</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">Longitude (W)</td> </tr> </table>	Grau	Minut.	Segundos	Longitude (W)	
Grau	Minut.	Segundos											
Latitude (S)													
Grau	Minut.	Segundos											
Longitude (W)													
		2. Data da colheita das amostras ____ / ____ / ____											

3. Critério(s) de risco utilizado(s) para seleção do estabelecimento

fronteira internacional ou divisã da zona livre e PSC	fornecimento de resíduos alimentares (lavagem) aos suídeos	proximidade a reservas naturais, áreas de proteção ambiental ou parques nacionais
assentamentos rurais ou reservas indígenas	proximidade a quarentenários dos suídeos	
áreas periurbanas ou comunidades carentes	proximidade a lixões	proprietário com propriedade em outro país ou em área endêmica
áreas com suídeos criados extensivamente	proximidade a granarias	

4. Composição do rebanho no momento da colheita

4.1 Matrizes 4.2 Cachos 4.3 Leitos* 4.4 Animais castrados acima de 8 meses 4.5 Total envolvido na amostra (somatório dos itens 4.1 ; 4.2 ; e 4.4)

*Animais que não estão em fase reprodutiva (leitos em maturidade e/ou terminação abaixo de 8 meses)

5. Convivência com susceptíveis de outros estabelecimentos?

6. Convivência/contato com susceptíveis selvagens ?

	Sim	Não	Tabela de amostragem	Suínos adultos existentes	Suínos adultos amostrados
				Até 15	Todos os animais
				16 a 20	15
				21 a 30	20
				31 a 50	23
				51 a 80	26
			Mais de 80	30	
	Ingresso	Egres			

7. Trânsito nos últimos 60 dias

Cria/Engorda
Abate

8. Informações sobre as amostras colhidas

Número da amostra	Idade*	Sx	Número da amostra	Idade*	Sx	Número da amostra	Idade*	Sx
1			11			21		
2			12			22		
3			13			23		
4			14			24		
5			15			25		
6			16			26		
7			17			27		
8			18			28		
9			19			29		