

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINARIA**

**PREVALÊNCIA DE *Toxoplasma gondii* E  
*Neospora spp* E ANÁLISE DOS FATORES DE  
RISCO EM EQUÍDEOS DO SUDESTE DO BRASIL**

**Patricia Magalhães de Oliveira  
Médica Veterinária**

**UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS - BRASIL  
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINARIA**

**PREVALÊNCIA DE *Toxoplasma gondii* E  
*Neospora spp* E ANÁLISE DOS FATORES DE  
RISCO EM EQUÍDEOS DO SUDESTE DO BRASIL**

**Patricia Magalhães de Oliveira**

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Elsen Saut  
Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária – UFU, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Clínica Médica e Investigação Etiológica).

**UBERLÂNDIA – MG  
Abril – 2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

O48p Oliveira, Patrícia Magalhães, 1985 -  
2014 Prevalência de **TOXOPLASMA GONDII E NEOSPORA SPP.** e análise dos  
fatores de risco em equídeos do sudeste do Brasil / Patrícia Magalhães Oliveira. –  
2014.  
75 f. : il.

Orientador: João Paulo Elsen Saut.

Coorientador: Francisco Cláudio Dantas Mota

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Veterinárias.

Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Neosporose - Teses.. 2. Epidemiologia veterinária –  
Teses. 3. Imunofluorescência – Teses. I. Saut, João Paulo Elsen. II. Mota, Francisco  
Cláudio Dantas, 1975- III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

---

CDU: 619

*“Tudo é do Pai  
Toda honra e toda glória  
É dele a vitória  
Alcançada em minha vida”*

*Padre Fábio de Melo  
Compositor: Frederico Cruz*

## AGRADECIMENTOS

À **Deus** pela oportunidade de viver, por ter a família e o noivo que tenho, pelos amigos que posso, por tudo que alcancei na minha vida.

Aos meus amados pais **Luiz** e **Ireni**, por toda força, amor e incentivo com os meus estudos e sempre me apoiar, vocês são meu orgulho e minha vida. Tudo que tenho é graças a vocês também. A minha irmã **Chris**, por sempre acreditar até mais que eu em meus sucessos, por sempre estar ao meu lado. E ao meu noivo, **Leandro**, por toda paciência, apoio, incentivo, força, por todo carinho e amor ao me ajudar em tudo que necessitei, por ser minha fonte de luz e calma.

Aos meus amigos **Nayara, Ana Rita, Suzana, Mariana Pádua e Andréia**, por todo carinho, força e palavras de incentivo. Aos meus amigos de equipe **Mariana Ribeiro, Diego e Vinicius** por toda ajuda e apoio na minha pesquisa.

Aos funcionários e amigos do Hospital Veterinário da UFU, principalmente ao **João Luiz, Marco Túlio, João, Lucimar, Darcy e Celina**, por toda amizade, apoio e carinho.

À equipe do laboratório de Zoonoses e Saúde Pública e Protozoologia da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, em especial a **Fernanda Evers, Luís Daniel Barros** e aos Professores Doutores **João Luiz Garcia e Selwyn Headley**, obrigada pela ajuda, receptividade, paciência e ensinamentos.

Ao meu amigo, motorista da prefeitura, **Veridiano** por todo companheirismo, por me ajudar a ir de casa em casa atrás dos carroceiros, para a coleta de sangue. E a todos os funcionários da prefeitura que me ajudou com os proprietários rurais.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. **Francisco Cláudio Dantas Mota** por na ausência física do meu orientador me auxiliar em todos os momentos em que precisei. E por fim ao meu orientador, Prof. Dr. **João Paulo Elsen Saut** pela paciência, apoio, dedicação e por me ensinar grande parte de meus conhecimentos sobre grandes animais. Obrigada por me aconselhar, me aceitar e me conduzir durante minha residência e mestrado.

## SUMÁRIO

	Página
<b>CAPITULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	11
Referências.....	19
 <b>CAPITULO 2 – PREVALÊNCIA DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i> E ANÁLISE DOS FATORES DE RISCO EM EQUÍDEOS DO SUDESTE DO BRASIL.....</b>	 28
Resumo.....	28
Abstract.....	29
1. Introdução.....	30
2. Material e Métodos.....	31
2.1. População estudada.....	31
2.1.1. Local de coleta e amostragem.....	31
2.1.2. Coleta de Sangue.....	33
2.1.3. Reação de Imunofluorescência indireta – RIFI.....	34
2.1.4. Reação em cadeia da Polimerase – PCR.....	34
2.2. Análise estatística.....	35
3. Resultados.....	35
4. Discussão.....	39
5. Conclusão.....	43
Referências .....	43
 <b>CAPITULO 3 – PREVALÊNCIA DE <i>NEOSPORA SPP.</i> E ANÁLISE DOS FATORES DE RISCO EM EQUÍDEOS DO SUDESTE DO BRASIL.....</b>	 50
Resumo.....	50
Abstract.....	51
1. Introdução.....	52
2. Material e Métodos.....	53
2.1. População estudada.....	53
2.1.1. Local de coleta e amostragem.....	53
2.1.2. Coleta de Sangue.....	55
2.1.3. Reação de Imunofluorescência indireta – RIFI.....	55

2.1.4. Reação em cadeia da Polimerase – PCR.....	56
2.2. Análise estatística.....	56
3. Resultados.....	57
4. Discussão.....	60
5. Conclusão.....	64
Referências .....	65
APÊNDICES .....	74
APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO EQUÍDEOS.....	74
APÊNDICE B – COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA/UFU).....	75

## LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2	Página
<b>Tabela 1.</b> Prevalência da infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> na Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em equídeos do Município de Uberlândia – MG.....	36
<b>Tabela 2.</b> Fatores de risco associados à infecção por <i>Toxoplasma spp.</i> na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em equídeos da zona rural do município de Uberlândia.....	37
<b>Tabela 3.</b> Fatores de risco associados à infecção por <i>Toxoplasma spp.</i> na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em equídeos da zona urbana do município de Uberlândia.....	38
<b>Tabela 4.</b> Fatores de risco associados à infecção por <i>Toxoplasma spp.</i> na Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em equídeos da zona rural do município de Uberlândia.....	38
<b>Tabela 5.</b> Fatores de risco associados à infecção por <i>Toxoplasma spp.</i> na Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em equídeos da zona urbana do município de Uberlândia.....	39
CAPÍTULO 3	
<b>Tabela1.</b> Prevalência da infecção por <i>Neospora spp.</i> na Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em equídeos do Município de Uberlândia-MG.....	57
<b>Tabela 2.</b> Fatores de risco associados à infecção por <i>Neospora spp.</i> na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em equídeos da zona rural do município de Uberlândia.....	59
<b>Tabela 3.</b> Fatores de risco associados à infecção por <i>Neospora spp.</i> na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em equídeos da zona urbana do município de Uberlândia.....	59
<b>Tabela4.</b> Prevalência da infecção por <i>Neospora spp.</i> na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em equídeos com e sem histórico de abortamento no Município de Uberlândia-MG.....	60

## LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1	Página
<b>Figura 1.</b> Mapa de Uberlândia (Minas Gerais – Brasil), mostrando a divisão geográfica do Município em Conselhos e a quantidade de amostras de sangue de equídeos coletadas em cada local.....	32
<b>Figura 2.</b> Porcentagem de animais positivos para <i>Toxoplasma gondii</i> , distribuídos por distritos na zona rural e Perímetro urbano do Município de Uberlândia- MG.....	36
CAPITULO 2	
<b>Figura 1.</b> Mapa de Uberlândia (Minas Gerais – Brasil), mostrando a divisão geográfica do Município em Conselhos e a quantidade de amostras de sangue de equídeos coletadas em cada local.....	54
<b>Figura 2.</b> Porcentagem de animais positivos para <i>Neospora spp.</i> , distribuídos por distritos na zona rural e Perímetro urbano do Município de Uberlândia- MG.....	58

## **PREVALÊNCIA DE *Toxoplasma gondii* E *Neospora* spp E ANÁLISE DOS FATORES DE RISCO EM EQUÍDEOS DO SUDESTE DO BRASIL**

**RESUMO** - Este estudo avaliou a prevalência e análise dos fatores de risco do *Neospora* spp. e *Toxoplasma gondii* em equídeos (cavalos, mulas e pôneis), dentro de áreas rurais e urbanas do Município de Uberlândia. Amostras de soro de 257 equídeos, foram avaliadas para a presença de anticorpos contra *Neospora* spp.e *T. gondii* por meio do teste de Imunofluorescência indireta (IFI) e diagnóstico molecular através do método de Reação em cadeia Polimerase (PCR). Além disso, um inquérito epidemiológico foi realizado para avaliar os possíveis fatores de risco (grupo genético, idade, gênero, atividade econômica, histórico de abortamento, contato com animais domésticos e silvestres e ECC). Das 257 amostras sanguíneas avaliadas, 13,2% (34/257) resultaram em positivas na IFI para *Neospora* spp. e na PCR foi encontrada a prevalência geral de 1,2% (3/257). Houve diferença significativa ao comparar a frequência de animais positivos entre as técnicas. Dos fatores pesquisados a idade foi considerada fator de risco para o *Neospora* spp. Em relação ao *Toxoplasma gondii*, 9,7% (25/257) resultaram em positivas na IFI, e na PCR foram 10,9% (28/257). Ao comparar zona rural e urbana, apenas na PCR houve diferença estatística significativa. Na IFI somente o gênero e a idade foram considerados fatores de risco. Na técnica da PCR, o único fator de risco significativo foi o grupo genético. Logo, concluiu-se que há a presença de *Toxoplasma gondii* e *Neospora* spp. distribuídos em todo o município de Uberlândia e sua prevalência independe de ser zona rural ou urbana. Sendo o grupo genético, idade e gênero considerados fatores de risco para o *Toxoplasma gondii* e a idade para o *Neospora* spp.

**Palavras-chave:** Epidemiologia, PCR, RIFI

## **PREVALENCE OF *Toxoplasma gondii* and *Neospora* spp AND ANALYSIS OF RISK FACTORS IN HORSES OF SOUTHEASTERN BRAZIL**

**ABSTRACT** - This study evaluated the prevalence and analysis of risk factors for *Neospora* spp. and *Toxoplasma gondii* in horses (horses, mules and ponies), within rural and urban areas of Uberlândia. Serum samples from 257 horses were evaluated for the presence of antibodies against *Neospora* spp.e *T. gondii* by the indirect immunofluorescence assay (IFA) and molecular diagnosis by the method of polymerase chain reaction (PCR). In addition, a survey was conducted to evaluate the possible risk factors (genetic group, age, gender, economic activity, history of miscarriage, contact with domestic and wild animals and ECC). Of 257 blood samples evaluated, 13.2% (34/257) had a positive by IIF for *Neospora* spp. PCR and the overall prevalence of 1.2% (3/257) was found. There was a significant difference when comparing the frequency of positive animals between techniques. Of the factors studied, age was considered a risk factor for *Neospora* spp. Compared to *Toxoplasma gondii*, 9.7% (25/257) had a positive by IIF, and PCR were 10.9% (28/257). When comparing rural and urban areas, only the PCR was no statistically significant difference. By IIF only gender and age were risk factors. On the PCR technique, the only significant risk factor was the genetic group. Therefore, it is concluded that there is a *T. gondii* and *Neospora* spp. distributed throughout the city of Uberlândia and its prevalence is independent of rural or urban area. Being the genetic group, age and gender considered risk factors for *Toxoplasma gondii* and *Neospora* spp age for.

**Keywords:** Epidemiology, PCR, IFA

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

*Toxoplasma gondii* e *Neospora spp.* são protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa e família Sarcocystidae, sendo importantes agentes patogênicos causadores de abortos em animais de produção e perdas econômicas significativas (DUBEY; KERBER; GRANSTROM, 1999).

O *Toxoplasma* é um coccídeo intracelular obrigatório, que infecta naturalmente os homens, animais domésticos e selvagens, e também pássaros (KAWAZOE, 2005). Apresenta três estágios unicelulares infectantes: taquizoítos, bradizoítos (contidos em cistos teciduais) e esporozoítos (contidos em oocistos) (MONTOYA e LIESENFELD, 2004).

Seu ciclo biológico é do tipo heteroxeno, com uma fase coccidiana que ocorre nas células intestinais de felídeos domésticos ou selvagens não imunes e outra fase assexuada, que ocorre no hospedeiro intermediário (mamíferos, incluindo o ser humano e aves) ou no hospedeiro definitivo (REMINGTON et al., 2001).

A fase sexuada do ciclo ocorre quando esporozoítos, bradizoítos ou taquizoítos penetram no epitélio intestinal dos hospedeiros definitivos e se multiplicam por endodiogenia e originam vários merozoítos. Estes se formam no interior de vacúolos parasitóforos, podendo romper as células epiteliais e infectar outras de mesma origem. Nestas os merozoítos originarão as formas sexuais masculinas e femininas, caracterizando a fase sexuada do ciclo enteroepitelial (DUBEY, 2010).

Essas formas sofrem mutação e originarão os microgametas (gametas masculinos móveis) e os macrogametas (gametas femininos imóveis). Os microgametas abandonam a célula de origem e fecundam os macrogametas no interior de uma célula epitelial, originando o zigoto. Este evolui para o oocisto ainda no epitélio e é liberado junto com as fezes, ainda imaturo. No meio ambiente, sob condições adequadas, o oocisto sofre maturação, após um processo de esporogonia, e contém esporozoítos os quais são infectantes (DUBEY, 2010). E podem ficar no meio ambiente por vários anos, podendo

ser ingeridos por outros animais, até mesmo pelo ser humano (MONTOYA e LIESENFELD, 2004).

A transmissão oral ocorre quando os oocistos ou cistos são ingeridos por hospedeiros intermediários. Os esporozoítos ou bradizoítos infectam o epitélio intestinal produzindo formas assexuadas (taquizoítos) que penetram em células nucleadas, desenvolvem pseudocistos e se multiplicam rapidamente por endodiogenia, ocorrendo, assim, uma infecção aguda, que dissemina o parasito por todo o organismo do hospedeiro vertebrado. Após alguns dias da infecção sistêmica pelos taquizoítos, ocorre o desenvolvimento de outro estágio do ciclo, a formação de cistos teciduais contendo bradizoítos (MONTOYA e LIESENFELD, 2004).

Estes cistos podem se desenvolver em qualquer órgão visceral, incluindo pulmões, fígado e baço, mas a maior prevalência tem sido verificada em tecidos neurais e musculares, como cérebro, olhos e musculatura esquelética estriada ou cardíaca, nos quais permanecem por toda a vida do indivíduo. Estes cistos teciduais também são importantes fontes de infecção tanto para os animais carnívoros como para o homem, quando ingeridos junto com carne crua ou mal cozida (MONTOYA e LIESENFELD, 2004).

Apesar de sua grande distribuição mundial, ampla gama de hospedeiros e da presença de uma fase sexual no seu ciclo biológico, o *T. gondii* apresenta baixa variação genética (YAI, 2007). As amostras atualmente conhecidas do protozoário possuem similaridades antigênicas, morfológicas e semelhanças na capacidade de infectar vários hospedeiros. Porém, apesar do gênero *Toxoplasma* ser considerado monoespecífico (SILVEIRA, 2009), tem sido realizado a caracterização genotípica de diferentes isolados do patógeno por meio de métodos moleculares (YAI, 2007).

Assim, foi possível descrever subpopulações do *T. gondii* em várias regiões do mundo. Desta forma, a maioria dos isolados desse protozoário, de humanos e animais, na América do Norte, Europa e África foram agrupados em uma das três linhagens clonais conhecidas como tipo I, II e III (SU et al., 2010). No Brasil, foram detectados os genótipos de *T. gondii* dos tipos I e III, este último apresentando um variado padrão de virulência em amostras de várias espécies de animais domésticos (DUBEY et al., 2007).

A infecção humana por *T. gondii* tem elevada prevalência no Brasil e ocorre pela ingestão de alimentos, principalmente, carnes cruas ou mal cozidas e água contaminada por oocistos (TENTER; HECKROTH; WEISS, 2000). A importância do oocisto livre ou do cisto tecidual na transmissão varia de acordo com a região, o grupo étnico e os hábitos alimentares de cada população. A água parece ter papel mais importante do que anteriormente imaginado, já que surtos relacionados a fontes de água contaminadas têm sido frequentemente relatados (DUBEY et al., 2004). A contaminação nos herbívoros ocorre pela ingestão de gramíneas e rações contaminadas pelo oocisto; já nos carnívoros, pelo consumo de carne crua ou mal cozida infectadas com os cistos teciduais deste parasita (DUBEY et al., 1994).

Os hospedeiros intermediários apresentam como sintomatologia clínica a diarreia, pneumonia, conjuntivite, ou até aborto, mas normalmente estas infecções toxoplásmicas são assintomáticas. Em equinos, também está associada a distúrbios nervosos e no aparelho locomotor (DUBEY et al., 1974). Uma vez que esta doença pode se manifestar de várias formas e o quadro clínico pode ser facilmente confundido com outras doenças infecciosas tais como leptospirose, brucelose, sarcocistose, neosporidiose e algumas viroses, torna-se necessário o diagnóstico laboratorial desta enfermidade (VIDOTTO, 1992).

O contato dos hospedeiros com o protozoário estimula a produção de anticorpos (TENTER; HECKROTH; WEISS, 2000). Assim, estudos epidemiológicos baseados em exames sorológicos servem para avaliar, além da ocorrência da infecção, o risco que seres humanos e animais estão expostos em relação à toxoplasmose. Embora os dados sorológicos indiquem que a infecção no homem e animais seja comum em muitas partes do mundo, em sua grande maioria é de natureza benigna ou completamente assintomática (PERDONCINI et al., 2010).

Assim a sorologia continua a ser a principal abordagem para estabelecer um diagnóstico de toxoplasmose. Ela baseia-se na pesquisa de anticorpos de diferentes classes de imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA e IgE) anti-*T. gondii*. A reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é considerada de boa especificidade e sensibilidade e tem sido empregada para amplificar o

sinal de fluorescência e aumentar a sensibilidade. Essa reação tem a vantagem de utilizar parasitos preservados, fixados em lâminas de microscopia, o que é muito prático e seguro para a rotina laboratorial (CAMARGO, 2001).

Estudos sorológicos da toxoplasmose em equinos são escassos, embora alguns levantamentos tenham sido realizados em diferentes regiões do Brasil, como Mato Grosso do Sul (LARANJEIRA et al., 1985; VIDOTTO et al., 1997), São Paulo (COSTA et al. 1986; VIDOTTO et al., 1997), Paraná (GARCIA et al., 1999; VIDOTTO et al., 1997; CONTENTI et al., 2002), Mato Grosso (VIDOTTO et al., 1997) e Minas Gerais (NAVES et al., 2005).

Diversas pesquisas demonstram a capacidade da PCR em amplificar fragmentos específicos de DNA de *Toxoplasma spp.* a partir de diferentes fluidos corporais (WEISS, 1995), tais como sangue (KHALIFA, 1994), líquido amniótico (GROVER et al., 1990), líquor (DUPON et al., 1995), humor aquoso (BOU et al., 1999), fluido de lavado bronco-alveolar (ROTH et al., 1992) e até urina (FUENTES et al., 1996).

A análise do sangue em casos de pacientes com toxoplasmose cerebral por PCR, só será positiva se houver disseminação ou passagem do parasito para o sangue, tal como ocorre na etapa aguda dessa parasitose e se os pacientes não estiverem recebendo qualquer tratamento terapêutico ou profilático (KHALIFA, 1994). Nos casos de baixa parasitemia pode ser o método de escolha, permitindo a detecção do parasito e apontando uma interpretação mais exata da etapa de infecção pelo *T. gondii* (KOMPALIC-CRISTO; BRITTO; FERNANDES, 2005).

O diagnóstico da toxoplasmose é ainda hoje baseado na sorologia, e as técnicas moleculares se encontram em etapas recentes de avaliação. É muito cedo para determinar uma técnica padrão-ouro diferente da sorologia, uma vez que os diferentes sistemas descritos na literatura se mostram efetivos, mas nem sempre reproduzíveis ou com baixa especificidade. Falta muito ainda a percorrer nesse mundo da biologia molecular encaminhada à aplicação de uma técnica para o diagnóstico de uma parasitemia tão pouco conhecida como a produzida pelo *T. gondii* (KOMPALIC-CRISTO; BRITTO; FERNANDES, 2005).

Outro parasita de importância clínica para os equídeos é o *N. caninum*, morfológicamente semelhante ao *T. gondii*, porém, difere deste pelas características de ultraestrutura, imunogenicidade e patogenicidade (DUBEY; LINDSAY, 1993). Dubey e Porterfield (1990) relataram o primeiro caso de neosporose em um feto equino abortado, nos Estados Unidos, os taquizoítos de *N. caninum* foram observados no pulmão desse feto, indicando que o parasita pode ser transmitido via transplacentária. A partir deste fato surgiram relatos de neosporose em fetos prematuros, animais recém-nascidos e em adultos, manifestando as mais diversas lesões e consequente sintomatologia clínica (GUIMARÃES JUNIOR e ROMANELLI, 2006).

No gênero *Neospora* duas espécies são conhecidas, *Neospora caninum* e *Neospora hughesi*, que são parasitas intracelulares obrigatórios. O *N. hughesi* foi descrito por Marsh et al. (1998), que isolaram o protozoário de um cavalo que apresentava sinais compatíveis com a mieloencefalite protozoária equina (EPM). Esta descoberta estabeleceu o *N. hughesi* como mais um potencial agente etiológico da EPM, aumentando a importância do diagnóstico deste parasita em equinos. No Brasil há relatos de mieloencefalite equina de elevada soroprevalência para *Sarcocystis neurona* (DUBEY; KERBER; GRANSTROM, 1999).

McAllister et al. (1998) e Gondim et al. (2004) demonstraram experimentalmente que cães e coiotes são hospedeiros definitivos do *N. caninum*, que se infectam ingerindo tecidos de bovinos e de outras espécies as quais contenham cistos, além da ingestão de oocistos esporulados livres no meio-ambiente (transmissão horizontal). A infecção transplacentária é a principal via de infecção em bovinos e pouco frequente em cães, sendo também relatada em equinos, ovinos, caprinos, suínos, gatos, camundongos e macacos. Devido ao fato da infecção fetal frequentemente não resultar em abortamento, fêmeas podem nascer infectadas congenitamente e transmitir o agente para seus descendentes em futuras gestações (ANDERSON; ADRIANAVIRO; CONRAD, 2000). Esta modalidade de transmissão pode ocorrer por várias gestações (BARR et al., 1993).

A infecção congênita de *Neospora spp.* foi observada em fetos e potros equinos, com cegueira congênita (DUBEY e PORTERFIELD, 1990).

Anticorpos anti – *Neospora spp.* foram detectados em amostras séricas pré-colostrais de potros clinicamente sadios, indicando que o parasita foi transmitido via vertical (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006).

A placenta dos equinos é classificada como difusa epiteliocorial microcotiledonária, a qual não possibilita a transferência de imunoglobulinas da égua para seu feto (LeBLANC, 1990). Também o feto equino é capaz de formar uma resposta imune humoral se exposto a um antígeno após 180 dias de gestação (COOK et al., 2001). Mesmo assim suspeitava-se que poderia ocorrer infecção transplacentária em equinos (DUBEY e PORTIFIELD, 1990; TOSCAN et al., 2010), e que somente foi comprovada, recentemente, com o *N. hughesi* (PUSTERLA et al., 2011).

O ciclo biológico do *N. hughesi* ainda não foi totalmente esclarecido. O hospedeiro definitivo é desconhecido, assim como outros possíveis hospedeiros intermediários, que não os equídeos (HOANE et al., 2006). Por consequência, ainda não se confirmou a rota natural da infecção horizontal por *N. hughesi* nestes animais. O *N. caninum* possui em seu ciclo de vida um estágio resistente (oocisto contendo esporozoítos), excretado nas fezes dos hospedeiros definitivos, um estágio de multiplicação lenta com encistamento tecidual (bradizoíto), presente nos tecidos de animais infectados; além de um estágio de multiplicação rápida (taquizoíto), que é o principal responsável pelas lesões teciduais em animais enfermos (BUXTON; MCALLISTER; DUBEY, 2002).

Os cães eliminam oocistos não esporulados nas fezes, muito similar aos de *Hammondia heydorni* do cão, *Hammondia hammondi* e *T. gondii* do gato. Os oocistos esporulam em 24 a 72 horas, ficando cada oocisto esporulado com dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos (LINDSAY; DUBEY; McALLISTER, 1999).

Quando o hospedeiro intermediário ingere o oocisto esporulado, ocorre a liberação dos esporozoítos na luz intestinal, que penetram nas células da parede e passam a se chamar taquizoítos, onde se dividem rapidamente e podem penetrar em diversas células do hospedeiro (macrófagos, polimorfonucleares, neurônios, fibroblastos, endotélio vascular, miócitos, células tubulares renais e hepatócitos) causando severas lesões em

diferentes órgãos. Alguns se transformam em bradizoítos, dentro de cistos de parede espessa, permanecendo latentes, em lenta divisão (LINDSAY; DUBEY; McALLISTER, 1999). Os bradizoítos são resistentes a soluções pépticas e ácidas indicando que seu ciclo pode envolver a ingestão por carnívoros (DUBEY e LINDSAY, 1996).

Ao infectarem os equinos o *N. caninum* e *N. hughesi* podem provocar diferentes sinais clínicos associados a problemas reprodutivos ou a distúrbios neurológicos como ataxia dos membros pélvicos e, ocasionalmente, dos quatro membros, e dificuldade de deambulação que se acentua quando o animal caminha com a cabeça ereta ou em círculos (DUBEY et al., 2001). Além destes sintomas podem causar cegueira, perda de peso, comportamento bizarro, dificuldade de mastigação e aborto (WALSH et al., 2000). Devido a esses sinais inespecíficos da neosporose o diagnóstico clínico é dificultado, logo o diagnóstico laboratorial deve ser realizado para confirmar essa infecção (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006 ).

São utilizados para o diagnóstico alguns métodos sorológicos tais como imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), soroaglutinação direta e Western blot, além de métodos parasitológicos como o histopatológico, imunohistoquímico, isolamento *in vitro* e *in vivo* e a detecção do DNA do parasita pela PCR (HOANE et al., 2006).

Existem inúmeros estudos epidemiológicos de infecção por *N. caninum* realizados por meio de testes sorológicos (HEMPHILL e GOTTSSTEIN, 2000). Contudo, suspeita-se que a identificação de animais soropositivos para *N. caninum* pode ser prejudicada devido à reatividade cruzada com outros protozoários, principalmente *N. hughesi* e *H. heydorni* (GONDIM et al., 2009).

Não há teste sorológico disponível, até o momento, capaz de discriminar anticorpos anti - *N. caninum* de anticorpos anti- *N. hughesi*. É desconhecido o potencial deste último de infectar outras espécies animais, portanto, os inquéritos sorológicos realizados para a detecção de anticorpos anti - *N. caninum* podem, em parte, corresponder a infecções por *N. hughesi* (GONDIM et al., 2009).

A presença de anticorpos séricos para *Neospora spp.* indica a exposição ao protozoário ou a um parasita estritamente relacionado passível

de reação cruzada, não indicando necessariamente a existência de uma infecção ativa (VARDELEON et al., 2001).

Estudos sorológicos da neosporose em equinos são escassos, embora alguns levantamentos tenham sido realizados em diferentes regiões do Brasil, em Santa Catarina (MOURA et al., 2013), Paraná (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006; HOFFMANN-KORMANN et al., 2008; VILLALOBOS et al., 2012), Rio Grande do Sul (SANGIONI et al., 2011; TOSCAN et al., 2010), e São Paulo, Minas Gerais, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Rondônia e Bahia (HOANNE et al., 2006).

Nos últimos anos, o diagnóstico da neosporose e toxoplasmose melhorou devido ao desenvolvimento de ensaios de PCR, que permitem uma identificação rápida e altamente sensível do parasita, através da amplificação e subsequente demonstração de sequências de DNA específicas do parasita (YAMAGE; FLECHNER; GOTTSSTEIN, 1996).

Portanto, tendo em vista a escassez de levantamentos epidemiológicos sobre as enfermidades que acometem equídeos na região e a proximidade de um frigorífico especializado em abate de equídeos para exportação a diversos países no mundo, objetivou-se com este estudo determinar a prevalência do *Toxoplasma gondii* e *Neospora spp.* em equídeos do município de Uberlândia, utilizando a técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em cadeia da polimerase (PCR), comparando a prevalência entre as zonas rural e urbana, além de avaliar a influência dos fatores grupo genético, gênero, idade, utilização/atividade exercida, histórico de abortamento e contato com gatos, cães e animais selvagens.

## REFERÊNCIAS

ANDERSON, M. L.; ANDRIANAVIRO, A. G.; CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.2, n.60/61, p.417-431, 2000.

BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; BREITMEYER, R.; SUERLOW, K.; ANDERSON, M. L.; REINOLDS, J.; CHAUVET, A. E.; DUBEY, J. P.; ARDANS, A. A. Congenital Neospora infection in calves born from cows that had previously aborted Neospora-infected fetuses: four cases (1990-1992). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.202, n.1, p.113-117, 1993.

BOU, G. FIGUEROA, M.S.; MARTI-BELDA, P.; NAVAS, E.; GUERRERO, A. Value of PCR for detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor and blood samples from immunocompetent patients with ocular toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 11, p. 3465-8, 1999.

BUXTON, D.; MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.: The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**. v.18, p.546-552, 2002.

CAMARGO, M. E.; **Toxoplasmose**. In: FERREIRA, A. W, ÁVILA, S. L. M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 278-286.

CONTENTI, A. P. A.; TSUTSUI, V. S.; PRUDENCIO, L. B.; MARANA, E. R. M.; REICHMANN, P.; NARARRO, T. Estudo soroepidemiológico de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em eqüinos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina – PR. In: XI ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2002, Maringá – PR, **Anais...** Maringá. 2002.

COOK, A.G., BUECHNER-MAXWELL, V., MORROW, J.K., WARD, D.L., PARKER, N.A., DASCANIO, J.J., LEY, W.B., COOPER, W. Interpretation of the

detection of *Sarcocystis neurona* antibodies in the serum of young horses. **Veterinary Parasitology**, v.95, p.187-195, 2001.

COSTA, A. J.; ISHIZUCA, M. M.; MARQUES, L. C.; VIDOTTO, O.; ROCHA, U. F.; IKEDA, A. Toxoplasmosis frequency in equines from the north region of São Paulo State, Brazil. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v.2, n. 1, p. 75-79, 1986.

DUBEY, J.P., DAVIS, G.W., KOESTNER, A., KIRYU, K. Equine encephalomyelitis due to a protozoan parasite resembling *Toxoplasma gondii*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 165, p. 249-255, 1974.

DUBEY, J. P.; PORTERFIELD, M. L. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.76, n.5, p.732-734, 1990.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis. **Parasitology Today**, Amsterdam. v.9, n.12, p.452-458, 1993.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 205, n.11, p. 1593-8, dec. 1994.

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

DUBEY, J. P.; KERBER, C. E.; GRANSTROM, D. E.; Serologic prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses in Brazil. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 215, n. 7, p. 970-972, oct. 1999.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SAVILLE, W. J. A.; REED, S. M.; GRANSTROM, D. E.; SPEER, C. A. A review of *Sarcocystis neurona* and

equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 95, n. 2-4, p. 89 -131, fev. 2001.

DUBEY, J.P.; NAVARRO, I.T.; SREEKUMAR, C.; DAHL, E., FREIRE, R.L.; KAWABATA, H.H.; VIANNA, M.C.; KWOK, O.C.; SHEN, S.K.; THULLIEZ, P.; LEHMANN, T. Toxoplasma gondii infections in cats from Parana, Brazil: Seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic Characterization of isolates. **Journal of Parasitology**, Lawrence. v. 90, n.4, p. 721-726, ago. 2004.

DUBEY, J. P.; RAJAPAKSE, R. P. V. J.; WIJESUNDERA, R. R. M. K. K.; SUNDAR, N.; VELMURUGAN, G. V.; KWOK, O. C. H.; SU, C. Prevalence of Toxoplasma gondii in dogs from Sri Lanka and genetic characterization of the parasite isolates. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.146, n.3-4, p.341-346, 2007.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmoses of animals and humans**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2010. 338 p.

DUPON, M.; CAZENAVE, J.; PELLEGRIN, J.L.; RAGNAUD, J.M.; CHEYROU, A.; FISCHER, I.; LENG, B.; LACUT, J.Y. Detection of Toxoplasma gondii by PCR and tissue culture in cerebrospinal fluid and blood of human immunodeficiency virus-seropositive patients. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 33, n. 9, p. 2421-6, 1995.

FUENTES, I. RODRIGUEZ, M.; DOMINGO, C.J.; DEL CASTILLO, F.; JUNCOSA, T.; ALVAR, J. Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 34, n. 10, p. 2368-71, 1996.

GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R.C. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii*, em suínos, bovinos, ovinos e equinos e sua correlação

com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do Norte do Paraná-Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 1, p. 91-97, mar. 1999.

GONDIM, L. F. P.; McALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.34, n.2, p.159-161, feb. 2004.

GONDIM, L.F.P.; LINDSAY, D.S.; McALLISTER, M.M. Canine and bovine *Neospora caninum* control sera examined for cross-reactivity using *Neospora caninum* and *Neospora hughesi* indirect fluorescent antibody tests. **Journal of Parasitology**. v.95,n.,p . 86-88, 2009.

GROVER, C. M.; THULLIEZ, P.; REMINGTON, J.S.; BOOTHROYD, J.C. Rapid prenatal diagnosis of congenital Toxoplasma infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 28, n. 10, p. 2297-301, 1990.

GUIMARÃES JUNIOR, J.S.; ROMANELLI, P. R. Neosporose em Animais Domésticos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 665-678, out./dez. 2006

HEMPHILL, A.; GOTTSSTEIN, B. A European perspective on *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**. v. 30, p. 877-924, 2000.

HOANE, J. S.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; RIBEIRO, M. G.; BORGES, A. S.; YAI, L. E. O.; AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; BONESI, G .L.; HOWE, D. K. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora* spp. Infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 136, n. 2, p. 155-159, mar. 2006.

HOFFMANN-KORMANN, D.C.S.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; RICHARTZ, R.R.T.B.; ANTUNES, J.; DITTRICH, J.R.; PATRÍCIO, L.F.L. Soroprevalência e cinética mensal de anticorpos anti-*Neospora* sp. em éguas gestantes. **Revista**

**Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal. v. 17, n. S1, p. 335-338. 2008.

KAWAZOE, U. 2005. **Toxoplasma gondii**. In NEVES, D.P.E. (Ed.) **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 494p.

KHALIFA, K. E. S., ROTH, A., ROTH, B., ARASTEH, K.N., JANITSCHKE, K. Value of PCR for evaluating occurrence of parasitemia in immunocompromised patients with cerebral and extracerebral toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 11, p. 2813-9, 1994.

KOMPALIC-CRISTO, A.; BRITTO, C.; FERNANDES, O. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 41, n. 4, p. 229-35. Ago. 2005.

LARANJEIRA, N.L.; ISHIZUCA, M.M.; HYAKUTAKE, S. Prevalência da Toxoplasmose eqüina avaliada pela técnica de imunofluorescência indireta no Mato Grosso do Sul, Brasil. **Boletin de la Oficina Sanitaria Panamericana**, Washington, v. 99, n.2, p. 158- 162, 1985

LeBLANC, M.M. **Imunologic considerations**. In: KOTERBA, A.M.; DRUMMOND, W.H.; KOSCH, P.C. **Equine Clinical Neonatology**. Philadelphia: Lea&Febiger, 1990, p. 275-295.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; McALLISTER, M.M. **Neospora caninum and the potential for parasite transmission**. **Compendium**. v.21, p.317-321, 1999.

LINDSAY, D.S. **Neosporosis: An emerging protozoal disease of horses**. **Equine Veterinary Journal**, London. v. 33, n.2, p. 116-118, mar. 2001.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; HOFFMANN, D. C. S.; DITTRICH, J. R.; **Neosporose Equina – Revisão**. **Archives of Veterinary Science**. Curitiba; v.11, n.3, p. 1-10, 2006.

MARSH, A.E.; BARR, B.C.; PACKHAM, A.E. & CONRAD, P.A. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **Journal of parasitology**, Lawrence, v. 84, n.5, p. 983-991, jun. 1998.

McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; McGUIRE, A. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.28, n.9, p.1473-1478, 1998.

MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**. v. 363, p. 1965-1976, 2004.

MOURA, A.B., SILVA, M.O., FARIAS, J.A., VIEIRA-NETO, A., SOUZA, A.P., SARTOR, A.A., FONTEQUE, J.H., BUNN, S. *Neospora* spp. antibodies in horses from two geographical regions of the state of Santa Catarina, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal. v. 22, n. 4, p. 597-601, out.-dez. 2013

NAVES, C. S.; FERREIRA, F. A.; CARVALHO, F. S. R.; COSTA, G. H. N.; Soroprevalência da toxoplasmose em eqüinos da raça mangalarga marchador no município de Uberlândia, Minas Gerais. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 11, n. 1, p. 45-52, 2005.

PERDONCINI, G.; PASQUALI, A. K. S.; MARIANI, F.; CEMBRANEL, D. J.; ESCOPELI, K. S. Prevalência de *Toxoplasma gondii* em aves e suínos: um problema para a saúde pública. **Unoesc & Ciência - ACBS**, Joaçaba, v. 1, n. 1, p. 57-64, 2010.

PUSTERLA, N. et al. Endogenous transplacental transmission of *Neospora hughesi* in naturally infected horses. **Journal of Parasitology**, v.97, n.2, p.281-285, 2011.

REMINGTON, J.S.; McLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G. **Toxoplasmosis.** In: Remington JS, Klein JO, eds. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant.* 5 ed. Philadelphia: WB Saunders, 2001. p. 205-346

ROTH, A.; ROTH, B.; HOFFKEN G.; STEUBER,S.; JANITSCHKE,K. Application of the polymerase chain reaction in the diagnosis of pulmonary toxoplasmosis in immunocompromised patients. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.** v. 11, p. 1177-81, 1992.

SANGIONI, L. A.; BOTTON, S. A.; CARGNELUTTI, J. F.; CADORE, G. C.; CEZAR, A. S.; WEIBLEN, R.; LOPES, S. T. A.; VOGEL, F. S. F. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora* spp. e anti-herpersvírus equino em cavalos de tração no município de Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.2, p. 321-323, fev, 2011.

SILVEIRA, L. H. Caracterização biológica e genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de galinhas de criação livre do Pantanal do Mato Grosso do Sul. 2009. 136 f. **Tese** (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

SU, C.; SHWAB, E. K.; ZHOU, P.; ZHU, X. Q.; DUBEY, J. P. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, London, v. 137, p. 1-11, 2010.

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

TOSCAN, G.; CADORE, G.C.; PEREIRA, R.C.F.; SILVA, G.B.; CEZAR, A.S.; SANGIONI, L.A.; OLIVEIRA, L.S. VOGEL, F.S.F. Neosporose equina: ocorrência de anticorpos anti-*Neospora* spp. e associação entre status

sorológico de éguas e de suas crias. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.8, p. 641-645, 2010.

VARDELEON, D., MARSH, A.E., THORNE, J.G., LOCH, W., YOUNG, R., JOHNSON, P.J. Prevalence of *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from various geographical locations. **Veterinary Parasitology**, v.95, p.273-282, 2001.

VIDOTTO, O. Toxoplasmose: epidemiologia e importância da doença na saúde animal. **Semina: Ciências agrárias**. Londrina, v.13, n.1, p. 69-75, mar.1992.

VIDOTTO, O.; KANO, F. S.; FREIRE, MITSUKA, R.; BONESI, G.; NAVARRO, I. T.; FRANCISCON, F. S. G.; Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em eqüinos procedentes de quatro Estados (SP, PR, MS e MT) abatidos em Apucarana, Paraná, Brasil. **Semina: Ciencias Agrárias**. Londrina, v. 18, n.1, p. 9-13, mar. 1997.

VILLALOBOS, E.M.; FURMAN, K.E.; LARA, M.C.; CUNHA, E.M.; FINGER, M.A.; BUSCH, A.P.; BARROS FILHO, I.R.; DECONTI, I.; DORNBUSCH, P.T.; BIONDO, A.W. Detection of *Neospora* sp antibodies in cart horses from urban areas of Curitiba, Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**. v. 21, n.1, p.68–70. 2012.

YAI, L. E. O. Caracterização biológica e genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) do Estado de São Paulo. 2007. 138 f. **Tese** (Doutorado em Epidemiologia experimental aplicada às zoonoses) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo.

YAMAGE, M.; FLECHNER, O.; GOTTSSTEIN, B. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain “cyst” DNA of experimentally-infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). **Journal of Parasitology**. v.82, p.272–279, 1996.

WALSH, C.P.; DUNCAN, R.B.; ZAJAC, A.M.; BLAGBURN, B.L.; LINDSAY, D.S. *Neospora hughesi*: Experimental infections in mice, gerbils and dogs. **Veterinary Parasitology**, v.98, p. 119-129, 2000.

WEISS, J. B. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections **Journal of Clinical Microbiology**. v. 8, n. 1, p. 113-30, 1995.

## CAPÍTULO 2- PREVALÊNCIA DE *TOXOPLASMA GONDII* E ANÁLISE DOS FATORES DE RISCO EM EQUÍDEOS DO SUDESTE DO BRASIL

**RESUMO** - Este estudo avaliou a prevalência e análise dos fatores de risco do *Toxoplasma gondii* em equídeos (cavalos, mulas e pôneis), dentro de áreas rurais e urbanas do Município de Uberlândia, Minas Gerais. Amostras de soro de 257 equídeos foram avaliadas para a presença de anticorpos contra *T. gondii* por meio do teste de Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) e diagnóstico molecular pelo método de Reação em cadeia da Polimerase (PCR). Além disso, um inquérito epidemiológico foi realizado para avaliar os possíveis fatores de risco (grupo genético, idade, gênero, utilização/atividade exercida, ECC e contato com animais domésticos e silvestres). Das 257 amostras, 9,7% (25/257) resultaram em positivas na RIFI para *T. gondii*, sendo que 11% (16/145) no meio rural e de 8% (9/112) no meio urbano. Já na PCR foram 10,9% (28/257) de amostras positivas, com prevalências de 17,2% (25/145) e 2,7% (3/112), respectivamente, na zona rural e urbana. Houve diferença na prevalência avaliada através da PCR entre as zonas rural e urbana. O gênero e a idade foram considerados fatores de risco na RIFI. Os machos foram considerados menos susceptíveis quando comparados às fêmeas e os animais maiores que cinco anos apresentaram maior susceptibilidade do que os mais jovens. Na técnica da PCR, o único fator de risco significativo foi o grupo genético, pôneis apresentaram maior prevalência em relação aos cavalos e mulas. Concluiu-se que há a presença de *Toxoplasma gondii* distribuído em todo o município de Uberlândia e sua prevalência depende de ser zona rural ou urbana; os grupo genético, idade e gênero foram considerados fatores de risco para a doença na zona rural.

**Palavras-chave:** Epidemiologia, Reação de Imunofluorescência indireta, Reação em cadeia da polimerase, Toxoplasmose

## PREVALENCE OF *TOXOPLASMA GONDII* AND ANALYSIS OF RISK FACTORS IN EQUIDAE OF SOUTHEASTERN BRAZIL

**ABSTRACT** - This study evaluated the prevalence and analysis of risk factors of *Toxoplasma gondii* in horses (horses, mules and ponies), within rural and urban areas of Uberlândia, Minas Gerais. Serum samples from 257 horses were evaluated for the presence of antibodies to *T. gondii* by the indirect Immunofluorescence assay (IFA) and by molecular method of Polymerase Chain Reaction (PCR) diagnosis. In addition, a survey was conducted to evaluate the possible risk factors (genetic group, age, gender, use / activity performed, ECC and contact with domestic and wild animals). Of the 257 samples, 9.7% (25/257) had a positive IFAT for *T. gondii*, and 11% (16/145) in rural areas and 8% (9/112) in the urban environment. Already in the PCR were 10.9% (28/257) of samples positive, with prevalence rates of 17.2% (25/145) and 2.7% (3/112), respectively, in rural and urban areas. Differences in prevalence assessed by PCR between rural and urban areas. The gender and age were risk factors in the IFAT. Males were considered less likely when compared to females and larger than five years animals showed higher susceptibility than younger. On the PCR technique, the only significant risk factor was the genetic group, ponies showed higher prevalence compared to horses and mules. It was concluded that there is the presence of *Toxoplasma gondii* distributed throughout the city of Uberlândia and their prevalence depends on being rural or urban areas; the genetic group, age and gender were risk factors for the disease in rural areas.

**Key words:** Epidemiology, Immunofluorescence indirect, reaction of polymerase chain, Toxoplasmosis,

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem o quarto maior rebanho equino do mundo, com 5,8 milhões de animais, atrás dos Estados Unidos, China e México (ASSESSORIA DE COMUNICAÇÃO - CNA, 2010). Este rebanho movimenta R\$ 7,3 bilhões de reais por ano, emprega 640 mil pessoas no Brasil e tem grande parte de sua sede no Estado de Minas Gerais (MG). Em 2006, este estado foi apontado pela Confederação Nacional de Agricultura (CNA) como o maior produtor de cavalos do país, o que representa cerca de 800 mil animais (VIEIRA; REZENDE; LANA, 2011).

No país, os equinos são tradicionalmente criados para o esporte e recreação (EVERS et al., 2013), sendo que uma de suas principais funções é o trabalho diário nas atividades agropecuárias (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2014). Além disso, há os carroceiros que representam uma categoria de trabalhadores que compõe o mercado informal, exercendo suas atividades nos centros urbanos das diferentes regiões do país (BARBOSA et al., 2011). Logo, no Brasil, os equídeos não são direcionados para o abate, no entanto há estabelecimentos brasileiros licenciados para abater este tipo de animal com sua produção exclusiva para exportação (EVERS et al., 2013).

O papel dos cavalos na transmissão de zoonoses parasitárias, seja como fonte de infecção para vetores ou responsável pela contaminação dos hospedeiros definitivos, está ganhando importância mundial (KOUAM et al., 2010). Entre estas enfermidades, destaca-se a toxoplasmose como uma das doenças mais comuns e de ampla distribuição geográfica. Estima-se que mais de um terço das pessoas do mundo já foram expostas à infecção deste parasita (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

O *Toxoplasma gondii* pertence ao filo Apicomplexa e família Sarcocystidae, é considerado importante agente patogênico causador de abortos em animais de produção e responsável por perdas econômicas significativas (DUBEY; KERBER; GRANSTROM, 1999). Ele tem como hospedeiros definitivos todos os felídeos e, como hospedeiros intermediários todos os mamíferos, dentre eles o próprio felídeo, o homem e o equino. O

cavalo parece ser uma das espécies animais mais resistentes ao desenvolvimento clínico da toxoplasmose (CONTENTI et al., 2002).

A infecção nos herbívoros ocorre pela ingestão de gramíneas e rações contaminadas pelo oocisto; já nos carnívoros, incluindo o homem, através do consumo de carne crua ou mal cozida infectada com os cistos teciduais do *T. gondii* (DUBEY, 1994). Os hospedeiros intermediários apresentam como sintomatologia clínica a diarreia, pneumonia, conjuntivite e abortos. Em equinos, a infecção também está associada a distúrbios nervosos e alterações no aparelho locomotor (DUBEY et al., 1974). De forma geral, as infecções por este parasita em cavalos é subclínica e progressiva e, por este motivo, o diagnóstico apoia-se em grande parte pelas técnicas sorológicas para detecção de anticorpos específicos contra o parasita (ALANAZI e ALYOUSIF, 2011).

Na região sudeste do Brasil, os estudos sorológicos da toxoplasmose em equídeos são escassos, embora vários levantamentos tenham sido feitos em diferentes regiões do Brasil, como Mato Grosso do Sul (LARANJEIRA; ISHIZUCA e HYAKUTAKE, 1985; VIDOTTO et al., 1997), São Paulo (COSTA et al. 1986; VIDOTTO et al., 1997), Mato Grosso (VIDOTTO et al., 1997) e Paraná (VIDOTTO et al., 1997; GARCIA et al., 1999; CONTENTI et al., 2002). Há na literatura somente um levantamento de 12,8% de prevalência de toxoplasmose em três haras na região de Uberlândia, Minas Gerais (NAVES et al., 2005).

Logo, objetivou-se neste estudo realizar o levantamento da prevalência de toxoplasmose em equídeos da região de Uberlândia, Minas Gerais, região Sudeste do Brasil e comparar a prevalência entre as zonas rural e urbana, bem como avaliar a influência dos fatores como grupo genético, gênero, idade, utilização/atividade exercida e contato com gatos e animais selvagens.

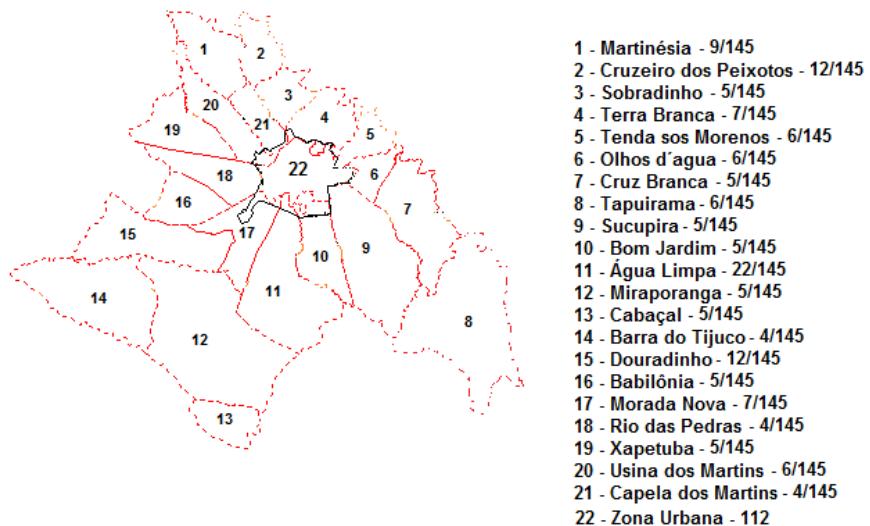
## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. População estudada**

#### **2.1.1. Local de coleta e amostragem**

A pesquisa foi realizada no município de Uberlândia, situado no Estado de Minas Gerais, região Sudeste do país, limitado pelas coordenadas geográficas de 18° 30' e 19° 30' de latitude sul e de 47° 50' e 48° 50' de longitude oeste. O município ocupa uma área de 4.115,09 Km<sup>2</sup> e apresenta clima tropical, com duas estações definidas, uma com verão chuvoso e outra com inverno seco, com pluviosidade anual em torno de 1500 mm e temperatura média de 22 °C (BRITO e PRUDENTE, 2005).

Foram coletadas 257 amostras de sangue de equídeos (cavalos, mulas e pôneis), com idade, raça e gênero variados, sendo 145 oriundos dos 21 conselhos existentes da zona rural do município de Uberlândia, distribuídos em cinco distritos (Uberlândia, Martinésia, Cruzeiro dos Peixotos, Miraporanga e Tapuirama). Além destas, foram coletadas mais 112 amostras de sangue de equídeos de diferentes bairros da zona urbana de Uberlândia (Figura 1). Estas amostras da zona urbana foram referentes, em sua grande maioria, de animais de tração (carroças) atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (HV-UFG), bairros do município e do Curral da Prefeitura Municipal de Uberlândia, além de animais lotados no Parque de exposição.



Fonte: Adaptado de: <http://udigis.prodaub.com.br/udigis/main2.asp>

**Figura 1.** Mapa de Uberlândia (Minas Gerais – Brasil), mostrando a divisão geográfica do Município em Conselhos e a quantidade de amostras de sangue de equídeos coletadas em cada local.

De cada conselho foram selecionadas aleatoriamente pelo menos 3 propriedades rurais. As amostras dos equídeos ficaram distribuídas nos 5 distritos: a) Uberlândia - perímetro rural ( $n = 65$ ); b) Martinésia ( $n = 15$ ); c) Cruzeiro dos Peixotos ( $n = 21$ ); d) Tapuirama ( $n = 11$ ); e) Miraporanga ( $n = 33$ ) (Figura 2). As coletas foram realizadas juntamente com um médico veterinário da prefeitura municipal de Uberlândia, que acompanhou as visitas, com a finalidade de fornecer informações técnicas e as coordenadas geográficas, além de intermediar o contato com o produtor rural.

Juntamente com as coletas, foi realizado um questionário epidemiológico, contendo informações sobre as características do animal, práticas de manejo sanitário, nutricional e ambiente. Foram avaliados os parâmetros como grupo genético (cavalos, mulas, e pôneis), gênero (macho e fêmea), utilização/atividade exercida (tração, esporte e reprodução), escore de condição corporal (ECC), de 0 a 5 (CARROLL e HUNTINGTON, 1988), e contato com gatos e animais selvagens (sim e não). Na zona urbana, o contato com gatos foi considerado positivo para todos os animais, uma vez que a maioria dos equinos desta zona eram carroceiros e circulavam pela cidade; o contato com animais silvestres foi considerado negativo nestes mesmos animais.

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Uberlândia sob o número 071/13.

### **2.1.2. Coleta de Sangue**

O sangue foi coletado por venopunção da veia jugular dos equídeos, com previa antisepsia do local com álcool iodado, usando-se o sistema a vácuo (BD Vacutainer®), tubos com e sem EDTA e agulhas descartáveis do tipo múltipla. Após a coleta, de 5 ml de sangue em tubos sem EDTA e 2ml em tubos com EDTA, as amostras foram transportadas em caixas de isopor com gelo artificial, para o Laboratório de Patologia Clínica do HV-UFG, onde foram submetidas à centrifugação de 5000 rpm por 5 minutos em centrífuga Excelsa Baby (centrífuga marca FANEM, modelo 206) e o soro separado em alíquotas de 2ml em microtubos tipo eppendorf, previamente identificados e armazenados a menos 20°C. Posteriormente foram encaminhados ao

laboratório de Zoonoses e Saúde Pública e Protozoologia da Universidade Estadual de Londrina, em Londrina, Paraná, Brasil para as análises laboratoriais descritas abaixo.

### **2.1.3. Reação de Imunofluorescência indireta - RIFI**

As análises sorológicas para a verificação da presença de anticorpos anti-*T. gondii* foram feitas pela reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), segundo Camargo (1974). Foram utilizadas taquizoítos da cepa RH como antígeno, conjugados anti-IgG (Sigma Chemical) padronizado na diluição de 1:900, e controles positivo e negativo para os soros de equídeos. A leitura foi realizada em um microscópio de epifluorescência (Nikon Lapophot) onde foi considerado positivo o animal com título igual ou superior a 64.

### **2.1.4. Reação em cadeia da Polimerase - PCR**

As amostras de sangue foram submetidas à extração de DNA genômico utilizando um kit comercial (Wizard Genomic DNA Purification Kit - Promega®, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para detecção de DNA de *T. gondii* foi realizada a PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores TOX4 (5'-CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG-3') e TOX5 (5'-CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT-3'), conforme descrito por Homan et al. (2000), que amplificam uma sequencia de 529 pb que se repete 200-300 vezes no genoma do *T. gondii*.

A reação utilizou 5 µL de DNA extraído, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de dNTP (Invitrogen®, Life Technologies, EUA), 1 mM de cada primer, 60 mM Tris-HCl (pH 9,0), 15 mM (NH4)2SO<sub>4</sub>, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5U de Taq-DNA polimerase (Invitrogen®, Life Technologies EUA) e H<sub>2</sub>O Mili-Q estéril perfazendo um total de 25µL. Utilizou-se a seguinte programação: 95°C por 4 minutos para desnaturação inicial, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 55°C por 1 minuto para anelamento e 72°C por 2 minutos para extensão e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Controles positivos e negativos foram incluídos em todas as reações. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corados com Sybr® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®, Life Technologies, EUA) e visualizados e

fotodocumentos sobre luz UV por meio do transiluminador Safe Imager™ (Invitrogen®, EUA).

## 2.2. Análise estatística

Para cada variável foram calculados a prevalência, intervalo de confiança (95%) e risco relativo utilizando-se o programa estatístico SISVAR. Os fatores de risco foram avaliados utilizando-se o teste de qui-quadrado (comparação de frequências de positivos entre zona rural e urbana, comparação de frequências da idade, trabalho na zona rural e urbana) ou o teste exato de Fisher (comparação de frequências entre gênero e contato com gatos da zona rural e urbana). Para avaliar a concordância de replicabilidade entre os testes de IFI e PCR utilizou-se o teste *Kappa*. Para comparar a média do ECC utilizou-se o teste de Mann-Whitney com o programa estatístico Graphpad Instat. Todos os resultados foram considerados significantes quando  $P \leq 0,05$ .

## 3. RESULTADOS

Das 257 amostras sanguíneas avaliadas, 9,7% (25/257) resultaram em positivas na RIFI para *T. gondii*, sendo de 11% (16/145) no meio rural e de 8% (9/112) no meio urbano. Já na PCR foram 10,9% (28/257) de amostras positivas, com prevalências de 17,2% (25/145) e 2,7% (3/112), respectivamente, na zona rural e urbana (Figura 1). Dos 16 animais positivos na zona rural apenas um apresentou título de um/264 e o restante um/64. Na zona urbana apenas um teve título de um/264 e o restante só reagiu até um/64.

Não houve diferença na frequência de animais positivos entre as técnicas de RIFI e PCR ( $P = 0,772$ ) e apresentaram concordância de replicabilidade fraca, tanto na zona urbana (Teste *Kappa* = -0,042;  $P = 0,302$ ) como na zona rural (Teste *Kappa* = 0,014;  $P = 0,433$ ). E ao comparar zona rural e urbana, apenas na PCR houve diferença estatística significativa ( $P < 0,001$ ), conforme demonstrado na Tabela 1.

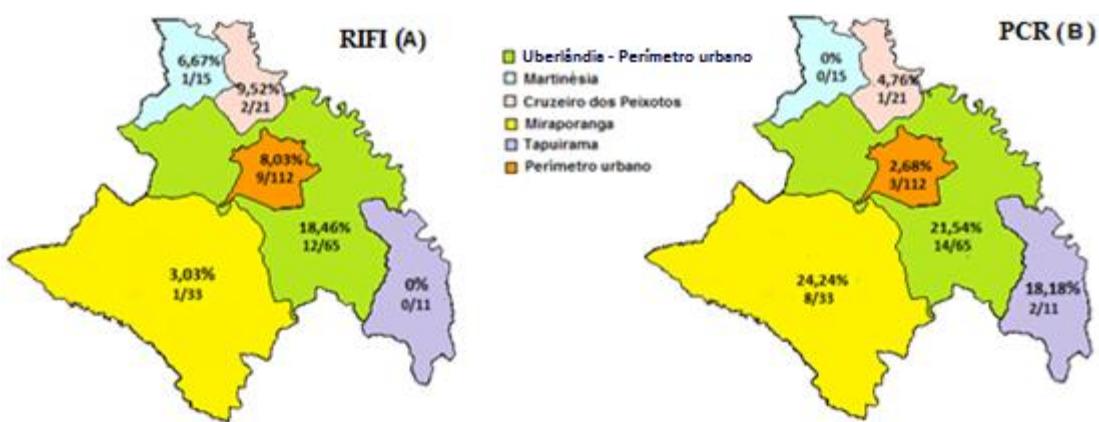
**Tabela 1.** Prevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* na Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em equídeos do Município de Uberlândia - MG.

Geral	RIFI	PCR	$P = 0,772$
	9,7% (25/257) <sup>A</sup>	10,9% (28/257) <sup>A</sup>	
<b>Zona Rural</b>	11% (16/145) <sup>a</sup>	17,2% (25/145) <sup>a</sup>	
<b>Zona Urbana</b>	8% (9/112) <sup>a</sup>	2,7% (3/112) <sup>b</sup>	
	$P=0,526$	$P < 0,001$	

Nota: letras maiúsculas diferentes na linha e minúsculas na coluna evidenciam diferença significativa no teste de qui-quadrado ( $P < 0,05$ ).

A soroprevalência, avaliada pela RIFI (Figura 2), por distritos, foi de 6,7% (1/15) em Martinésia (1 - Conselho Martinésia), 9,5% (2/21) em Cruzeiro dos Peixotos (1- Cruzeiro e 1 - Capela dos Martins), 18,5% (12/65) em Uberlândia – perímetro rural (7- Água Limpa, 2 - bom Jardim, 1 - Xapetuba, 1 - Babilônia e 1 - Tenda dos Morenos), 3,0% (1/33) em Miraporanga (1 - Barra do Tijuco) e não foi encontrada nenhuma amostra positiva no distrito de Tapuirama ( $n = 11$ ).

Na PCR (Figura 2), identificou-se a prevalência de 4,8% (1/21) em Cruzeiro dos Peixotos (1 - Capela dos Martins), 24,2% (8/33) em Miraporanga (7 - Douradinho e 1 - Morada Nova), 18,2% (2/11) em Tapuirama (2 - Cruz Branca), 21,5% (14/65) em Uberlândia (6 - Olhos d'água, 1 - Terra Branca, 4 - Babilônia e 3 - Tenda dos Morenos) e nenhum animal em Martinésia ( $n = 15$ ).



Fonte: Adaptado de: <http://udigis.prodaub.com.br/udigis/main2.asp>

**Figura 2.** Porcentagem de animais positivos para *Toxoplasma gondii*, distribuídos por distritos na zona rural e Perímetro urbano do Município de Uberlândia- MG.

Os fatores avaliados grupo genético, idade, gênero, atividade, localização dos animais e contato com gatos e animais silvestres foram investigados em relação à presença de anticorpos anti - *T. gondii* em equídeos (Tabelas 2, 3, 4 e 5). Na zona urbana, nenhum dos fatores estudados na presente pesquisa foi considerado fator de risco para a toxoplasmose (Tabela 3 e 5).

Para a zona rural, na técnica da RIFI, somente gênero e idade foram significativos ( $P \leq 0,05$ ) e considerados fatores de risco (Tabela 2). Os machos foram considerados menos susceptíveis e com risco relativo de 0,26 vezes quando comparados às fêmeas ( $P = 0,018$ ) e os animais maiores que cinco anos apresentaram maior susceptibilidade do que os animais mais jovens. Na técnica da PCR, o único fator de risco significativo foi o grupo genético ( $P < 0,001$ ), pôneis apresentaram maior prevalência de 85,7% em relação aos cavalos e mulas de, respectivamente, 13,5% e 20%, além de apresentarem um risco relativo significativo de 6,33 vezes quando comparados aos equinos.

**Tabela 2.** Fatores de risco associados à infecção por *Toxoplasma spp.* na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em equídeos da zona rural do município de Uberlândia.

Fatores de Risco	n <sup>a</sup> (%) <sup>b</sup>	95% CI <sup>c</sup>	P valor	RR (95%CI)	P valor
<b>Grupo genético</b>			0,526		
cavalos	133	15 (11,3)	6,4- 17,9	1	
mulas	5	1 (20)	0,5 -71,6	1,77(0,29-10,9)	0,465
pôneis	7	0 (0)	0 – 41,0	-	
<b>Gênero</b>			0,018*		
Fêmea	7	13 (16,9)	9,3- 27,1	1	
Macho	8	3 (4,4)	0,9 – 12,3	0,26 (0,07-0,88)	0,018*
<b>Grupo por idade</b>			0,017*		
< 5 anos	3	0 (0)	0 – 8,2	1	
5 - 14 anos	1	15 (16,5)	9,5-25,7	-	0,003*
> 14 anos	1	1 (9,1)	0,2- 41,3	-	0,204
<b>Atividade</b>			0,114		
Reprodução	8	6 (21,4)	8,3-40,9	1	
Tração	1	9 (8,2)	3,8 – 15,0	0,38 (0,14-0,98)	0,081
Esporte	5	1 (20)	0,5-71,6	0,93 (0,14-6,19)	1
<b>Contato com gatos</b>			0,396		
Não	0	7 (14)	5,8-26,7	1	
Sim	1	8 (8,8)	3,9-16,6	0,63 (0,24-1,63)	0,396
<b>Contato com animais selvagens</b>			0,059		
Não	4	7 (20,6)	8,7-37,9	1	
Sim	11	9 (8,1)	3,8-14,8	0,39 (0,16-0,98)	0,059

Nota: <sup>a</sup> Número de animais positivos; <sup>b</sup> Prevalência; <sup>c</sup> Intervalo de confiança; <sup>d</sup> P valor; \* Fator significativo; CI, intervalo de confiança; RR, risco relativo.

**Tabela 3.** Fatores de risco associados à infecção por *Toxoplasma spp.* na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em equídeos da zona urbana do Município de Uberlândia.

Fatores de risco	N	n <sup>a</sup> (%) <sup>b</sup>	95% CI <sup>c</sup>	P valor	RR (95%CI)	P valor
<b>Grupo genético</b>				1		
Cavalos	109	9 (8,3)	3,8-15,1		1	
Mulas	3	0 (0)	0-70,8		-	
<b>Sexo</b>				0,2960		
Fêmea	64	7 (10,9)	4,5-21,2		1	
Macho	48	2 (4,2)	0,5-14,2		0,38 (0,08-1,75)	0,296
<b>Grupo por idade</b>				0,6514		
< 5 years	11	1 (9,1)	0,2-41,3		1	
5 - 14 years	92	8 (8,7)	3,8-16,4		0,96 (0,13-6,95)	1
> 14 years	9	0 (0)	0-33,6		-	1
<b>Atividade</b>				0,6119		
Reprodução	15	1 (6,7)	0,17-31,9		1	
Tração	74	5 (6,8)	2,2-15,1		1,01 (0,13-8,07)	1
Esporte	23	3 (13)	2,8-33,6		1,96 (0,22-17,11)	1

Nota: <sup>a</sup> Número de animais positivos; <sup>b</sup> Prevalência; <sup>c</sup> Intervalo de confiança; <sup>d</sup> P valor; \* Fator significativo; CI, intervalo de confiança; RR, risco relativo.

**Tabela 4.** Fatores de risco associados à infecção por *Toxoplasma spp.* na Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em equídeos da zona rural do município de Uberlândia.

Fatores de Risco	N	n <sup>a</sup> (%) <sup>b</sup>	95% CI <sup>c</sup>	P valor	RR (95%CI)	P valor
<b>Grupo genético</b>				<0,001*		
Equinos	133	18 (13,5)	8,2-20,5		1	
Mulas	5	1 (20)	0,5-71,6		1,48 (0,24-8,98)	0,529
Poneis	7	(85,7)	42,1-99,6		6,33 (3,74-10,7)	<0,001*
<b>Gênero</b>				0,381		
Fêmeas	7	11 (14,3)	7,3-24,1		1	
Machos	8	14 (20,6)	11,7-32,1		1,44 (0,70-2,96)	0,381
<b>Grupo por idade</b>				0,083		
< 5 anos	3	12 (27,9)	15,3-43,7		1	
5 - 14 anos	1	12 (13,2)	7,0-21,9		0,47 (0,23-0,96)	0,053
> 14 anos	1	1 (9,1)	0,2-41,3		0,33 (0,05-2,24)	0,261
<b>Atividade</b>				0,811		
Reprodução	8	6 (21,4)	8,3-40,9		1	
Tração	10	18 (16,4)	10-24,6		0,76 (0,33-1,74)	0,578
Esporte		1 (20)	0,5-71,6		0,93 (0,14-6,19)	1
<b>Contato com gatos</b>				1		
Não	0	9 (18)	8,6-31,4		1	
Sim	1	16 (17,6)	10,4-27		0,98 (0,47-2,05)	1
<b>Contato com animais selvagens</b>				0,066		
Não	4	2 (5,9)	0,7-19,7		1	
Sim	11	23 (20,7)	13,6-29,5		3,52(0,87-14,19)	0,066

Nota: <sup>a</sup> Número de animais positivos; <sup>b</sup> Prevalência; <sup>c</sup> Intervalo de confiança; <sup>d</sup> P valor; \* Fator significativo; CI, intervalo de confiança; RR, risco relativo.

**Tabela 5.** Fatores de risco associados à infecção por *Toxoplasma spp.* na Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em equídeos da zona urbana do município de Uberlândia.

Fatores de Risco	n	n <sup>a</sup> (%) <sup>b</sup>	95% CI <sup>c</sup>	P valor	RR (95%CI)	P valor
<b>Grupo genético</b>				0,079		
Equinos	109	2 (1,8)	0,2-6,5		1	
Mulas	3	1 (33,3)	0,8-90,6		18,2 (2,2-14,9)	0,079
<b>Gênero</b>				1		
Fêmeas	4	2 (3,1)	0,4-10,8		1	
Machos	8	1 (2,1)	0,05-11,1		0,7 (0,1-7,1)	1
<b>Grupo por idade</b>				0,079		
< 5 anos	1	1 (9,1)	0,2-41,3		1	
5 - 14 anos	2	1 (1,1)	0,03-5,9		0,1 (0,01-1,8)	0,203
> 14 anos		1 (11,1)	0,3-48,2		1,2 (0,1-1,7)	1
<b>Atividade</b>				0,453		
Reprodução	5	0 (0)	0-21,8		1	
Tração	4	3 (4,1)	0,8-11,4		-	1
Esporte	3	0 (0)	0-14,8		-	1

Nota: <sup>a</sup> Número de animais positivos; <sup>b</sup> Prevalência; <sup>c</sup> Intervalo de confiança; <sup>d</sup> P valor; \* Fator significativo; CI, intervalo de confiança; RR, risco relativo.

O ECC não foi considerado fator de risco em nenhuma técnica ou região avaliada, sendo de  $3,1 \pm 0,5$  dos animais negativos e  $3,1 \pm 0,3$  dos positivos ( $P = 0,911$ ) na zona rural e de  $2,8 \pm 0,5$  nos negativos e  $3,1 \pm 0,3$  dos positivos ( $P = 0,139$ ) na RIFI. Na técnica da PCR o ECC foi de  $3,2 \pm 0,4$  nos negativos e  $3,1 \pm 0,5$  nos positivos ( $P = 0,549$ ) da zona rural e, na zona urbana o ECC foi de  $2,8 \pm 0,4$  e  $2,5 \pm 0,7$  ( $P = 0,437$ ), respectivamente, nos animais negativos e positivos.

#### 4. DISCUSSÃO

Este estudo revelou que a soroprevalência de toxoplasmose em equídeos no Município de Uberlândia foi de 9,7%, superior apenas ao encontrado por Mendonça et al. (2001) na Bahia e Silva e Langoni (2000) no Mato Grosso do Sul de, 1,5% e 1,33%, respectivamente. A maioria dos levantamentos brasileiros apresentaram valores de prevalência superior, destacando-se as de 32,8% no Mato Grosso do Sul (LARANJEIRA; ISHIZUCA; HYAKUTAKE, 1985), de 13,73%, 41,53%, 23,35% e 21,39%, respectivamente, no Mato Grosso, São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul (VIDOTTO et al., 1997), de 28,46% no Paraná (CONTENTI et al., 2002), de 44,16% em São Paulo (VILLALOBOS et al., 2011) e, finalmente, semelhante a 11,6% (EVERS

et al., 2013) com soroprevalência de 398 amostras coletadas em diferentes estados do Brasil.

Na única pesquisa encontrada na região de Uberlândia, Naves et al. (2005) encontraram a soroprevalência de 12,82%, no entanto, como descrito anteriormente, este levantamento foi de apenas três haras localizado no município.

Deve-se ressaltar que nos trabalhos de Vidotto et al. (1997), Contente et al. (2002) e Naves et al. (2005) foram usados como ponto de corte as amostras com título de um/16. Caso fossem alterados os pontos de corte nas pesquisas acima referenciadas, para a titulação de um/64, as prevalências reduziriam de 54,8% para 28,25%, de 28,46% para 22,3% e de 12,82% para 2,56%, respectivamente. Desta forma, os resultados encontrados por Naves et al. (2005) foram bem inferiores ao da presente pesquisa, o que pode ser justificado pela amostragem reduzida e restrita dentro do município de Uberlândia.

Ao comparar com pesquisas em outros países, a prevalência em Uberlândia foi semelhante ao encontrado por García-Bocanegra et al. (2012) no Sul da Espanha e Lopes et al. (2013) em Portugal, com 10,8% e 13,3%, respectivamente. A prevalência foi superior a de Dubey, Kerber e Granstrom (1999) na América do Norte, Karatepe et al. (2010) na Turquia e Alvarado-Esquivel et al. (2012) no México com 6,9%, 7,2% e 6,1%, respectivamente. Verificou-se que na grande maioria das pesquisas avaliadas o levantamento em Uberlândia foi inferior a maioria, como os resultados encontrados por Bártová et al. (2010) na República Tcheca, Hajialilo et al. (2010) no Irã, Boughattas et al. (2011) na Tunísia, Alanazi e Alyousif (2011) na Arábia Saudita, Yang et al. (2013) na China, com 24%, 71,2%, 17,7%, 31,6% e 25%, respectivamente.

Segundo Montoya e Liesenfeld (2004), a infecção por *T. gondii* pode ser diagnosticada indiretamente por métodos sorológicos ou diretamente por PCR, isolamento e histologia. Sendo que a sorologia busca demonstrar níveis de anticorpos específicos ao *T. gondii*, cujos títulos mantêm-se elevados durante meses até anos (MONTOYA, 2002). Porém, os testes sorológicos disponíveis

indicam somente o contato do hospedeiro com o protozoário em algum momento no passado e não a presença de protozoário viável à infecção.

Deste modo, há a necessidade de associar ao exame sorológico outros métodos de diagnóstico (DUBEY, 2010), como a PCR que pode detectar o parasita em número muito reduzido ou mesmo lisado (HOWE et al., 1997). Entretanto, a PCR só será positiva em casos de parasitemia; assim, em casos de toxoplasmose cerebral ou pulmonar, a PCR será de utilidade apenas quando houver disseminação ou passagem do parasito para o sangue, tal como ocorre na etapa aguda dessa parasitose (KHALIFA, 1994), podendo aí ser uma explicação para a fraca concordância de replicabilidade entre as técnicas de RIFI e PCR.

Na presente pesquisa, a soroprevalência foi maior na região rural (17,2%) do que na urbana (2,7%), corroborando com o encontrado por Alvarado-Esquível et al. (2012) que descrevem que as práticas de higiene e cuidados na alimentação dos animais na zona rural podem contribuir para esses resultados.

Os gatos e outras espécies de felídeos são os únicos hospedeiros definitivos conhecidos para esse parasita (FRENKEL, 1990), porém nesta pesquisa não foi considerado um fator de risco entre os animais positivos. Segundo Silva e Langoni (2000), os gatos são utilizados no controle de roedores em estábulos e desta forma podem contaminar a água ou o alimento de cavalos e infectar-se com *T. gondii* pela ingestão ou inalação de oocistos presentes nos alimentos, feno e em camas contaminadas com oocistos (SILVA e LANGONI, 2000).

Outro fato interessante na patogenia da doença é a contaminação de reservatórios de água por oocistos eliminados por felídeos selvagens (DUBEY e JONES, 2008). Assim, a ausência de gatos domésticos, porém a presença de felídeos selvagens pode ser considerada um fator de risco associado à transmissão de toxoplasmose (CAÑÓN-FRANCO et al., 2013).

Vitalicano (2012) demonstrou que o *T. gondii* está distribuído em todo o território nacional e é capaz de infectar uma vasta gama de aves e mamíferos selvagens provenientes de diferentes regiões brasileiras, com potencial risco para animais ou humanos que os consumirem. Ferreira e Navaro (1994) citam

que a existência da toxoplasmose nos animais selvagens pode ser entendida pelas adaptações que o *Toxoplasma spp.* apresenta, tais como suas diferentes formas infectantes, a resistência dos oocistos ao meio, a ampla variedade de hospedeiros e as vias de transmissão.

Em relação ao grupo genético, neste estudo, os pôneis apresentaram maior soroprevalência que cavalos e mulas, e não há na literatura consultada nenhum relato da prevalência de *T. gondii* em pôneis. Outras pesquisas mostram resultados semelhantes entre as espécies, como as de Chhabra e Gautam (1980) que obtiveram percentuais de positividade de 6,2%, 6,0% e 4,3% para equinos, asininos e muares, respectivamente. Enquanto Ling e Wan (1984) detectaram a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em 4,55% das amostras de soro de equinos e em 8,61% das amostras de soro de muares.

Levando-se em consideração o parâmetro idade, os cavalos com idade superior a cinco anos têm mais chances de ser positivos do que os animais mais jovens, o que está de acordo com o encontrado por Boughattas et al. (2011), Urcelay et al. (1982) e Costa et al. (1986) que demonstraram que o número de animais soropositivos aumenta de forma diretamente proporcional à idade, pois quanto mais velhos é maior a chance de se infectar com oocistos no ambiente. O gênero também foi considerado um fator predisponente, sendo as fêmeas mais sensíveis para a infecção pelo parasita do que os machos, o que esta de acordo com o relatado por Hardy et al., (2009) no Egito.

A toxoplasmose é uma antropozoonose, portanto um problema na saúde pública, principalmente pelo consumo de carne crua ou mal cozida e água contaminada. O país exporta carne de equídeos e por isto há relevância em se realizar estudos sobre a prevalência desses parasitas nesta espécie na região. Por ser uma doença com riscos graves em humanos, ter disseminação mundial e de grande importância ao agronegócio, é necessário conhecer mais sobre essa enfermidade, realizando genotipagem a fim de identificar qual cepa está mais atuante.

## 5. CONCLUSÃO

Há a presença de *Toxoplasma gondii* distribuído em todo o município de Uberlândia e sua prevalência depende de ser zona rural ou urbana; o grupo genético, idade e gênero foram considerados fatores de risco para a doença na zona rural.

## REFERÊNCIAS

- ALANAZI, A. D.; ALYOUSIF, M.S. Prevalence of Antibodies to *Toxoplasma gondii* in Horses in Riyadh Province, Saudi Arabia. **Journal of Parasitology**. v. 97, n. 5, p. 943–945, mar. 2011.
- ALVARADO-ESQUIVEL, C.; RODRIGUEZ-PEÑA, S.; VILLENA, I.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Infection in Domestic Horses in Durango State, Mexico. **Journal of Parasitology**, v. 98, n.5, p. 944–945, 2012.
- ASSESSORIA DE COMUNICAÇÃO CNA. Brasil tem o quarto maior rebanho eqüino do mundo, com 5,8 milhões de cabeças, 2010. Disponível em: <http://www.cfmv.org.br/portal/noticia.php?cod=606>. Acesso em: 20 de março de 2012.
- BARBOSA, L.D.; SANTOS, M.A.M.;BATISTA, P.V.M.;MOURA, J.B.; VIEIRA, D.S.; GRADELA, A.;FARIA, M.D.;HORTA, M.C.; MILKEN, V.M.F. Aspectos pedagógicos e ditáticos do “projeto carroceiro” no município de Petrolina: Bem estar de equídeos e preocupação social. **Revista Conexão UEPG**. v. 7, n. 2, p.260-265. 2011.
- BÁRTOVÁ, E.; SEDLÁK, K.; SYROVÁ, M.; LITERÁK, I. *Neospora* spp. and *Toxoplasma gondii* antibodies in horses in the Czech Republic. **Parasitology Research**. v. 107, n.4, p.783–785, set. 2010.

BRITO, J. L. S.; PRUDENTE, T. D. Mapeamento do uso da terra e cobertura vegetal do município de Uberlândia – MG, utilizando imagens ccd/cbers 2. **Caminhos de Geografia**, Uberlândia, v. 13, n. 15, p. 144-153, 2005.

BOUGHATTAS, S.; BERGAOUI, R.; ESSID, R.; AOUN, K.; BOURATBINE, A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among horses in Tunisia. **Parasites & Vectors**, v.4, p.218, 2011.

CAMARGO, M. E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, São Paulo, v. 10, n. 4, p. 143-171, 1974.

CAÑÓN-FRANCO, W. A.; ARAÚJO, F. A. P.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* in small neotropical wild felids. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 50, n. 1, p. 50-67, 2013.

CARROL, C. L.; HUNTINGTON, P. J. Body condition scoring and weight estimation of horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 20-1, p.41-45, 1988.

CHHABRA, M. B.; GAUTAM, O. P. Antibodies to *Toxoplasma gondii* in equids in north India. **Equine Veterinary Journal**. v. 12, n. 3, p. 146-148, 1980.

CONTENTI, A. P. A.; TSUTSUI, V. S.; PRUDENCIO, L. B.; MARANA, E. R. M.; REICHMANN, P.; NARARRO, T. Estudo soroepidemiológico de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em eqüinos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina – PR. In: XI ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2002, Maringá – PR, **Anais...** Maringá. 2002.

COSTA, A. J.; ISHIZUCA, M. M.; MARQUES, L. C.; VIDOTTO, O.; ROCHA, U. F.; IKEDA, A. Toxoplasmosis frequency in equines from the north region of São Paulo State, Brazil. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v.2, n. 1, p. 75-79, 1986.

DUBEY, J.P., DAVIS, G.W., KOESTNER, A., KIRYU, K. Equine encephalomyelitis due to a protozoan parasite resembling *Toxoplasma gondii*.

**Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 165, p. 249-255, 1974.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 205, n.11, p. 1593-8, dec. 1994.

DUBEY, J. P.; KERBER, C. E.; GRANSTROM, D. E.; Serologic prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses in Brazil. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 215, n. 7, p. 970-972, oct. 1999.

DUBEY, J.P.; JONES, J. L. Toxoplasma gondii infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 38, n. 11, p. 1257–1278, 2008.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis of animals and humans. Second edition. Boca Raton, FL;CRC Press; 2010. 313 pp. Session 1.7, p. 52-71

EVERS, F.; GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; ZULPO, D. L.; NINO, B. S. L.; EWALD, M. P. C.; PAGLIARI, S.; ALMEIDA, J. C.; FREIRE, R. L. Diagnosis and isolation of Toxoplasma gondii in horses from Brazilian slaughterhouses. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal. v. 22, n. 1, p. 58-63, jan.-mar. 2013

FERREIRA, J.R.V.; NAVARRO, I.T. Prevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* em animais selvagens – revisão. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.15, n.1, p. 94-100, março 1994.

FRENKEL, J. K. Transmission of toxoplasmosis in human beings. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.196, n.2/15, 1990.

GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R.C. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii*, em suínos, bovinos, ovinos e equinos e sua correlação

com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do Norte do Paraná-Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 1, p. 91-97, mar. 1999.

GARCIA-BOCANEGRA, I.; CABEZON, O.; ARENAS-MONTES, A.; CARBONERO, A.; DUBEY, J.P.; PEREA, A.; ALMEIDA, S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in equids from Southern Spain. **Parasitology International**. v. 61, p. 421–424, 2012.

HAJIALILO, E.; ZIAALI, N.; HARANDI, M.F.; SARAEI, M.; HAJIALILO, M.; Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in sport horses from Qazvin, Iran. **Tropical Animal Health and Production**. v. 42, p.1321–1322, 2010.

HARIDY, F. M.; SHOUKRY, N. M.; HASSAN, A. A.; MORSY, T. A.. Elisa-seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in draught horses in Greater Cairo, Egypt. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology** . v. 39, n. 3, p. 821-826, 2009.

HOMAN W.L.; VERCAMMEN, M.; BRAEKELEER, J.; VERSCHUEREN, H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **International Journal for Parasitology**. v. 30, n.1, p.69-75, 2000.

HOWE, D.K., HONORÉ, D., DEROUIN,F., SIBLEY,L.D. Determination of Genotypes of *Toxoplasma gondii* Strains Isolated from Patients with Toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 35, n.6, p. 1411-1414, 1997.

KARATEPE, B.; BABUR, C.; KARATEPE, M.; KILIÇ, S. Seroprevalence of toxoplasmosis in horses in Niğde Province of Turkey. **Tropical Animal Health and Production**. v. 42, p. 385–389, 2010.

KHALIFA, K. E. S., ROTH, A., ROTH, B., ARASTEH, K.N., JANITSCHKE, K. Value of PCR for evaluating occurrence of parasitemia in immunocompromised

patients with cerebral and extracerebral toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 32, n. 11, p. 2813-9, 1994.

KOUAM, M.K.; DIAKOU, A.; KANZOURA, V.; PAPADOPoulos, E.; GAJADHAR, A.A.; THEODOROPOULOS, G. A seroepidemiological study of exposure to Toxoplasma, Leishmania, Echinococcus and Trichinella in equids in Greece and analysis of risk factors. **Veterinary Parasitology**. v.170, p.170–175, 2010.

LARANJEIRA, N.L.; ISHIZUCA, M.M.; HYAKUTAKE, S. Prevalência da Toxoplasmose eqüina avaliada pela técnica de imunofluorescência indireta no Mato Grosso do Sul, Brasil. **Boletin de la Oficina Sanitaria Panamericana**, Washington, v. 99, n.2, p. 158- 162, 1985.

LING, C., W.; WAN, P. D. A report of investigations of antibodies to Toxoplasma gondii in the horse and mule in Sichuan Province. **Journal of Veterinary Science & Technology**. n. 4, p. 32-34, 1984.

LOPES, A.P.; SOUSA, S.; DUBEY, J.P.; RIBEIRO, A.J.; RICARDO SILVESTRE.; COTOVIO, M.; SCHALLIG, H.D.F.H.; CARDOSO, L.; CORDEIRO-DA-SILVA, A. Prevalence of antibodies to Leishmania infantum and Toxoplasma gondii in horses from the north of Portugal. **Parasites & Vectors**, v. 6, p.178, 2013.

MENDONÇA, A. O.; CERQUEIRA, E. J. L.; ARAÚJO, W. N.; MORAES-SILVA, E.; SHIMABUKURO, F. H.; SARKIS, D. T.; SHERLOCK, I.; LANGONI, H. Inquérito sorológico para toxoplasmose em equídeos procedentes de duas regiões do Estado da Bahia, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 22, n.2, p. 115-118, jul./dez. 2001.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Disponível em:  
<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>. Acesso em: 12 de janeiro de 2014.

MONTOYA, J. G. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 15, n. 185 p. 73-82, 2002.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 1965- 1976, 2004.

NAVES, C. S.; FERREIRA, F. A.; CARVALHO, F. S. R.; COSTA, G. H. N.; Soroprevalência da toxoplasmose em eqüinos da raça mangalarga marchador no município de Uberlândia, Minas Gerais. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 11, n. 1, p. 45-52, 2005.

SILVA, A.V., LANGONI, H. Alimentos de origem animal e a toxoplasmose humana. **Higiene Alimentar**. v.14, p. 34-39. 2000.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**. v. 30, n.(12-13), p.1217-1258, 2000.

URCELAY, S.; MAINO, M.; PINOCHET, E.; CASTRO, E. Toxoplasmosis of horses in Chile 1980. **Archivos de Medicina Veterinaria**. v. 14, n. 2, p. 127-130, 1982.

VILLALOBOS, E.M.C.; FELICIO, P.S.; CHIEBAO, D.P.; NOGUEIRA, A.H.C.; LARA, M.C.C.S.H.; AGUIAR, D.M.; CARVALHO, P.R.; CUNHA, E.M.S. Frequência de anticorpos anti-toxoplasma gondii e associação sorológica com a anemia infecciosa equina (AIE) em equinos de abatedouro provenientes da região do vale do Riviera, estado de São Paulo, Brasil. Dados preliminares. **Biológico**, São Paulo, v.73, n.2, p.181-185, jul./dez., 2011

VIDOTTO, O.; KANO, F. S.; FREIRE, MITSUKA, R.; BONESI, G.; NAVARRO, I. T.; FRANCISCON, F. S. G.; Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*

em equinos procedentes de quatro Estados (SP, PR, MS e MT) abatidos em Apucarana, Paraná, Brasil. **Semina: Ciencias Agrárias**. Londrina, v. 18, n.1, p. 9-13, mar. 1997.

VIEIRA, E. R.; REZENDE, A. S. C.; LANA, A. Q. Characteristics of the breeding in the state of Minas Gerais-Brazil. **V&Z EM MINAS**, Belo Horizonte, p. 48-52, 2011.

VITALIANO, S. N. Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* em animais selvagens do Brasil. 2012. 101 f. **Tese** (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

YANG, N.; MING-YANG, M.; GAO-MING, YUAN.; GUO-XIN, Z.; HONG-KUI, L.; JIAN-BIN, H. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in slaughtered horses and donkeys in Liaoning province, northeastern China. **Parasites & Vectors**. v. 6, p.140, 2013.

## CAPÍTULO 3- PREVALÊNCIA DE *NEOSPORA SPP.* E ANÁLISE DOS FATORES DE RISCO EM EQUÍDEOS DO SUDESTE DO BRASIL

**RESUMO** - Este estudo avaliou a prevalência e análise dos fatores de risco do *Neospora spp.* em equídeos (cavalos, mulas e pôneis), dentro de áreas rurais e urbanas do Município de Uberlândia, Minas Gerais. Amostras de soro de 257 equídeos foram avaliadas para a presença de anticorpos contra *Neospora spp.* por meio do teste de reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) e diagnóstico molecular através do método de Reação em cadeia da Polimerase (PCR). Além disso, um inquérito epidemiológico foi realizado para avaliar os possíveis fatores de risco (grupo genético, idade, gênero, utilização/atividade econômica, ECC, histórico de abortamento e contato com animais domésticos e silvestres). De 257 amostras avaliadas, 13,2% (34/257) resultaram em positivas na RIFI, sendo a soroprevalência no meio rural de 15,9% (23/145) e de 9,8% (11/112) no meio urbano, não havendo diferença entre elas ( $P = 0,218$ ). Na PCR foi encontrada a prevalência geral de 1,2% (3/257), sendo 1,4% (2/145) da zona rural e 0,89% (1/112) na área urbana, onde também não se observou diferença ( $P = 0,719$ ). Houve diferença significativa ( $P < 0,0001$ ) ao comparar a frequência de animais positivos entre as técnicas de RIFI e PCR. Dos fatores pesquisados somente a idade foi significativa ( $P \leq 0,05$ ) e considerada fator de risco. O ECC dos animais negativos na RIFI foi inferior ( $3,0 \pm 0,5$ ) ao dos animais positivos ( $3,2 \pm 0,3$ ) ( $P = 0,037$ ). Logo, concluiu-se que há a presença de *Neospora spp.* distribuído em todo o município de Uberlândia, sua prevalência independe de ser zona rural ou urbana e a idade é considerada um fator de risco para a doença.

**Palavras-chave:** Epidemiologia, Neosporose, Reação de Imunofluorescência indireta, Reação em cadeia da polimerase

## PREVALENCE OF *NEOSPORA* spp. AND ANALYSIS OF RISK FACTORS IN EQUIDAE OF SOUTHEASTERN BRAZIL

**ABSTRACT** - This study evaluated the prevalence and analysis of risk factors for *Neospora* spp. in equines (horses, mules and ponies), within rural and urban areas of Uberlândia, Minas Gerais. Serum samples from 257 horses were evaluated for the presence of antibodies against *Neospora* spp. through the Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) and molecular diagnosis by the method of Polymerase Chain Reaction (PCR) test. In addition, a survey was conducted to evaluate the possible risk factors (genetic group, age, gender, economic activity, ECC, history of abortion and contact with domestic and wild animals). 257 samples evaluated, 13.2% (34/257) had a positive IFAT, with seroprevalence in rural areas from 15.9% (23/145) and 9.8% (11/112) in the urban environment there was no difference between them ( $P = 0.218$ ). PCR in the overall prevalence of 1.2% (3/257) was found, with 1.4% (2/145) of rural and 0.89% (1/112) in the urban area, where he also was not observed difference ( $P = 0.719$ ). There was a significant difference ( $P < 0.0001$ ) when comparing the frequency of positive animals between IFA and PCR techniques. Of the factors studied only age was significant ( $P \leq 0.05$ ) and considered a risk factor. The ECC of animals negative by IFAT was lower ( $3.0 \pm 0.5$ ) than positive animals ( $3.2 \pm 0.3$ ) ( $P = 0.037$ ). Therefore, it is concluded that there is the presence of *Neospora* spp. distributed throughout the city of Uberlândia, its prevalence is independent of rural or urban areas and age is considered a risk factor for the disease.

**Keywords:** Epidemiology, Indirect Immunofluorescence, polymerase chain reaction, neosporosis

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho de equinos na América Latina e o terceiro mundial que, somado aos muares (mulas) e asininos (asnós), formam um total de oito milhões de cabeças e movimentam cerca de 7,3 bilhões de reais. A maior concentração de equinos encontra-se, hoje, na região Sudeste do Brasil, e uma de suas principais funções continua sendo o trabalho diário nas atividades agropecuárias, onde aproximadamente cinco milhões de animais são utilizados, principalmente, no manejo dos bovinos (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2014).

A neosporose é uma doença mundialmente conhecida por induzir abortamentos em bovinos, além de acometer outras espécies de animais domésticos e silvestres (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007). Em equídeos permanece pouco elucidada (LINDSAY 2001; HOANE et al., 2006; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007). Existem duas espécies de protozoários do gênero *Neospora* que infectam equinos, o *Neospora caninum* e *Neospora hughesi* (Apicomplexa, Sarcocystidae), sendo que a infecção pelo primeiro tem sido associada a problemas reprodutivos e doença neonatal, e a infecção pelo segundo relacionada a distúrbios neurológicos (LINDSAY, 2001; VERONESI et al. 2008).

O *N. hughesi* foi descrito por Marsh et al. (1998), os quais isolaram o protozoário de um equino que apresentava sinais compatíveis com a mieloencefalite protozoária equina (EPM). Esta descoberta estabeleceu este parasita como mais um potencial agente etiológico da EPM, aumentando a importância do diagnóstico da neosporose em equinos (TOSCAN et al., 2010).

O hospedeiro definitivo do *N. hughesi* ainda é desconhecido e permanece incerta a forma de exposição dos equinos ao parasita e se há outros hospedeiros intermediários (HOANE et al., 2006). Por consequência, ainda não se confirmou a rota natural da infecção horizontal desse protozoário nestes animais. Já o *N. caninum* tem cães e coiotes como hospedeiros definitivos e várias espécies como hospedeiros intermediários (GONDIM, 2006), tais como os bovinos, ovinos, cães, equinos, entre outros (DUBEY e SCHARES, 2011).

A pesquisa de anticorpos anti - *Neospora* ssp. em equídeos, no Brasil, ainda é escassa e os estudos disponíveis têm revelado índices bem variados entre 0 e 64% (DUBEY; KERBER; GRANSTROM, 1999; HOANE et al., 2006; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006; VILLALOBOS et al., 2006, HOFFMANN KORMANN et al., 2008, SANGIONI et al., 2011, VILLALOBOS et al., 2012, MOURA et al., 2013).

Embora alguns estudos relativos à epidemiologia da neosporose em equídeos tenham sido realizados no Brasil, a falta de dados de referência em todo o Estado de Minas Gerais, maior produtor de equídeos do país, motivou a realização deste estudo. Portanto, objetivou-se realizar o levantamento da prevalência de neosporose em equídeos da região de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, comparar a prevalência entre as zonas rural e urbana, bem como avaliar a influência dos fatores grupo genético, gênero, idade, histórico de abortamento, utilização/atividade exercida e contato com cães e animais selvagens.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

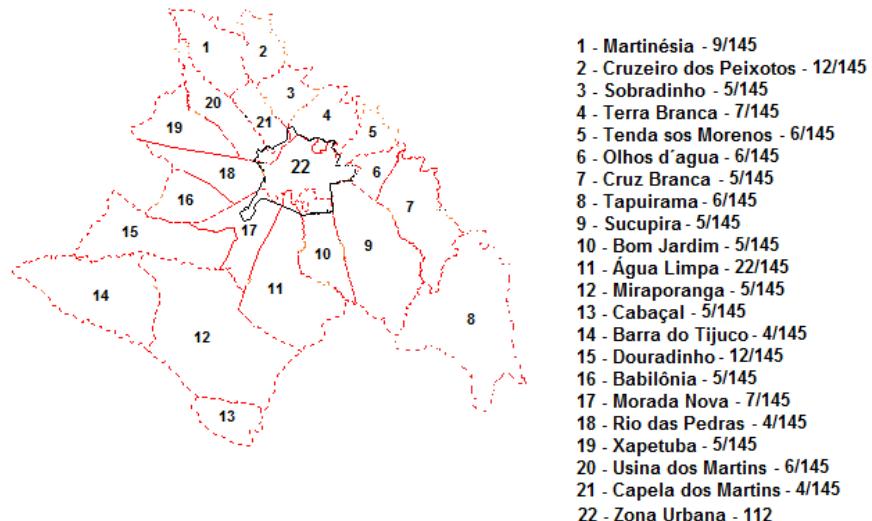
### **2.1. População estudada**

#### **2.1.1. Local de coleta e amostragem**

A pesquisa foi realizada no município de Uberlândia, situado no estado de Minas Gerais, região Sudeste do país, limitado pelas coordenadas geográficas de 18° 30' e 19° 30' de latitude sul e de 47° 50' e 48° 50' de longitude oeste. O município ocupa uma área de 4.115,09 Km<sup>2</sup> e apresenta clima tropical, com duas estações definidas, uma com verão chuvoso e outra com inverno seco, com pluviosidade anual em torno de 1500 mm e temperatura média de 22 °C (BRITO e PRUDENTE, 2005).

Foram coletadas 257 amostras de sangue de equídeos (cavalos, burros e pôneis) com idade, raça e gênero variados, sendo 145 oriundos dos 21 conselhos existentes da zona rural do município de Uberlândia, distribuídos em cinco distritos (Uberlândia, Martinésia, Cruzeiro dos Peixotos, Miraporanga e Tapuirama). Além destas, foram coletadas mais 112 amostras de sangue de

equídeos de diferentes bairros da zona urbana de Uberlândia (Figura 1). Estas amostras da zona urbana foram referentes, em sua grande maioria, de animais de tração (carroças) atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (HV-UFU), bairros do município e do Curral da Prefeitura Municipal de Uberlândia, além de animais lotados no Parque de exposição.



Fonte: Adaptado de: <http://udigis.prodaub.com.br/udigis/main2.asp>

**Figura 1.** Mapa de Uberlândia (Minas Gerais – Brasil) mostrando a divisão geográfica do Município em Conselhos e a quantidade de amostras coletadas por local.

De cada conselho foram selecionadas aleatoriamente pelo menos três propriedades rurais. As amostras dos cavalos ficaram distribuídas nos cinco distritos: a) Uberlândia - perímetro rural ( $n = 65$ ); b) Martinésia ( $n = 15$ ); c) Cruzeiro dos Peixotos ( $n = 21$ ); d) Tapuirama ( $n = 11$ ); e) Miraporanga ( $n = 33$ ) (Figura 2). As coletas foram realizadas juntamente com um médico veterinário da prefeitura municipal de Uberlândia, que acompanhou as visitas, com a finalidade de fornecer informações técnicas e as coordenadas geográficas, além de intermediar o contato com o produtor rural.

Juntamente com as coletas, foi realizado um questionário epidemiológico, contendo informações sobre as características do animal, práticas de manejo sanitário, nutricional e ambiente. Foram avaliados os parâmetros como grupo genético (cavalos, burros, e pôneis), gênero (macho e fêmea), utilização/atividade exercida (tração, esporte e reprodução), escore de

condição corporal (ECC) de 0 a 5 (CARROLL e HUNTINGTON, 1988), histórico de abortamento e contato com cães e animais selvagens (sim e não). Na zona urbana, o contato com cães foi considerado positivo para todos os animais, uma vez que a maioria dos equinos desta zona eram carroceiros e circulavam pela cidade; o contato com animais silvestres foi considerado negativo nestes mesmos animais.

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Uberlândia sob o número 071/13.

### **2.1.2. Coleta de Sangue**

O sangue foi coletado por venopunção da veia jugular dos equídeos, com previa antisepsia do local com álcool iodado, usando-se o sistema a vácuo, tubos com e sem EDTA (BD Vacutainer®) e agulhas descartáveis do tipo múltipla. Após a coleta, de aproximadamente 5 ml de sangue em tubos sem EDTA e 2ml em tubos com EDTA, as amostras foram transportadas em caixas de isopor com gelo artificial, para o Laboratório de Patologia Clínica do HV-UFG, onde foram submetidas à centrifugação de 5000 rpm por 5 minutos em centrífuga Excelsa Baby (centrífuga marca FANEM, modelo 206) e o soro separado em alíquotas de 2ml em microtubos tipo eppendorf, previamente identificados e armazenados a temperatura - 20°C, e posteriormente encaminhados ao Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública e Protozoologia da Universidade Estadual de Londrina em Londrina, Paraná, Brasil para as análises descritas abaixo.

### **2.1.3. Reação de Imunofluorescência indireta – RIFI**

Para a realização das análises sorológicas para a detecção de anticorpos anti-*Neospora* spp. (CONRAD et al.1993; PARÉ; HIETALA; THURMOND, 1995), foram utilizadas lâminas contendo taquizoítos de *Neospora caninum* como antígeno (Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública e Protozoologia da Universidade Estadual de Londrina - PR) e conjugados anti-IgG equino (Sigma Chemical©) previamente padronizado na diluição 1:250. A

leitura foi realizada em um microscópio de epifluorescência (Nikon Lapophot) onde foi considerado positivo animais com título igual ou superior a 50.

#### **2.1.4. Reação em cadeia pela Polimerase – PCR**

As amostras de sangue foram submetidas à extração de DNA genômico utilizando um kit comercial (Wizard Genomic DNA Purification Kit - Promega®, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para a detecção de DNA de *N. caninum* foi utilizado os oligonucleotídeos iniciadores Np21 plus (5'-GGGTGTGCGTCCAATCCTGTAAC-3') e Np6 plus (5'-CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT-3'), conforme descritos por Hughes et al. (2006) que amplificam uma sequencia de 337 pb do gene Nc5 do DNA genômico do *N. caninum*.

A reação foi realizada utilizando 5 µL de DNA extraído, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de dNTP (Invitrogen®, Life Technologies, EUA), 1 mM de cada primer, 60 mM Tris-HCl (pH 9,0) 15 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5U de Taq-DNA polimerase (Invitrogen®, Life Technologies EUA), e H<sub>2</sub>O Mili-Q estéril perfazendo um total de 25µL. Foi realizada a seguinte programação: 95°C por 4 minutos para desnaturação inicial, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 55°C por 1 minuto para anelamento e 72°C por 2 minutos para extensão e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Controles positivos e negativos foram incluídos em todas as reações. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corados com Sybr® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®, Life Technologies, EUA) e visualizados e fotodocumentos sobre luz UV por meio do transiluminador Safe Imager™ (Invitrogen®, EUA).

### **2.2. Análise estatística**

Para cada variável foram calculados a prevalência, intervalo de confiança (95%) e risco relativo utilizando-se o programa estatístico SISVAR. Os fatores de risco foram avaliados utilizando-se o teste de qui-quadrado (comparação de frequências de positivos entre zona rural e urbana, entre

positivos com e sem histórico de abortamento e comparação de frequências da idade e trabalho na zona rural e urbana) ou o teste exato de Fisher (comparação de frequências entre gênero e contato com cães e animais silvestres da zona rural e urbana). Para comparação da média do ECC utilizou-se o teste de Mann-Whitney com o programa estatístico Graphpad Instat. Todos os resultados foram considerados significantes quando  $P \leq 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

A prevalência da infecção por *Neospora spp.* na RIFI e PCR em equídeos do Município de Uberlândia-MG estão apresentadas na tabela 1. Das 257 amostras sanguíneas coletadas, 13,2% (34/257) resultaram em positivas na RIFI para *Neospora spp.*, sendo a soroprevalência no meio rural de 15,9% (23/145) e de 9,8% (11/112) no meio urbano. Não houve diferença nas soroprevalências encontradas no meio rural e urbano ( $P = 0,218$ ).

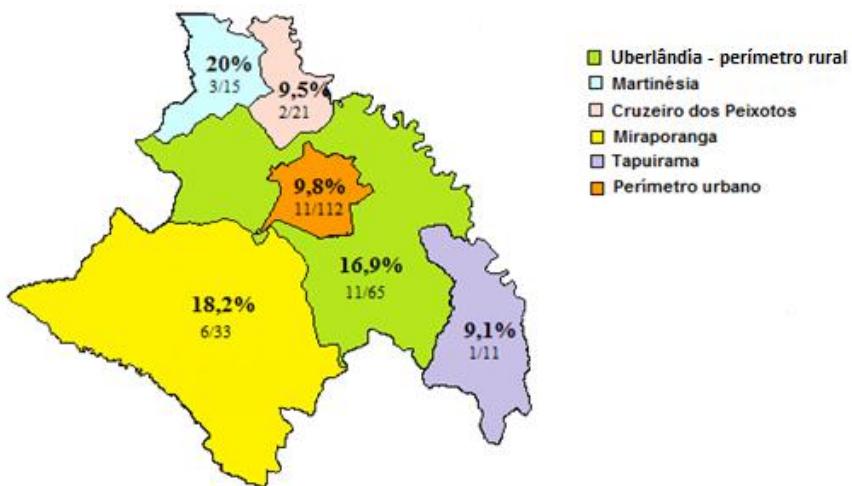
Na PCR foi encontrada a prevalência geral de 1,2% (3/257) (Tabela 1). Apenas duas amostras foram positivas na zona rural, correspondendo a 1,4% (2/145) das amostras coletadas nesta área. Destes animais, um era pônei pertencente a Douradinho (Distrito de Miraporanga) e o outro um equino da Tenda dos Morenos (Distrito de Uberlândia – perímetro rural). Na zona urbana apenas um animal foi diagnosticado positivo, correspondente a 0,89% (1/112). Não houve diferença entre as prevalências encontradas no meio rural e urbano ( $P = 0,719$ ). No entanto, houve diferença significativa ( $P < 0,0001$ ) ao comparar a frequência de animais positivos entre as técnicas de RIFI e PCR.

**Tabela 1.** Prevalência da infecção por *Neospora spp.* na Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em equídeos do Município de Uberlândia-MG.

	RIFI	PCR	
<b>Geral</b>	13,2% (34/257) <sup>A</sup>	1,2% (3/257) <sup>B</sup>	$P < 0,0001$
<b>Zona Rural</b>	15,9% (23/145) <sup>a</sup>	1,4% (2/145) <sup>a</sup>	
<b>Zona Urbana</b>	9,8% (11/112) <sup>a</sup>	0,89% (1/112) <sup>a</sup>	
	$P = 0,218$	$P = 0,719$	

Nota: letras maiúsculas diferentes na linha e minúsculas na coluna evidenciam diferença significativa no teste de qui-quadrado ( $P < 0,05$ ).

A soroprevalência, avaliada pela RIFI (Figura 2), por distritos foi de 20% (3/15) em Martinésia (2 - Conselho Martinésia e 1 - Usina), 9,5% (2/21) em Cruzeiro dos Peixotos (1 - Cruzeiro e 1 - Capela), 18,2% (6/33) em Miraporanga (2- Cabaçal, 2 - Barra do Tijuco, 1- Miraporanga e 1 - Morada Nova), 9,1% (1/11) em Tapuirama (1 - Tapuirama) e 16,9% (11/65) em Uberlândia – perímetro rural (6 - Água Limpa, 2 - Babilônia e 3 - Terra Branca).



Fonte: Adaptado de: <http://udigis.prodaub.com.br/udigis/main2.asp>

**Figura 2.** Porcentagem de animais positivos na Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) para *Neospora spp.*, distribuídos por distritos na zona rural e Perímetro urbano do Município de Uberlândia- MG.

Os fatores grupo genético, idade, gênero, atividade/utilização, localização dos animais, histórico de abortamento, contatos com cães e animais silvestres foram investigados em relação à presença de anticorpos anti- *Neospora spp.* em equídeos (Tabelas 2, 3 e 4). Na técnica da RIFI, somente a idade foi significativa ( $P \leq 0,05$ ) e considerada fator de risco tanto na zona rural quanto na urbana (Tabelas 2 e 3), sendo os animais maiores de cinco anos mais susceptíveis do que os animais mais jovens.

**Tabela 2.** Fatores de risco associados à infecção por *Neospora spp.* na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em equídeos da zona rural do município de Uberlândia.

Fatores de Risco	Número de amostras	Positivos (%) <sup>b</sup>	95% CI <sup>c</sup>	P <sup>d</sup>	RR (95%CI)	P
<b>Grupo genético</b>				0,489		
Equinos	133	22 (16,5)	10,7 – 24,0		1	
Mulas	5	1 (20,0)	0,5 – 71,6		1,21 (0,2 – 7,3)	1
Pôneis	7	0 (0)	0 – 41,0		-	0,596
<b>Gênero</b>				0,821		
Fêmea	77	13 (16,9)	9,3 – 27,1		1	
Macho	68	10 (14,7)	7,3 – 25,4		0,87 (0,41 – 1,9)	0,821
<b>Grupo por idade</b>				0,05		
< 5 anos	43	2 (4,6)	0,6 – 15,8		1	
6 – 14 anos	91	19 (20,9)	13,1 – 30,7		4,5 (1,1 – 18,41)	0,020*
>14 anos	11	2 (18,2)	2,3 – 51,8		3,9 (0,62 – 24,7)	0,18
<b>Atividade</b>				0,68		
Reprodução	28	3 (10,7)	2,3 – 28,2		1	
Tração	110	19 (17,3)	10,7 – 25,6		1,61 (0,51 – 5,1)	0,566
Esporte	5	1 (20,0)	0,5 – 71,6		1,87 (0,24 – 14,6)	0,5
<b>Contato com cães</b>						
Sim	144	22 (15,3)	9,8 – 22,2		-	
Não	-	-	-		-	
<b>Contato com animais selvagens</b>				0,183		
Não	134	8 (23,5)	10,7 – 41,2		1	
Sim	111	15 (13,5)	7,8 – 21,3		0,57 (0,27 – 1,2)	0,183

Nota: <sup>a</sup> Número de animais positivos; <sup>b</sup> Prevalência; <sup>c</sup> Intervalo de confiança; <sup>d</sup> P valor; \* Fator significativo; CI, intervalo de confiança; RR, risco relativo.

**Tabela 3.** Fatores de risco associados à infecção por *Neospora spp.* na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em equídeos da zona urbana do município de Uberlândia.

Fatores de Risco	Número de amostras	Positivos (%) <sup>b</sup>	95% CI <sup>c</sup>	P <sup>d</sup>	RR (95%CI)	P
<b>Grupo genético</b>				0,269		
Equinos	109	10 (9,2)	4,5 – 16,2		1	
Mulas	3	1 (33,3)	0,8 – 90,6		3,6 (0,66 – 20,0)	0,269
<b>Gênero</b>				0,755		
Fêmeas	64	7 (10,9)	4,5 – 21,2		1	
Machos	48	4 (8,3)	2,3 – 20,0		0,76 (0,24 – 2,5)	0,755
<b>Idade por grupo</b>				0,031*		
< 5 anos	11	0 (0)	0 – 28,5		0	0,595
6 - 14 anos	92	8 (8,7)	3,8 – 16,4		1	
> 14 anos	9	3 (33,3)	7,5 – 70,1		3,8 (1,23 – 11,9)	0,057
<b>Atividade</b>				0,495		
Reprodução	15	1 (6,7)	0,2 – 31,9		1	
Tração	74	9 (12,2)	5,7 – 21,8		1,8 (0,25 – 13,3)	1
Esporte	23	1 (4,3)	0,1 – 21,9		0,65 (0,04 – 9,6)	1

Nota: <sup>a</sup> Número de animais positivos; <sup>b</sup> Prevalência; <sup>c</sup> Intervalo de confiança; <sup>d</sup> P valor; \* Fator significativo; CI, intervalo de confiança; RR, risco relativo.

Houve diferença no ECC dos animais positivos e negativos na RIFI, sendo de  $3,0 \pm 0,5$  dos animais negativos e  $3,2 \pm 0,3$  dos positivos ( $P = 0,0368$ ). Ao separar os animais dentro das zonas rural e urbana, esta diferença não ocorreu entre os animais. Na zona rural os animais positivos apresentaram o ECC de  $3,3 \pm 0,5$  e nos negativos  $3,1 \pm 0,5$  ( $P = 0,078$ ). Na zona urbana os

animais positivos apresentaram o ECC de  $2,9 \pm 0,3$  e nos negativos  $2,8 \pm 0,5$  ( $P = 0,639$ ).

No histórico dos animais verificou-se que 15,9% (41/257) dos animais investigados apresentaram aborto, no entanto este evento não interferiu na soroprevalência (RIFI) de animais com e sem histórico de abortamento ( $P = 0,081$ ), respectivamente, de 21,9% e 11,6% (Tabela 4). No exame da PCR as três amostras positivas tiveram histórico de abortamento.

**Tabela 4.** Prevalência da infecção por *Neospora spp.* na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em equídeos com e sem histórico de abortamento no Município de Uberlândia-MG.

	Com histórico de	Sem histórico de	$P = 0,081$
	aborto	aborto	
<b>Geral</b>	21,9% (9/41) <sup>A</sup>	11,6% (25/216) <sup>A</sup>	
<b>Zona urbana</b>	10,5% (2/19) <sup>a</sup>	9,7% (9/93) <sup>a</sup>	
<b>Zona rural</b>	31,8% (7/22) <sup>a</sup>	13% (16/123) <sup>a</sup>	
	$P = 0,14$	$P = 0,523$	

Nota: letras maiúsculas diferentes na linha e minúsculas na coluna evidenciam diferença significativa no teste de qui-quadrado ( $P < 0,05$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

Nos últimos anos demonstrou-se o papel do *Neospora spp.* na doença neurológica de cavalos, como a EPM (MARSH et al., 1996), e Cheadle et al. (1999) sugeriram que a infecção possa ser mais prevalente do que se suspeita.

Este estudo revelou que a soroprevalência dessa enfermidade, em equídeos no Município de Uberlândia, foi de 13,23%, semelhante aos descritos por Toscan et al. (2010) e Sangioni et al. (2011) no Rio Grande do Sul e de Villalobos et al. (2012) no Paraná, respectivamente, de 13,8%, 15,4% e 14,4%.

Nas pesquisas de Dubey, Kerber e Granstrom (1999), em 101 cavalos, e de Hoane et al. (2006), em 961 equinos de diferentes estados brasileiros, os autores concluíram que o agente é incomum na população de equinos. Um levantamento recente no estado de Santa Catarina, em 615 cavalos, também demonstrou uma soroprevalência de 4,1% (MOURA et al., 2013). Somente duas pesquisas relataram valores muito acima da maioria dos levantamentos realizados em território brasileiro, ambos no estado do Paraná de 64%

(HOFFMANN-KORMANN et al., 2008) e 47% (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006). Na única pesquisa encontrada na região de Minas Gerais, Hoanne et al. (2006) encontraram a soroprevalência de 0%, no entanto, este levantamento foi de apenas 10 amostras.

Os resultados de levantamentos epidemiológicos da doença em outros países também apresentaram estas amplitudes de variação nas soroprevalências. A soroprevalência da presente pesquisa em Uberlândia foi semelhante à encontrada nos Estados Unidos (McDOLE e GAY, 2002) e em Israel (KLIGLER et al., 2007) de 13% e 11,9%, respectivamente. Os resultados foram superiores ao encontrado por Gupta et al. (2002) (Coréia do Sul), Jakubek et al. (2006) (Suécia), Dangoudoubiyam et al. (2011) (Costa Rica), Yeargan et al. (2013) (México) com 2%, 1%, 3,5% e 3%, respectivamente, e menor que a encontrada por Ciaramella et al. (2004) (Itália), Dubey et al. (2003) (Estados Unidos), Patitucci et al. (2004) (Chile), Bártová et al. (2010) (República Tcheca), Moraveji et al. (2011) (Irã), Hosseini et al. (2011) (nordeste do Irã) e Gharekhani, Tavoosidana e Naderisefat (2013) (Irã) de 28%, 31,1%, 32%, 24%, 32%, 30% e 45,9%, respectivamente.

Os resultados aqui expressados não podem ser focados especificamente em uma das duas espécies de *Neospora spp.* que afetam os equídeos, pois segundo Hoane et al. (2005) a distinção entre *N. caninum* e *N. hughesi* só pode ser feita por meio de características moleculares. Uma vez que nos métodos sorológicos pode existir reatividade cruzada entre ambas as espécies do parasita (MARSH et al., 1998; WALSH et al., 2000).

A neosporose clínica em cavalos adultos tem sido relatada apenas nos Estados Unidos, incluindo os casos recentes da Califórnia (FINNO; EATON; ALEMAN, 2010). Segundo Locatelli-Dittrich et al. (2006) os cavalos soropositivos devem ser mantidos sob controle para eventuais manifestações clínicas, além de submeter essas amostras para análise direta com cultura de células ou PCR. A PCR realizada neste estudo mostrou que apenas três amostras foram positivas, sendo que as mesmas resultaram em negativas na RIFI, o que indicaria que possivelmente somente essas amostras tiveram contato recente com o parasita.

No presente experimento verificou-se diferença na positividade entre as técnicas RIFI e PCR, o que pode ser explicada de acordo com Vardeleon et al. (2001), que a RIFI identifica todas as amostras reagentes, sendo portanto, altamente sensível. No entanto, a presença de anticorpos indica que houve exposição ao parasita ou a um parasita estreitamente relacionado, passível de reação cruzada, não indicando necessariamente a existência de uma infecção ativa (ALMEIDA e MELO, 2011; PIAZZETTA, 2012). Já a PCR tem como vantagem de detectar o parasita em número muito reduzido ou mesmo lisado (HOWE et al., 1997), porém, o uso de amostras de sangue periférico pode resultar em menor sensibilidade do teste de PCR devido à baixa parasitemia dos animais infectados (FISA et al., 2001).

Não houve diferença significativa entre a soropositividade da área rural e urbana. Devido possivelmente a proximidade dos animais da zona rural com cães e /ou bovinos, que são as espécies mais importantes no ciclo biológico de *N. caninum* (DUBEY; SHARES de 2011). Isto demonstra a importância destas espécies na introdução e/ou manutenção de infecção na fazenda, e, talvez, em relação a sua propagação para cavalos (MOURA et al, 2013). Como os cães são hospedeiros definitivos de *N. caninum* e a ingestão de suas fezes podem infectar outros animais (McALLISTER et al., 1998), a ingestão de forragem contaminada por cavalos em áreas urbanas poderia aumentar o risco de infecção pelo parasita (VILLALOBOS et al., 2012).

Na região de Uberlândia já se demonstrou a prevalência de *Neospora* spp. tanto em cães da zona rural quanto urbana e periurbana, sendo a maior prevalência na zona rural de 21,7% (FERNANDES et al., 2004). Este fato pode ser explicado pela maior exposição destes cães ao protozoário, devido ao hábito de caçar pequenos mamíferos e pássaros, que são hospedeiros intermediários potenciais do parasita, além de maior chance de ingestão de oocistos ambientais ou de cistos presentes em tecidos bovinos (NOGUEIRA, 2012). Ragozo et al. (2003) mostraram que a soropositividade em bovinos no Estado de Minas Gerais (29%) foi a maior entre seis estados avaliados no Brasil. No presente estudo, 100% das propriedades rurais, onde as amostras de sangue foram colhidas, apresentaram criações de bovinos de leite ou corte.

O contato com animais selvagens nas áreas rurais, neste experimento, não foi considerado um fator de risco para a doença. Embora estudos em animais silvestres tenham reforçado a teoria da existência do ciclo silvestre da neosporose (WOODS et al., 1994; DUBEY et al., 1996; DUBEY; KERBER; GRANSTROM, 1999; LINDSAY; LITTLE; DAVIDSON, 2002), sua interferência no desenvolvimento desta enfermidade em bovinos domésticos ainda permanece pouco esclarecido. Demonstrou-se por meio de avaliações moleculares que o parasito existente em cervídeos é idêntico ao encontrado em animais domésticos, bem como é possível que tecidos daqueles animais, naturalmente infectados, sejam fontes de infecção para cães domésticos (GONDIM et al., 2004).

O fator grupo genético não representou um risco, corroborando com o encontrado por Gharekhani, Tavoosidana e Naderisefat, (2013) e Kligler et al. (2007). Em relação ao gênero, também não foi encontrada diferença significativa, semelhante ao descrito por diversos autores (KLIGLER et al., 2007; MOURA et al., 2013, CIARAMELLA et al., 2004, HOSSEINI et al., 2011, MORAVEJI et al., 2011), indicando assim que não há qualquer associação entre a presença de anticorpos anti-*Neospora* spp e o gênero dos animais.

O único fator de risco associado à doença identificado nesta pesquisa foi a idade dos animais e demonstrou-se que animais com idade superior a 5 anos têm maior predisposição, como o encontrado por Kligler et al. (2007), que pesquisou em 800 amostras de cavalos assintomáticos oriundos de 48 fazendas de diferentes regiões geográficas de Israel. Estes mesmos autores, pesquisaram em 52 éguas que abortaram e 40 cavalos com sinais neurológicos que foram submetidos ao diagnóstico no laboratório do Instituto Veterinário Kimron (Israel), encontrando a soropositividade de 37,5% e 21,2%, respectivamente.

Esse resultado em relação ao fator idade sugere que a infecção pós-natal pode ter ocorrido (CIARAMELLA et al., 2004). Em virtude disto, verifica-se que a transmissão vertical em cavalos, pode ser menos eficiente do que nos bovinos, que poderia ser explicada por diferenças na placentação como foi sugerido anteriormente (PITEL et al., 2003).

Moura et al., (2013) não encontraram diferença entre os grupos de idade, eles trabalharam com 615 cavalos saudáveis provenientes de 59 rebanhos de duas regiões, Serrana ( $n = 311$ ) e Costeira ( $n = 304$ ) no sul do Brasil.

O papel do *Neospora spp.* em casos de abortos equinos foi sugerido primeiramente por Dubey e Porterfield (1990), quando Taquizoitos de *Neospora* foram detectados nos tecidos de um feto abortado. Segundo Villalobos et al. (2006), os sinais clínicos tardios de distúrbios reprodutivos em éguas estão associados positivamente à infecção por protozoários do gênero *Neospora* e, apontam para o fato de que a participação deste grupo de parasitas na origem de distúrbios reprodutivos em equinos deve ser investigado.

Neste estudo, não houve diferença entre os grupos de animais positivos com e sem histórico de abortamento, apesar deste ter sido significativo nas pesquisas de Kligler et al. (2007), Pitel et al. (2003) e Villalobos et al. (2006). Outros estudos não demonstraram essa diferença estatística significativa (PITEL et al., 2001; McDOLE e GAY., 2002). Sugere-se neste caso que o aborto seja provocado por outras enfermidades e que deva ser melhor investigado.

A Neosporose é uma enfermidade cosmopolita que causa grande impacto na produção animal, além de o *Neospora spp.* ter papel como possível agente etiológico da EPM, uma importante doença neurológica em equinos. Portanto torna-se fundamental encontrar um método de diagnóstico eficaz para a diferenciação de ambas as espécies deste protozoário, bem como elucidar o ciclo biológico do *N. hughesi*, que vem sendo encontrado com soroprevalências de 2% e 3% nos Estados Unidos (VARDELEON et al., 2001; YEARGAN et al., 2013).

## 5. CONCLUSÃO

Foi constatada a presença de *Neospora spp.* distribuído em todo o município de Uberlândia, sua prevalência independe de ser zona rural ou urbana e a idade é considerada um fator de risco para a doença.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, H. K. A.; MELO, M. A. Evidência sorológica e molecular de Erliquiose canina no município de Patos. Campina Grande PB. *Anais... IX Congresso de iniciação científica da Universidade Federal de Campina Grande*. PIBIC/CNPq/UFCG-2011.

BÁRTOVÁ, E.; SEDLAK, K.; SYROVA, M.; LITERAK, I. *Neospora spp. and Toxoplasma gondii antibodies in horses in the Czech Republic*. **Parasitology Research**, v.107, n.4, p. 783–785. 2010.

BRITO, J. L. S.; PRUDENTE, T. D. Mapeamento do uso da terra e cobertura vegetal do município de Uberlândia – MG, utilizando imagens ccd/cbers 2. **Caminhos de Geografia**, Uberlândia, v. 13, n. 15, p. 144-153, 2005.

CARROLL, C. L.; HUNTINGTON, P. J. Body condition scoring and weight estimation of horses. **Equine Veterinary Journal**., v. 20-1, p.41-45, 1988.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M.; CORTESE, L.; PIANTEDOSI, D.; SANTORO, D.; DiLORIA, A.; RIGATO, R. Seroprevalence of *Neospora* spp. n asymptomatic horses in Italy. **Veterinary Parasitology**. v. 13, n.123(1-2), p.11-5, aug 2004.

CHEADLE, M.A.; LINDSAY, D.S.; ROWE, S.; DYKSTRA, C.C.; WILLIAMS, M.A.; SPENCER, J.A.; TOIVIO-KINNUCAN, M.A.; LENZ, S.D.; NEWTON, J.C.; ROLLSMA, M.D.; BLAGBURN, B.L. Prevalence of antibodies to *Neospora* sp. in horses from Alabama and characterization of an isolate recovered from a naturally infected horse. **International Journal for Parasitology** . v. 29, p.1537–1543. 1999.

CONRAD, P. A.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M.; BOM-DURANTE, R.; TUTER, G.; BREITMEYER, R.; PALMER, C.; THURMOND, M.; ARDANS, A. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental

Neospora infections. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, USA, v. 5, n. 4, p. 572-578, 1993.

DANGOUDOUBIYAM, S.; OLIVEIRA, J.B.; VIQUEZ, C.; GOMEZ-GARCIA, A.; GONZALEZ, O.; ROMERO, J.J.; KWOK, C.H.; DUBEY, J.P.; HOWE, D.K. Detection of Antibodies Against *Sarcocystis neurona*, *Neospora* spp., and *Toxoplasma gondii* in Horses From Costa Rica. **Journal of Parasitology**. v. 97, N. 3, pp. 522-524, June 2011.

DUBEY, J. P.; PORTERFIELD, M. L. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.76, n.5, p.732-734, 1990.

DUBEY J.P.; KERBER, C.E.; GRANSTROM, D.E. Serologic prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in horses from Brazil. **Journal of American Veterinary Medicine Association**. v.215, n.7, p.970-972, out. 1999.

DUBEY, J.P.; MITCHELL, S.M.; MORROW, J.K.; RHYAN, J.C.; STEWART, L.M.; GRANSTROM, D.E.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; SAVILLE, W.J.; LINDSAY, D.S. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Toxoplasma gondii* in wild horses from central Wyoming. **Journal of Parasitology**, v. 89, n.4, p. 716–720. 2003.

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

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

DUBEY, J.P.; RIGOULET, J.; LAGOURETTE, P.; GEORGE, C.; LONGEART L.; LENET, J. L. Fatal transplacental neosporosis in a deer (*Cervus eldi siamensis*). **Journal of Parasitology**. v. 82, p.338–339, 1996.

DUBEY J.P .;K. HOLLIS, S. ROMAND, P. THULLIEZ, O. C. KWOK, L. HUNGERFORD, C. ANCHOR, AND D. ETTER. High prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*).

**International Journal for Parasitology**. v. 29, p. 1709–1711, 1999.

FERNANDES, B. C. T. M.; GENNARI, S. M.; SOUZA, S. L. P.; CARVALHO, J. M.; OLIVEIRA, W. G.; CURY, M. C. Prevalence of anti-*N. caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city Uberlândia, Minas Gerais – Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 123, n.1- 2, p. 33-40, 2004

FINNO, C.J.; EATON, J.S.; ALEMAN M.; HOLLINGSWORTH, S.R. Equine protozoal myeloencephalitis due to *Neospora hughesi* and equine motor neuron disease in a mule. **Veterinary Ophthalmology**. v.13, n.4, p. 259–265. Jul. 2010.

FISA, R.; RIEIRA, C.; GÁLLEGOS, M.; MANUBENS, J.; PORTUS, M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. **Veterinary Parasitology**, v. 99, n. 2, p. 105-111, 2001.

GHAREKHANI, J.; TAVOOSIDANA, G.R.; NADERISEFAT, G.R. Seroprevalence of *Neospora* infection in horses and donkeys in Hamedan province, Western Iran, **Veterinary World**. v. 6, n.9, p. 620-622, 2013.

GONDIM, L.F.P. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends in Parasitology**, Oxford v. 22, n. 6, p. 247-252, jun. 2006.

GONDIM, L. F.; McALLISTER, M. M.; MATEUS-PINILLA, N. E.; PITT, W. C.;

MECH, L. D.; NELSON, M. E. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. **The Journal of Parasitology**, Lincoln, v. 90, n. 6, p. 1361-1365. dez. 2004.

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

HOANE, J. S.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; RIBEIRO, M. G.; BORGES, A. S.; YAI, L. E. O.; AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; BONESI, G .L.; HOWE, D. K. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora* spp. Infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 136, n. 2, p. 155-159, mar. 2006.

HOANE, J.S.; YEARGAN, M.R.; STAMPER, S.; SAVILLE, W.J.; MORROW, J.K.; LINDSAY, D. Recombinant NhSAG1 ELISA: a sensitive and specific assay for detecting antibodies against *Neospora hughesi* in equine serum. **Journal of Parasitology**. v. 91, n.2, p. 446-452. 2005.

HOFFMANN-KORMANN, D.C.S.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; RICHARTZ, R.R.T.B.; ANTUNES, J.; DITTRICH, J.R.; PATRÍCIO, L.F.L. Soroprevalência e cinética mensal de anticorpos anti-*Neospora* sp. em éguas gestantes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 17, n.S1, p. 335-338, 2008.

HOSSEINI, M.H.; MORAVEJI, M.; TAHAMTAN, Y.; RAHIMIAN, A.; MOHAMMADI, G.H.; NAMAVARI, M.M. Seroprevalence of *Neospora* spp. in Horses in North East of Iran. **Iranian Journal of Parasitology**. v. 6, n.2, p.64-68. 2011.

HOWE, D.K., HONORÉ, D., DEROUIN,F., SIBLEY,L.D. Determonation of Genotypes of *Toxoplasma gondii* Strains Isolated from Patiens with

Toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 35, n.6, p. 1411-1414, 1997.

HUGHES, J.M.; WILLIAMS, R.H.; MORLEY, E.K.; COOK, D.A.; TERRY, R.S.; MURPHY, R.G.; SMITH, J.E.; HIDE, G. The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. **Parasitology**. v.132, n. 1, p.29-36, jan. 2006.

JAKUBEK E.B. et al. Seroprevalences of *Toxoplasma gondii* and *Neospora* sp. infections in Swedish horses. **Veterinary Parasitology**, v.138, p.194-199, 2006.

KLIGLER, E.B.; SHKAP,V.; BANETH, G.; MILDENBERG, Z.; STEINMAN, A. Seroprevalence of *Neospora* spp. among assymptomatic horses, aborted mares and horses demonstrating neurological signs in Israel. **Veterinary Parasitology**. v.148, n.2, p.109-13, set. 2007.

LINDSAY, D.S. Neosporosis: An emerging protozoal disease of horses. **Equine Veterinary Journal**, London . v. 33, n.2, p. 116-118, mar. 2001.

LINDSAY, D. S.; LITTLE, S. E.; DAVIDSON, W. R. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in white-tailed deer, *Odocoileus virginianus*, from the southeastern United States. **Journal of Parasitology**. v.88, p.415–417, 2002.

LOCATELLI-DITTRICH R.; DITTRICH, J.R.; RICHARTZ, R.R.; GASINO JOINEAU, M.E; ANTUNES, J.; PINCKNEY, R.D.; DECONTI, I.; HOFFMANN, D.C.; THOMAZ-SOCCOL, V. Investigation of *Neospora* sp. and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Parana state, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.135, p.215-221, 2006.

MARSH, A.E.; BARR, B.C.; PACKHAM, A.E. & CONRAD, P.A. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **Journal of parasitology**, Lawrence, v. 84, n.5, p. 983-991, jun. 1998.

MARSH, A. E.; BARR, B. C.; MADIGAN, J. E.; CONRAD, P. A. **In vitro cultivation and characterization of a *Neospora* isolate obtained from a horse with protozoal myeloencephalitis.** In: AMERICAN SOCIETY PARASITOLOGY AND THE SOCIETY OF PROTOZOOLOGISTS, n., Arizona, 1996. proceedings... Arizona: editora, 1996. Abstract, 114.

McALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A.; McGUIRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology.** v. 28, n.9, p. 1473-1478, 1998.

McDOLE, M.G.; GAY, J.M. Seroprevalence of antibodies against *Neospora caninum* in diagnostic equine serum samples and their possible association with fetal loss. **Veterinary Parasitology.** v.105, n.3, p. 257-260. 2002.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, Acesso em: 25/02/2014. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>.

MOURA, A.B., SILVA, M.O., FARIAS, J.A., VIEIRA-NETO, A., SOUZA, A.P., SARTOR, A.A., FONTEQUE, J.H., BUNN, S. *Neospora* spp. antibodies in horses from two geographical regions of the state of Santa Catarina, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 22, n. 4, p. 597-601, out.-dez. 2013.

MORAVEJI, M.; HOSSEINI, M.H.; AMRABADI, O.; RAHIMIAN, A.; NAMAZI, F.; NAMAVARI, M. Seroprevalence of *Neospora* spp. in horses in South of Iran. **Tropical Biomedicine.** v. 28, n.3, p. 514–517, 2011.

NOGUEIRA, C. I. **Estudo prospectivo de *neospora caninum* em cães do sul de minas.** Dissertação (mestrado) apresentada á Universidade Federal de Lavras. UFLA, 2012, 113p.

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

PATITUCCI, A.N.; PÉREZ, M.J.; CÁRCAMO, C.M.; BAEZA, L. Presencia de anticuerpos sericos contra *Neospora caninum* en equinos en Chile. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.36, n. 2, p. 203-206. 2004.

PIAZZETTA, T.L.G. **Prevalência de *Sarcocystis neurona* e *Neospora huguei* em equinos do Paraná com base na presença de anticorpos específicos aos抗ígenos de superfície dos parasitos.** 2012. 82f.Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

PITEL, P.H.; PRONOST, S.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; FORTIER, G.; BALLET, J.J. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horses in France **Equine Veterinary Journal**. v.33, p. 205–207. 2001.

PITEL, P.H.; ROMAND, S.; PRONOST, S.; FOUCHER, N.; GARGALA, G.; MAILLARD, K.; THULLIEZ, P.; COLLOBERT-LAUGIER, C.; TAINTURIER, D.; FORTIER, G.; BALLET, J.J. Investigation of *Neospora* sp. antibodies in aborted mares from Normandy, France. **Veterinary Parasitology**. v.118, p. 1–6. 2003.

RAGOZO, A.M.A., PAULA, V.S.O., SOUZA, S.L.P., BERGAMASCHI, D.P., GENNARI, S.M. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis estados brasileiros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.12, n. 1, p. 33-37, 2003.

SANGIONI, L. A.; BOTTON, S. A.; CARGNELUTTI, J. F.; CADORE, G. C.; CEZAR, A. S.; WEIBLEN, R.; LOPES, S. T. A.; VOGEL, F. S. F. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora* spp. e anti-herpersvírus equino em cavalos de tração no município de Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.2, p. 321-323, fev, 2011.

TOSCAN, G., CADORE, G.C., PEREIRA, R.C.F., SILVA, G.B., CEZAR, A.S., SANGIONI, L.A., OLIVEIRA, L.S.S., VOGEL, F.S.F. Neosporose equina: ocorrência de anticorpos anti-Neospora spp. e associação entre status sorológico de éguas e de suas crias. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 30, n.8, p. 641-645, agosto 2010.

VARDELEON, D., MARSH, A.E., THORNE, J.G., LOCH, W., YOUNG, R., JOHNSON, P.J. Prevalence of *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from various geographical locations. **Veterinary Parasitology**, v.95, p.273-282, 2001.

VERONESI, F.; DIAFERIA, M.; MANDARA, M.T.; MARENZONI, M.L.; CITTADINI, F.; FIORETTI, D.P. *Neospora* spp. infection associated with equine abortion and/or stillbirth rate. **Veterinary Research Communications**. v.32, n.1, p.223-226. 2008.

VILLALOBOS E.M.; UENO, T.E.; SOUZA, S.L.; CUNHA, E.M.; CARMO, C.S.H. L.M.; GENNARI, S.M.; SOARES, R.M. Association between the presence of serum antibodies against *Neospora* spp. and fetal loss in equines. **Veterinary Parasitology**, v.142, p.372-375, 2006.

VILLALOBOS, E.M.; FURMAN, K.E.; LARA, M.C.; CUNHA, E.M.; FINGER, M.A.; BUSC, A.P.; BARROS FILHO, I.R.; DECONTO, I.; DORNBUSCH, P.T.; BIONDO, A.W. Detection of *Neospora* sp antibodies in cart horses from urban areas of Curitiba, Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**. v. 21, n.1, p. 68–70, 2012.

WALSH, C.P.; DUNCAN, R.B.; ZAJAC, A.M.; BLAGBURN, B.L.; LINDSAY, D.S. *Neospora hughesi*: experimental infections in mice, gerbils and dogs. **Veterinary Parasitology**. v.92, p. 119–128. 2000.

WOODS, L.W., ANDERSON, M.L.; SWIFT, P.K.; SVERLOW, K. W. Systemic neosporosis in a California black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.** v. 6. P. 508–510. 1994.

YEARGAN, M.R.; ALVARO-ESQUIVEL, C.; DUBEY, J.P.; HOWE, D.K. Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* and *Neospora hughesi* in horses from Mexico. **Parasite.** v.20, p. 29, 2013.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO EQUÍDEOS

Data coleta: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

Nº da amostra: \_\_\_\_\_

Nome da propriedade: \_\_\_\_\_ Conselho: \_\_\_\_\_

Presença de animais na propriedade: ( \_\_\_ ) Equinos; ( \_\_\_ ) Bovinos; ( \_\_\_ ) Felinos;  
( \_\_\_ ) caninos; ( \_\_\_ ) suínos; ( \_\_\_ ) Aves; ( \_\_\_ ) ovinos; ( \_\_\_ ) caprinos;

Proprietário: \_\_\_\_\_

**Características do animal:**

Nome: \_\_\_\_\_ Sexo: Macho ( ) Fêmea ( ) Pelagem: \_\_\_\_\_

Raça: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ ECC: \_\_\_\_\_

Tipo de criação: ( ) solto a pasto; ( ) Baia; ( ) piquete; ( ) misto; ( ) \_\_\_\_\_

Tipo de utilização: ( ) Trabalho; ( ) Esporte; ( ) Trabalho e Esporte;

Contato com gatos: ( ) Sim; ( ) Não; ( ) Não sabe.

Contato com cães: ( ) Sim; ( ) Não; ( ) Não sabe.

Contato com gambás: ( ) Sim; ( ) Não; ( ) Não sabe.

Já observou algum animal silvestre na propriedade: ( ) gambá; ( ) cachorro do mato

( ) outro: \_\_\_\_\_

**Características de alimentação:**

Pasto: sim ( ) não ( )

Feno: sim ( ) não ( )

Ração comercial: sim ( ) não ( )

Outros: \_\_\_\_\_

Armazenamento da alimentação: \_\_\_\_\_

**Fonte de água:**

( ) nascentes ( ) corregos ( ) poço artesiano ( ) represas ( ) Cocho

( ) Outro: \_\_\_\_\_

Distância da fazenda mais próxima: \_\_\_\_\_

Animais em quarentena: ( ) sim; ( ) não;

Equinos com quadro neurológico: ( ) sim; ( ) não;

Dificuldade de andar ( ) sim; ( ) não;

Aborto em fêmeas ( ) sim; ( ) não;

Fraqueza muscular ( ) sim; ( ) não;

Dificuldade de deglutição ( ) sim; ( ) não;

Atrofia muscular ( ) sim; ( ) não;

Outros: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE B – COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA/UFU)



Universidade Federal de Uberlândia  
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
 Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
 Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa  
 Mônica - Uberlândia-MG –  
 CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceua@propp.ufu.br;  
[www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

### ANÁLISE FINAL Nº 121/13 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 071/13

Projeto Pesquisa: “Soroprevalência de toxoplasma gondii, neospora spp e leishmania spp em equídeos da zona rural e urbana do município de uberlândia, minas gerais”.

Pesquisador Responsável: Francisco Cláudio Dantas Mota

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 24 de Junho de 2013

Prof. Dr. César Augusto Garcia  
 Coordenador da CEUA/UFU