

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**SANDRA REGINA FONSECA DE ARAÚJO VALENÇA**

**PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO DAS INFECÇÕES POR  
*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* E *Sarcocystis neurona*  
EM EQUINOS NO ESTADO DE ALAGOAS, BRASIL.**

**RECIFE  
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**SANDRA REGINA FONSECA DE ARAÚJO VALENÇA**

**PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO DAS INFECÇÕES POR  
*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* E *Sarcocystis neurona*  
EM EQUINOS NO ESTADO DE ALAGOAS, BRASIL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Área de Concentração: Epidemiologia e Diagnóstico das Enfermidades Infecto-contagiosas dos Animais Domésticos.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

**RECIFE  
2014**

**SANDRA REGINA FONSECA DE ARAÚJO VALENÇA**

**PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO DAS INFECÇÕES POR  
*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* E *Sarcocystis neurona*  
NO ESTADO DE ALAGOAS.**

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOCIÊNCIA ANIMAL COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO  
GRAU DE DOUTOR.

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:** EPIDEMIOLOGIA E DIAGNÓSTICO DAS ENFERMIDADES  
INFECTO-CONTAGIOSAS DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS

Aprovada em

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota** – Orientador  
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

**Profa. Dra. Flaviana Santos Wanderley**  
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas - UNCISAL

**Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Júnior**  
Unidade Acadêmica de Garanhuns – UAG – UFRPE

**Prof. Dr. Huber Rizzo**  
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

**Dr. Mauro José Gonçalves Bezerra**  
Superintendência do Desenvolvimento do Nordeste - SUDENE

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por sua presença constante em minha trajetória, guiando meus passos e me abençoando com seu amor e sabedoria.

À minha mãe Vilma Rosália Fonseca de Araújo pela minha vida. Agradeço pelo seu amor incondicional, pelo colo sempre disponível, pela dedicação total abdicando dos próprios projetos para viver junto comigo as minhas conquistas, pela confiança e pelo o que sou hoje. Muito obrigada.

Ao meu pai Elias Corrêa de Araújo (*in Memoriam*) pelo amor, pelos momentos de alegria e tristeza juntos, por sua dedicação ao trabalho que, apesar de custar sua ausência, nos permitiu crescer, estudar e nos tornar adultos capazes de escolher nosso próprio caminho.

Ao meu Marido, Pai, Médico Veterinário e Professor Rômulo Menna Barreto Valença, pelo amor, dedicação e apoio em todos os momentos de nossas vidas. Aos meus filhos João Pedro e José Luís por existirem, pelos maravilhosos momentos juntos e pela paciência quando não pude estar presente.

Às minhas irmãs e aos sobrinhos e sobrinhas queridos. A toda minha família, o meu “muito obrigada”.

Ao professor Rinaldo Aparecido Mota, pela oportunidade de conviver e aprender com seus ensinamentos na Ciência e na Vida. Apesar das inúmeras tarefas, preserva seus valores a respeito do ser humano e trata cada orientado como um verdadeiro filho. Obrigada por tudo.

Ao caríssimo “meu jovem” professor José Wilton Pinheiro Júnior, pela amizade, paciência e orientações durante toda convivência acadêmica.

Aos alunos do Centro Universitário CESMAC e agora colegas, médicos veterinários (Cledja Vitorino, Daniella Cortês e Joel Lima de Barros Júnior), e também aos alunos da UFRPE e agora também colegas (Orestes, Pedro Paulo e Érica Samiko) pelo apoio na realização da pesquisa.

À servidora Édna e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal (PRPPG) da UFRPE pelo apoio e atenção de sempre.

Ao colega de Pós-graduação e amigo Mauro José Gonçalves Bezerra pelas boas conversas e pela torcida.

A todos os professores do curso de Medicina Veterinária pelo carinho, atenção e orientação durante a graduação e agora como membro da academia.

## RESUMO

Objetivou-se pesquisar a prevalência e os fatores de risco associados às infecções causadas por *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis neurona* em equinos criados no Estado de Alagoas, Brasil. Foram utilizadas 440 amostras de equinos provenientes de 36 propriedades localizadas em 23 municípios distribuídos nas Mesorregiões Leste, Agreste e Sertão Alagoano. O estudo dos fatores de risco foi realizado por meio da aplicação de questionários investigativos, constituídos por perguntas objetivas referentes ao manejo produtivo, reprodutivo e sanitário dos rebanhos, posteriormente submetidos à análise estatística. O diagnóstico sorológico da infecção por *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis neurona* foi realizado pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). A prevalência de anticorpos anti- *Toxoplasma gondii* foi de 14,4% (I.C.=11,0 - 17,8%), sendo encontrados equinos positivos em 69,4% das propriedades estudadas. O fator de risco associado à infecção foi o consumo e armazenamento de feno ( $p = 0,008$ ; OR = 0,47; IC = 0,27 – 0,83). A prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* foi de 18% (I.C. 14,4 – 22,1%), sendo identificados equinos positivos em 72,2% das propriedades estudadas. Houve associação significativa entre a infecção e as mesorregiões estudadas, sendo o Agreste a região de maior risco (OR = 10,28) para a infecção entre os equinos. Os fatores de risco associados à infecção foram o acesso de outras espécies às fontes de água dos equinos ( $p = 0,017$ ; OR = 1,84; IC = 1,11 – 3,04), não utilizar feno para a alimentação dos animais ( $p = 0,000$ ; OR = 3,33; IC = 1,87 – 5,94), a compra de animais oriundos de comércio informal ( $p = 0,000$ ; OR = 8,43; IC = 3,06 – 23,16) e a ausência do manejo de quarentena ( $p = 0,000$ ; OR = 8,70; IC = 3,10 – 24,39). A prevalência de anticorpos anti-*Sarcocystis neurona* foi de 8,1% (I.C. 5,7–11,1%), sendo identificados equinos positivos em 52,7% das propriedades estudadas. O fator de risco associado à infecção foi o fato de não utilizar animais de outras propriedades no manejo reprodutivo do rebanho ( $p = 0,032$ ; OR = 2,38; IC = 1,07 – 5,28). Os resultados obtidos nesse estudo indicam que os equinos do Estado de Alagoas estão expostos ao risco de infecção por *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis neurona*. Medidas sanitárias de prevenção e controle destes agentes infecciosos devem ser incentivadas visando a adoção de um programa sanitário eficiente para os rebanhos equinos do Estado Alagoas, Brasil.

**Palavras-chave:** Toxoplasmose, Neosporose, Sarcocistose, cavalos, soroprevalência, fatores de risco.

## ABSTRACT

Aimed to find the prevalence and risk factors associated with infections caused by *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis neurona* in horses bred in the state of Alagoas, Brazil. It was evaluated 440 animals from 36 farms located in 23 municipalities distributed in the East, Wasteland and Hinterland of Alagoas. The risk factors analysis was performed by the application of research questionnaires consisting of objective questions relating to the production, reproductive and health management, subsequently submitted to statistical analysis. The serological diagnosis of infection by *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis neurona* were determined by indirect fluorescent antibody test (IFAT). The anti-*Toxoplasma gondii* antibodies prevalence was 14,4% (IC = 11,0 to 17,8%), being found positive horses in 69,4% of the farms studied. The factor associated of the infection was the consumption and storage of hay ( $p = 0,008$ ; OR = 0,47; IC = 0,27 – 0,83). The anti-*Neospora caninum* antibodies prevalence was 18% (I.C. 14,4 – 22,1%), being found positive horses in 72,2% of the farms studied. There was a significant association between infection and regions studied, with the Wasteland region of higher risk (OR = 10,28) for infection among horses. The risk factors associated with infection was the access of other species of animals to water sources of horses ( $p = 0,017$ ; OR = 1,84; IC = 1,11 - 3,04), not use hay for animal feed ( $p = 0,000$ ; OR = 3,33; IC = 1,87 – 5,94), buying animals from informal trade the place of purchase of new animals ( $p = 0,000$ ; OR = 8,43; IC = 3,06 – 23,16) and the absence of quarantine management ( $p = 0,000$ ; OR = 8,70; IC = 3,10 – 24,39). The anti-*Sarcocystis neurona* antibodies prevalence was 8,1% (I.C. 5,7 – 11,1%), being found positive horses in 52,7% of the farms studied. The risk factor associated with infection was the lack of squad closed herd for reproduction ( $p = 0,032$ ; OR = 2,38; IC = 1,07 – 5,28). The results of this study indicate that horses from in the State of Alagoas are at risk of infection by *Toxoplasma gondii*, *Neospora spp.* and *Sarcocystis neurona*. Health measures for prevention and control of these infectious agents should be encouraged in the pursuit of improved animal health and human.

**Keywords:** Toxoplasmosis, neosporosis, Sarcocystosis, horses, prevalence, risk factors.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	15
2.1 Infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em equinos	15
2.1.1 Histórico e ciclo biológico	15
2.1.2 Toxoplasmose equina	18
2.1.3 Diagnóstico da infecção por <i>T. gondii</i> em equinos	19
2.1.4 Soroprevalência e fatores de risco associados à infecção por <i>T. gondii</i> em equinos	21
2.1.5 Medidas de controle	23
2.2 Infecção por <i>Neospora</i> spp. em equinos	24
2.2.1 Histórico e ciclo biológico	24
2.2.2 Neosporose equina	27
2.2.3 Diagnóstico da infecção por <i>Neospora</i> spp. em equinos	30
2.2.4 Soroprevalência e fatores de risco associados à infecção por <i>Neospora</i> spp. em equinos	31
2.2.5 Medidas de controle	32
2.3 Infecção por <i>Sarcocystis neurona</i> em equinos	33
2.3.1 Histórico e ciclo biológico	33
2.3.2 Sarcocistose equina / Mieloencefalite Protozoária Equina	35
2.3.3 Diagnóstico da infecção por <i>Sarcocystis neurona</i> em equinos	37
2.3.4 Soroprevalência e fatores de risco associados à infecção por <i>Sarcocystis neurona</i> em equinos	38
2.3.5 Medidas de controle	40
<b>3. OBJETIVOS</b>	43
3.1 Geral	43
3.2 Específicos	43

<b>4. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>44</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	
Prevalência da infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em equinos no Estado de Alagoas, Nordeste do Brasil.....	60
<b>CAPÍTULO 2</b>	
Prevalência da infecção por <i>Neospora</i> spp. em equinos no Estado de Alagoas, Nordeste do Brasil.....	73
<b>CAPÍTULO 3</b>	
Prevalência da infecção por <i>Sarcocystis neurona</i> em equinos no Estado de Alagoas, Nordeste do Brasil.....	85
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>98</b>

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão Bibliográfica

<b>Figura 1</b> – Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	16
<b>Figura 2</b> - Ciclo biológico de <i>Neospora caninum</i> .....	25
<b>Figura 3</b> - Ciclo biológico de <i>Sarcocystis neurona</i> .....	35

### Capítulo 1

<b>Figura 1</b> - Distribuição dos 23 municípios estudados dentro das três Mesorregiões do Estado de Alagoas, Nordeste do Brasil.....	64
---	----

### Capítulo 2

<b>Figura 1</b> - Distribuição dos 23 municípios estudados dentro das três Mesorregiões do Estado de Alagoas, Nordeste do Brasil.....	77
---	----

### Capítulo 3

<b>Figura 1</b> - Distribuição dos 23 municípios estudados dentro das três Mesorregiões do Estado de Alagoas, Nordeste do Brasil.....	89
---	----

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

<b>Tabela 1 –</b>	Prevalência de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> em equinos no estado de Alagoas, Brasil.....	65
<b>Tabela 2 –</b>	Fatores de manejo geral dos equinos pesquisados na análise univariada para a associação com a infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> .....	66
<b>Tabela 3 –</b>	Fatores do manejo reprodutivo dos equinos pesquisados na análise univariada.....	67
<b>Tabela 4 –</b>	Análise de regressão logística para a variável associada à infecção por <i>T. gondii</i> em equinos no Estado de Alagoas, Brasil.....	67

### Capítulo 2

<b>Tabela 1</b>	Análise multivariada da prevalência para a infecção por <i>N. caninum</i> em equinos por Mesorregião, Estado de Alagoas, Nordeste, Brasil.....	79
<b>Tabela 2</b>	Fatores do manejo geral dos equinos pesquisados na análise univariada.....	79
<b>Tabela 3 -</b>	Análise de regressão logística para as variáveis associadas à infecção por <i>N. caninum</i> em equinos no Estado de Alagoas, Brasil.....	80

### Capítulo 3

<b>Tabela 1 –</b>	Análise multivariada da prevalência para a infecção por <i>Sarcocystis neurona</i> em equinos por Mesorregião, Estado de Alagoas, Nordeste, Brasil.....	91
<b>Tabela 2 –</b>	Fatores do manejo geral dos equinos pesquisados na análise univariada para a associação com a infecção por <i>Sarcocystis neurona</i> .....	91

<b>Tabela 3 –</b> Análise de regressão logística dos fatores de risco associados à infecção por <i>Sarcocystis neurona</i> em equinos no Estado de Alagoas.....	92
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

FAO	Food and Agriculture Organization
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MRLS	Mare Reproductive Loss Syndrome
PSI	Puro Sangue Inglês
EHV-1	Hesper Vírus Equino tipo 1
PCR	Reação de Cadeia da Polimerase
MAT	Teste de Aglutinação Modificado
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (Do inglês: Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
SFDT	Sabin-Feldman Dye Test
HAI	Hemaglutinação Indireta
MAD	Aglutinação direta modificada
LAT	Teste de Aglutinação em Látex
WB	Western blotting
DNA	Ácido desoxirribonucleico
µL	Microlitro
<	Menor
P	Significância estatística
I.C.	Intervalo de confiança
IgG	Imunoglobulina da classe G
MPE	Mieloencefalite Protozoária Equina
CSF	Líquido cefalorraquidiano
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
SNC	Sistema Nervoso Central
DMSO	Dimetilsufóxido
FDAH	Fort Dodge Animal Health
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FR	Frequência Relativa

## INTRODUÇÃO

Atualmente a população mundial de equinos está estimada em 58.931.508 e 57% desse contingente está concentrado nas Américas com 33.612.918 de cabeças (FAO, 2011). O Brasil aparece na quarta colocação em número de animais, com uma população estimada de 5.510.601, se mantendo estável na última década (IBGE, 2011).

Em vários países, inclusive no Brasil, os investimentos em pesquisas com equinos apresentam enfoque em medicina esportiva, comportamento e bem estar, neonatologia, reprodução, sanidade, técnicas de diagnóstico e doenças dos equinos (ALMEIDA e SILVA, 2010).

A presença de enfermidades nos rebanhos equinos trazem muitos prejuízos aos criadores, principalmente os problemas reprodutivos, visto que, todo trabalho anual de uma criação culmina com o nascimento dos potros. A frequência de aborto nessa espécie pode variar de 8% a 19% (ACLAND, 1993; LAUGIER et al., 2011). Prejuízos econômicos causados por desordens reprodutivas em éguas foram estimados em US\$ 500 milhões em apenas dois anos nos Estados Unidos (SEBASTIAN et al., 2008). No Brasil, uma pesquisa realizada com equinos da raça Puro Sangue Inglês (PSI) no Estado do Paraná, identificou que 9,2% das perdas nas criações foram ocasionadas por aborto (MOREIRA et al., 1998).

No contexto das doenças neurológicas em equinos, a Encefalomielite Protozoária Equina (EPM) encontra-se em posição de destaque, visto que a doença causa um impacto econômico à indústria do cavalo resultante do tratamento e prevenção (COHEN et al., 2007), além da morbidade significativa representada pela alta prevalência de animais soropositivos relatada em estudos desenvolvidos no Brasil e no mundo (STELMANN e AMORIM, 2010), que mesmo assim, apresenta poucos dados sobre os agentes envolvidos, as formas de infecção e a epidemiologia da doença.

Infecções por protozoários da família Sarcocystidae são citadas na literatura como causa de abortamento e mortalidade neonatal em éguas, com destaque para *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* (VILLALOBOS et al.,

2005; CAMOSSÍ et al., 2010). *Sarcocystis neurona* e *Neospora hughesi*, também pertencentes a essa família, têm sido relatados como causa de doenças neurológicas nos equinos, sendo considerados os potenciais agentes etiológicos da Encefalomielite Protozoária Equina (EPM) (MARSH et al., 1998; HOANE et al., 2006). De acordo com Locatelli-Dittrich et al. (2006a), a prevalência de infecção por protozoários não é adequadamente investigada nos sistemas de criação do país, tendo como possível explicação a não inclusão dos mesmos no diagnóstico das causas de aborto.

Os estudos de soroprevalência em equinos têm revelado variações de 0% a 90% para *T. gondii* (TASSI, 2007), de 2,5 a 47% para *Neospora* spp. (DUBEY et al., 1999a; HOANE et al., 2006; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006; VILLALOBOS et al., 2006) e de 32 a 89% para *Sarcocystis neurona* (TILLOTSON et al., 1999; BENTZ et al., 2003). Os fatores de risco para a infecção por *T. gondii* e *Neospora* spp. estão relacionados às condições climáticas, localização das propriedades, tipo e condições de armazenamento de água e alimentos (ALVES et al., 1997; OLIVEIRA FILHO et al., 2012). Trabalhos sobre fatores de risco para *Sarcocystis neurona* ainda não foram relatados na América do Sul, ficando a sugestão desses fatores relacionados às condições ambientais e de manejo relatadas nos Estados Unidos onde o parasita é amplamente estudado (SAVILLE et al., 2000, COHEN et al., 2007).

No Brasil, as pesquisas revelam que os rebanhos equinos estão expostos aos três protozoários e que os cavalos provavelmente apresentam papel importante na epidemiologia das doenças causadas por esses parasitas. Porém, os estudos ainda são escassos, sendo difícil a comparação de resultados e a determinação de testes diagnósticos padrão-ouro para a espécie e a adoção de medidas de controle eficazes. No Estado de Alagoas não existem estudos enfocando essa temática. Desta forma, é importante a investigação da exposição dos animais a esses agentes, o esclarecimento dos seus efeitos e os fatores de risco associados à infecção.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Infecção por *Toxoplasma gondii* em equinos

A toxoplasmose é uma antroponose parasitária comum nos animais e no homem, causada pelo protozoário coccídeo *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa: Sarcocystidae), parasita intracelular obrigatório de ampla distribuição mundial (TURNER E SAVVA, 1991).

#### 2.1.1 Histórico e ciclo biológico

*Toxoplasma gondii* foi relatado pela primeira vez por Nicolle e Manceaux (1908) em tecidos de um roedor (*Ctenodactylus gundi*) o qual estava sendo usado para pesquisa de Leishmaniose na África do Sul (AJIOKA e SOLDATI, 2007). No mesmo período, no Brasil, Splendore (1908) isolou o agente de um coelho de laboratório no Departamento de Bacteriologia do Hospital da Sociedade de Beneficência Portuguesa em São Paulo. Apenas em 1970, a forma de transmissão foi definida, quando seu ciclo biológico completo foi descoberto (DUBEY, 1998; SINGH, 2003). Esta descoberta foi um grande avanço para a ciência médica humana e veterinária e levou ao reconhecimento de novos parasitas tão importantes economicamente quanto *T. gondii* (*Neospora* spp. e *Sarcocystis* spp.) (DUBEY et al., 2010).

*T. gondii* apresenta um ciclo biológico complexo com dois hospedeiros. Os definitivos ou completos são os membros da família *Felidae*, incluindo o gato doméstico, representante maior na transmissão deste protozoário. Os animais de sangue quente são os hospedeiros intermediários ou incompletos (DUBEY et al., 1995). Historicamente, *T. gondii* foi considerado como um parasita de gatos com um ciclo fecal-oral, porém com a domesticação, a transmissão foi adaptada, incluindo também a transmissão por carnivorismo e a transplacentária (DUBEY e SU, 2009).

Este coccídeo apresenta-se sob três formas evolutivas infectantes: os taquizoítos, os bradizoítos contidos em cistos teciduais e os esporozoítos em oocistos esporulados (DUBEY, 1998). Seu ciclo de vida é heteroxeno facultativo. Somente nos felídeos, ocorre a reprodução sexuada (gametogonia), observada nas células epiteliais do intestino delgado, durante o ciclo enteroepitelial. A

reprodução assexuada ocorre durante o ciclo extra-intestinal e é observada nos dois tipos de hospedeiros (MARTINS e VIANA, 1998) (Fig. 1).

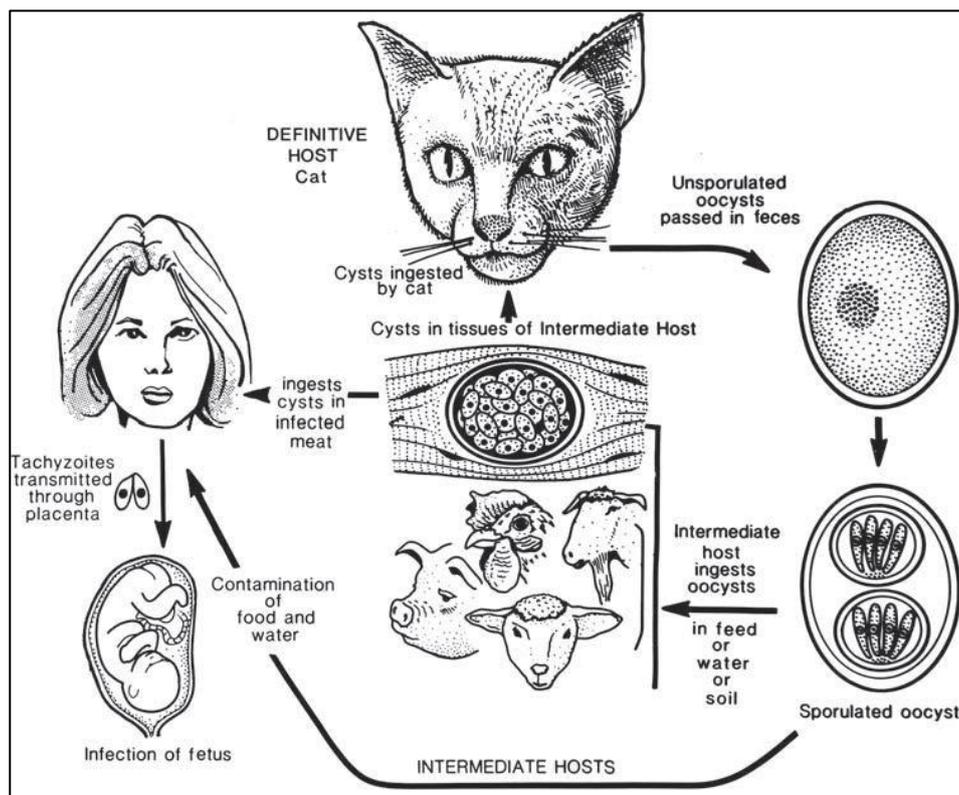


Figura 1 – Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*. (DUBEY, 2010)

A fase extra-intestinal inicia-se quando um hospedeiro intermediário ingere um oocisto esporulado (Fig. 1). No trato digestivo, os esporozoítos são liberados e seguem para os linfonodos e diferentes órgãos onde se multiplicam por sucessivas endodiogenias, dando origem aos taquizoítos (gr.tachys=rápido). Quando as células parasitadas estão repletas, ocorre a sua ruptura e os taquizoítos são levados pela circulação sanguínea e linfática. Sua presença representa a fase aguda da infecção e demonstra elevada importância epidemiológica, pois é a forma transmitida verticalmente. Os parasitas penetram nas células dos vários tecidos, especialmente no sistema nervoso central, músculo esquelético e músculo cardíaco podendo ser encontrados também em vísceras como pulmões, fígado e rins (DUBEY, 1998).

Nos tecidos são formados os cistos contendo os bradizoítos (gr.brady = lento), caracterizando a fase crônica ou assintomática da enfermidade e, mesmo após a morte do hospedeiro, os cistos mantêm-se como formas infectantes, possibilitando a transmissão do agente (SHERDING, 1998). Dentro dos cistos, os

bradizoítos tornam-se imunologicamente inertes e não são eliminados pelo sistema imunológico do hospedeiro, sendo uma forma de proteção do agente. Os cistos teciduais representam o estágio final do ciclo biológico no hospedeiro intermediário (TENTER et al., 2000).

A fase enteroepitelial tem início quando um felídeo ingere um hospedeiro intermediário infectado com cistos contendo bradizoítos (Fig.1). Estes bradizoítos são liberados pela ação dos sucos digestivos e penetram nas células epiteliais do intestino delgado ou do cólon do felídeo. No interior destas células, os parasitas crescem e transformam-se em esquizontes, se multiplicam de forma assexuada e originam os merozoítos que invadem outras células epiteliais. O processo sexuado inicia-se após alguns dias da infecção e caracteriza-se pela presença de macro e microgametócitos que saem da luz do intestino atraídos pelos macrogametas. A fecundação ocorre nas células da parede intestinal e resulta na formação de um ovo ou zigoto que dá origem ao oocisto. Os oocistos começam a ser eliminados nas fezes dos felídeos cinco a dez dias após a ingestão dos cistos teciduais e a eliminação permanece por 1 a 2 semanas. O ciclo biológico completo de *T.gondii* se fecha quando o hospedeiro intermediário ingere um oocisto esporulado (FRENKEL, 2004).

Os gatos podem eliminar oocistos após a ingestão das três formas infectantes do parasita (FRENKEL et al., 1970; DUBEY E FRENKEL, 1972, 1976; FREYRE et al., 1989; DUBEY et al., 1996, 2002), no entanto, apenas 50% dos felinos permitem a conversão de taquizoítos e oocistos em novos oocistos, mas quase todos o fazem a partir da ingestão de cistos teciduais (DUBEY e FRENKEL, 1976). O oocisto é eliminado nas fezes, obrigatoriamente na forma não esporulada e após liberado no ambiente, em contato com o ar, necessita de no mínimo 24 horas para esporular, o que ocorre, em média, dentro de 3 a 5 dias e, só então, se torna infectante (FREYRE, 1993). Esta eliminação de oocistos pelos felinos pode durar de 7 a 23 dias em uma infecção primária (DUMÈTRE e DARDÉ, 2003).

Com relação à resistência dos oocistos às condições do ambiente, Yilmar e Hopkins (1972), no Texas, relataram um período de 46 dias de sobrevivência de oocistos em fezes de gato descobertas ao ar livre (6-36°C), e de 334 dias em fezes cobertas. Ambientes secos, sob baixa umidade e altas temperaturas foram deletérios aos oocistos (DUBEY et al., 2006).

Oocistos não esporulados são mais sensíveis a altas temperaturas que os oocistos esporulados (LINDSAY et al., 2002; LINDSAY et al., 2003). Segundo Dubey et al. (1970), oocistos não esporulados expostos à temperatura de 37°C por 24 horas foram mortos enquanto os oocistos esporulados resistiram. Oocistos de *T. gondii* são altamente resistentes aos desinfetantes, mas são mortos em temperaturas superiores a 60°C. Os raios ultravioletas também tem um efeito deletério sobre os oocistos, dependendo da dose, mas até agora não existe nenhuma forma prática de destruir oocistos em grandes reservatórios de água (DUBEY, 2010).

### 2.1.2 Toxoplasmose equina

Dentre as espécies domésticas, os equinos estão entre os animais mais resistentes à infecção por *T. gondii* (TURNER e SAVVA, 1991), no entanto, nesta espécie, o parasito está associado com quadros de encefalomielite (BOUGHATTAS et al., 2011) podendo ser observados sinais como febre, ataxia, degeneração da retina, danos ao feto e aborto (SILVEIRA, 2001). Geralmente, nos equinos, a doença é inaparente, sendo caracterizada pela manutenção de títulos de anticorpos e presença de cistos teciduais (LANGONI et al., 2007). Os cavalos infectados podem veicular cistos de *T. gondii*, representando riscos à saúde pública em regiões onde é habitual a ingestão da carne de equinos, além de representar uma fonte de infecção para os hospedeiros definitivos (DUBEY et al., 1985).

O agente tem sido relatado como causa de abortamento em várias espécies animais, inclusive nos equinos (TENTER et al., 2000). No entanto, de acordo com Locatelli-Dittrich et al. (2006b), a prevalência dos protozoários, inclusive *T. gondii* não é adequadamente investigada em equinos no Brasil. Nos casos de abortamentos, os fetos ou neonatos deveriam ser encaminhados ao laboratório, para diagnóstico por isolamento, exame histopatológico e por Reação de Cadeia de Polimerase (PCR), porém os custos elevados e a carência de laboratórios que realizem o diagnóstico definitivo são fatores limitantes, principalmente no caso de equinos (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006b).

Apesar da baixa prevalência de *T. gondii* em equinos quando comparado com outros animais domésticos (MILLAR et al., 2008), trabalhos vem sendo

realizados apoiando-se no fato de que o estudo da toxoplasmose animal, notadamente entre animais domésticos, baseia-se fundamentalmente na condição desses animais representarem importantes fontes de infecção do protozoário ao homem e pelo fato da doença acarretar perdas econômicas aos rebanhos, avaliadas em termos de abortamento e nascimento de fetos inviáveis (NAVES, 2005).

Os equinos são animais herbívoros e a infecção nesta espécie se dá provavelmente pela ingestão de oocistos presentes em alimentos como o feno e cama contaminados (SILVA e LANGONI, 2000). A possibilidade de transmissão transplacentária de *T. gondii* em equinos alimentados com oocistos foi avaliada experimentalmente por Marques et al. (1995), mas os resultados não confirmaram essa hipótese.

### **2.1.3 Diagnóstico da infecção por *T. gondii* em equinos**

Com relação ao diagnóstico da toxoplasmose, Dubey (2010) ressalta que devido à inespecificidade dos sinais clínicos da doença, o diagnóstico definitivo deve ser obtido laboratorialmente com a utilização de testes biológicos, sorológicos ou métodos histológicos, ou uma combinação destes.

Em equinos o diagnóstico da infecção por *T. gondii* baseia-se principalmente no emprego de métodos sorológicos para detectar os anticorpos (AKCA et al., 2004; ALANAZI e ALYOUSIF, 2011). Em inquéritos epidemiológicos realizados em outras partes do mundo, o Teste de Aglutinação Modificado (MAT) é o método de diagnóstico mais utilizado (DUBEY et al., 1999a, 1999b, SHAAPAN et al., 2012), no Brasil, a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) tem sido mais frequentemente utilizada pela maioria dos pesquisadores (LARANJEIRA et al., 1985; GAZÊTA et al., 1997, VIDOTTO et al., 1997, GARCIA et al., 1999, NAVES et al., 2005, LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006a, COIRO et al., 2012).

Um estudo realizado em São Paulo em 1975 comprovou a eficiência da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta no diagnóstico da toxoplasmose, o que determinou a recomendação do seu uso em pesquisas sorológicas epidemiológicas (ISHIZUKA et al., 1975). Langoni et al. (2007) utilizaram amostras de soro equino de diferentes origens, idades e sexo, armazenadas no Laboratório do Serviço de Diagnóstico de Zoonoses da Faculdade de Medicina

Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo, para comparar a sensibilidade do MAT e RIFI, com ponto de corte 64. Segundo a análise estatística, houve concordância entre os testes utilizados.

De acordo com Shaapan et al. (2012), a sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos em equinos são pouco conhecidas, mas sabe-se que a utilização do ponto de corte 64 na RIFI diminui o número de reações falso-positivas que podem ocorrer nas baixas diluições.

Outros testes sorológicos foram utilizados em estudos de soroprevalência em equídeos pelo mundo. O Enzyme-linked Immunosorbent (ELISA) foi adotado por Van Knapen et al. (1982) que observaram 7% de soroprevalência em cavalos na Holanda e também foi usado por El-Ghaysh (1998), que identificou 66% de soropositividade em muare no Egito. O Sabin-Feldman Dye Test (SFDT) foi escolhido por Tizard et al. (1978) para o estudo da soroprevalência em cavalos em Ontário, Canadá, os quais encontraram uma taxa de 9%, e Hejlícek e Litera'k (1994) identificaram 8% de soropositivos dentro de um grupo 2886 cavalos da República Checa usando a mesma técnica. Ainda, Akca et al. (2004) relataram 21% de cavalos com anticorpos contra *T. gondii* na Turquia e, Alanazi e Alyousif (2011) observaram 32% de soroprevalência em cavalos na Província de Riyadh, Arábia Saudita, utilizando Sabin-Feldman Dye Test (SFDT).

Devido à alta sensibilidade das técnicas sorológicas, podendo mascarar o diagnóstico pela presença de IgM residuais no soro, as técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) podem auxiliar na interpretação da condição real de interação parasito/hospedeiro. Porém, são escassos os estudos que utilizam essa técnica no diagnóstico de toxoplasmose em equinos (KOMPALIC-CRISTO et al., 2005).

No Reino Unido, Turner e Savva (1990) detectaram DNA de *Toxoplasma gondii*, em placenta de uma égua que pariu um potro saudável, utilizando a PCR. Em anos seguintes, os mesmos pesquisadores encontraram DNA do protozoário nos olhos de um equino de 17 anos de idade com distúrbios oculares (TURNER e SAVVA, 1991) e nos olhos de um dos dois potros gêmeos abortados de uma égua no quinto mês de gestação, utilizando o mesmo método (TURNER e SAVVA, 1992).

Shaapan et al. (2012) realizaram exames de 240 amostras de soro de cavalos de esporte no Cairo, Egito, utilizando Reação em Cadeia de Polimerase

(PCR), Teste de Aglutinação em Látex (LAT), ELISA e MAT, que revelaram 53,8%, 52,1%, 50,8% e 39,2% de animais positivos, respectivamente.

Os isolamentos também podem ser utilizados para o diagnóstico em técnicas de bioensaio a partir de amostras de sangue, fluido cerebrospinal ou tecidos de animais suspeitos de infecção por *T. gondii* (DUBEY, 2010). O isolamento é obtido pela inoculação das amostras suspeitas em camundongos, sendo necessário de três a seis semanas para a confirmação do diagnóstico (HITT e FILICE, 1992; KUPFERSCHMIDT et al., 2001).

De acordo com Tassi (2007), poucas tentativas foram feitas para isolar *T. gondii* a partir de cavalos naturalmente infectados. Maitani (1970), no Japão, tentou isolar o organismo a partir de 38 cavalos soronegativos no SFDT, e Fihla et al. (1986), no Brasil, tentaram isolar a partir de 63 animais, sendo apenas quatro positivos na Hemaglutinação Indireta (HAI), mas nenhum deles tiveram sucesso. Zardi et al. (1964) relataram o isolamento bem sucedido de *T. gondii* da retina de um cavalo na Itália, mas suas conclusões não são bem documentadas. Algumas tentativas bem-sucedidas de isolamento de *T. gondii* em cavalos foram realizadas por AlKalidy e Dubey (1979), que isolaram o agente em camundongos a partir de tecidos de cavalos soropositivos no SFDT e em gatos alimentados com tecidos de cavalos abatidos para consumo humano, alguns soronegativos, nos Estados Unidos.

#### **2.1.4 Soroprevalência e fatores de risco para a infecção por *T. gondii* em rebanhos equinos**

Exames sorológicos para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em equídeos foram realizados em vários países do mundo e as pesquisas têm revelado soroprevalências em cavalos variando de 4% a 91% (ZARDI et al., 1968; EUGSTER e JOYCE, 1976; BEYER e SHEVHUNOVA, 1986; UGGLA et al., 1990; AKCA et al., 2004).

Trabalhos mais recentes têm demonstrado valores semelhantes e também abaixo das frequências descritas anteriormente. García-Bocanegra et al. (2012) realizaram estudo transversal em 420 rebanhos de equídeos no sul da Espanha e encontraram soroprevalências de 14,7% em equinos, 23,9% em asininos e 34,0% em muare. Neste estudo, os autores identificaram uma soroprevalência

estatisticamente maior ( $p=0,01$ ) em propriedades onde eram criados também ruminantes domésticos. Em outro estudo, os pesquisadores observaram uma prevalência global de 1,8% em 753 cavalos, 13 asininos e sete pôneis provenientes de quatro regiões da Grécia e identificaram o tipo de atividade (agricultura) ( $p<0,05$ ) e a região estudada (Peloponeso, Sul da Grécia) ( $p<0,01$ ) como fatores de risco importantes para a infecção por *T. gondii* nos animais (KOUAM et al., 2010).

Nas Américas, anticorpos para *T. gondii* em equinos têm sido relatados também com frequências variadas. Alvarado-Esquivel et al. (2012) encontraram uma soroprevalência de 6,1% em cavalos provenientes de três municípios da região do Vale, Estado de Durango, no México. Maiores prevalências foram encontradas em rebanhos de área rural, com mais de 30 animais e que eram alimentados em baias. Já no estudo realizado por Dangoudoubiyam et al. (2011), uma soroprevalência de 34,0% foi relatada em equinos na Costa Rica, América Central.

No Brasil, as pesquisas com equinos revelam prevalências variando de 1,5% a 32,8% (LARANJEIRA et al., 1985; GAZÊTA et al., 1997; VIDOTTO et al., 1997; GARCIA et al., 1999; MENDONÇA et al., 2001, NAVES et al. 2005; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006a; LANGONI et al., 2007). Camossi et al. (2010) pesquisaram amostras de soro de equinos, obtidas a partir de banco de soros da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia em Botucatu, São Paulo e encontraram prevalências de 12,6% na técnica de aglutinação direta modificada (MAD) e de 5,9% na reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Os autores também observaram não haver diferença significativa entre a soropositividade dos animais e as características de idade, raça ou sexo.

Recentemente, Oliveira Filho et al. (2012) estudaram a situação epidemiológica da infecção por *Toxoplasma gondii* em equídeos na Paraíba, região Nordeste do Brasil, e encontraram prevalências de 8,3% (I.C. 4,9-13,0) para os equinos, 2,2% (I.C. 0,1-11,5) para os muares e 28,6% (I.C. 3,7-71,0) para os asininos. Nesse estudo, o número de focos encontrado foi de 46,1% e a fonte de água foi um fator de risco importante para a infecção por *T. gondii* nos plantéis. A transmissão do agente através da água vem sendo destacada desde a ocorrência de um grande surto humano relacionado à contaminação da água por

fezes de felinos selvagens no Canadá e à infecção de mamíferos marinhos nos EUA (DUBEY, 2004).

Ainda, em pesquisa recente na região Nordeste, Oliveira et al. (2013) investigaram amostras de soro de asininos e muares procedentes dos Estados de Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba e Sergipe e identificaram prevalências de 23,8% e 43,2%, respectivamente, para mulas e burros. Os rebanhos do Estado de Pernambuco apresentaram a maior soroprevalência, com diferenças estatisticamente significativas entre espécies ( $p=0,001$ ) e os estados avaliados ( $p=0,048$ ).

Os estudos epidemiológicos sobre a infecção por *T. gondii* nas várias espécies animais (MARQUES et al., 2009; GARCÍA-BOCANEGRA et al., 2010; GARCIA et al., 2012) destacaram a presença de felinos como fator de risco importante na epidemiologia da doença nos rebanhos; no entanto, em alguns trabalhos com cavalos (GARCÍA-BOCANEGRA et al., 2012; OLIVEIRA FILHO et al., 2012) essa variável não demonstrou associação significativa com a infecção. Os pesquisadores chamam atenção para a dificuldade em avaliar a real presença de gatos em instalações onde os equídeos são mantidos. Observação também feita por Thomaz-Soccol et al. (2009) e Kamani et al. (2010), considerando a variação na dinâmica de hospedeiros definitivos conforme a localização das propriedades.

### **2.1.5 Medidas de controle**

O controle e a prevenção da infecção por *T. gondii* baseiam-se principalmente no manejo dos felinos existentes nas propriedades. Segundo Dubey (2010), uma alimentação a base de carne crua, vísceras e ossos favorecem a infecção nos gatos e deve ser evitada, assim como o hábito de caçar desses hospedeiros. Animais mortos, bem como restos placentários e produtos de aborto devem ser rapidamente removidos do ambiente para evitar que os felinos consumam esse material e se infectem. A população de gatos dentro das fazendas deve ser controlada através de medidas contraceptivas como castração e os alimentos fornecidos aos animais pecuários devem ser protegidos do acesso de gatos para evitar contaminação por oocistos (DUBEY, 2010).

Nas pesquisas não são relacionadas medidas de controle específicas para as criações de equinos, o que na prática limita-se apenas ao controle de felinos domésticos nos locais de armazenamento de alimentos. Oliveira Filho et al. (2012) ressaltaram que evitar acesso de gatos a fontes de água também podem diminuir os riscos de infecção nas propriedades.

Pesquisadores testaram vacinas contra a toxoplasmose em felinos, contendo bradizoítos de amostra modificada de *T. gondii* (T263) e observaram redução de até 100% de eliminação de oocistos nas fezes dos gatos utilizados nas pesquisas (FRENKEL et al., 1991; FREYRE et al., 1993). Todavia, Mateus-Pinilla (2002), estudando a eficiência da vacinação de felinos na redução da prevalência em suínos, descreve como mais relevante o controle dos gatos nas propriedades do que qualquer outra medida profilática contra esse agente.

## **2.2 Infecção por *Neospora* spp. em equinos**

*Neospora* spp. é um protozoário coccídeo (Apicomplexa: Sarcocystidae), parasita intracelular obrigatório (ANDERSON et al., 2000), estreitamente relacionado com *Toxoplasma gondii* e *Sarcocystis* spp. É um parasita globalmente distribuído capaz de infectar uma ampla variedade de hospedeiros (DUBEY, 2003).

O gênero apresenta duas espécies, *N. caninum*, relatado em cães (hospedeiro definitivo) e em várias espécies de animais e *N. hughesi*, para o qual ainda não se conhece o hospedeiro definitivo e muitas dúvidas existem sobre seus hospedeiros intermediários (HOANE et al., 2006). Testes preliminares realizados na tentativa de demonstrar oocistos de *N. hughesi* nas fezes de cães alimentados com tecidos de camundongos infectados falharam (WALSH et al., 2000).

### **2.2.1 Histórico e ciclo biológico**

Em 1984, uma doença neurológica foi diagnosticada em cães na Noruega (BJERKÅS et al., 1984) que inicialmente pareceu ser causada por um parasito estruturalmente semelhante ao *Toxoplasma gondii*, mas antigenicamente diferente. Em 1988, o parasito associado à síndrome neurológica canina foi

caracterizado e recebeu o nome de *Neospora caninum* (DUBEY et al., 1988a). Mais tarde o parasito foi isolado em culturas de células e os cistos teciduais foram observados em ratos inoculados com tecidos de cães naturalmente infectados (DUBEY et al., 1988b).

Em 1989, o desenvolvimento de um teste de imuno-histoquímica permitiu a identificação específica de *N. caninum* em tecidos fixados em formalina e tornou possível o diagnóstico das infecções por esse parasito em vários animais (LINDSAY e DUBEY, 1989). No início de 1990, *N. caninum* mostrou ser uma das principais causas de aborto bovino em todo o mundo (DUBEY e LINDSAY, 1996) e em 1998, o cão foi reconhecido como o hospedeiro definitivo do parasito (MCALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999).

*Neospora* sp. foi isolado pela primeira vez a partir de tecidos de um cavalo por Marsh et al. (1996), mas o parasito apresentava diferenças estruturais e moleculares com *N. caninum* que levaram a suspeita da descoberta de uma nova espécie de *Neospora*. Foi em 1998, Marsh e colaboradores isolaram a nova espécie de *Neospora* em tecidos de um cavalo com doença neurológica, na Califórnia, Estados Unidos e a nomearam *Neospora hughesi* (MARSH et al., 1998).

A exemplo da semelhança descrita anteriormente entre *Toxoplasma gondii* e o gênero *Neospora*, a espécie *N. caninum* apresenta um ciclo de vida caracterizado por três fases infecciosas conhecidas como taquizoítos (de rápida proliferação), cistos teciduais contendo bradizoítos (de multiplicação lenta) e os oocistos eliminados nas fezes de alguns canídeos e esporulados no ambiente (DUBEY et al., 2002b) (Fig.2).

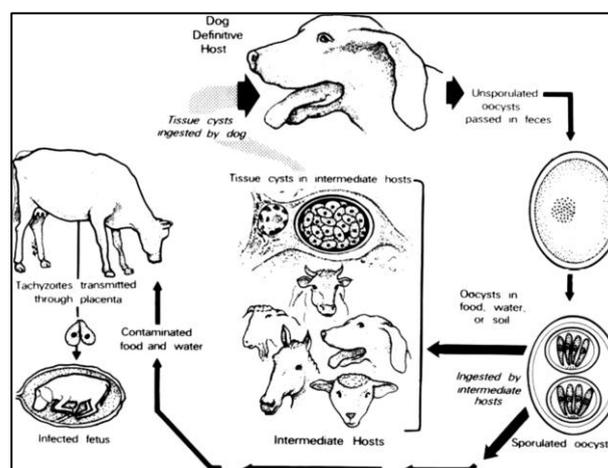


Figura 2 - Ciclo de vida de *Neospora caninum*. (DUBEY, 1999)

Após a ingestão de oocistos pelos hospedeiros, inicia-se o ciclo extra-intestinal do parasita. Corresponde à fase assexuada, caracterizada por sucessivas multiplicações que dão origem aos taquizoítos, os quais se distribuem pelo organismo do animal. Em seguida são formados os cistos nos tecidos como uma forma de proteção do agente à ação do sistema imunológico do hospedeiro. Dentro dos cistos são encontrados os bradizoítos e essas duas formas ocorrem intracelularmente (DUBEY et al., 2002b).

Os taquizoítos podem invadir e infectar diversos tipos de células do hospedeiro, incluindo as neurais, vasculares, musculares, endoteliais, macrófagos, fibroblastos e as células do fígado (BARR, 1993; DUBEY et al., 2002b). A rápida multiplicação dos taquizoítos é limitada *in vivo* em cerca de 20 divisões (em aproximadamente três semanas) antes que se diferenciam em bradizoítos para dar origem aos cistos teciduais. Os bradizoítos multiplicam-se lentamente de forma assexuada por endodiogenia. Os cistos são normalmente encontrados em tecido neural (cérebro e medula espinhal) ou músculo-esquelético. Nas células musculares pode persistir durante toda a vida do hospedeiro intermediário sem causar manifestações clínicas significativas (DUBEY e LINDSAY, 1996).

O ciclo de vida de *N. caninum* se completa quando os cistos teciduais são ingeridos por canídeos como o cão (*Canis lupus familiaris*) (MCALLISTER et al., 1998) coiote (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004), dingo (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e lobo cinza (*Canis lupus*) (DUBEY et al., 2011). Nesses hospedeiros, ocorre o ciclo intra-epitelial e a reprodução sexual do parasito. Os cistos podem sobreviver à passagem no estômago e seguem até o intestino delgado onde liberam os bradizoítos que infectam as células epiteliais. As fases esquizogônicas e gametogênicas ainda não foram identificadas para *N. caninum*, mas presume-se que elas existam por preceder a formação de oocistos nos intestinos de cães. Oocistos contendo esporozoítos são eventualmente formados e o ciclo de vida começa novamente (DUBEY et al., 2004).

Os oocistos são eliminados nas fezes dos hospedeiros definitivos e no ambiente esporulam em apenas 24 horas (LINDSAY et al., 1999). É considerada a fase ambientalmente resistente do parasito (McALLISTER et al., 1998). Não se sabe ao certo o tempo de sobrevivência dos oocistos no ambiente, mas devido a sua estreita relação com *Toxoplasma gondii* presume-se que sua resistência se

assemelhe a dos oocistos dessa outra espécie (DUBEY, 2004), variando de dias a anos conforme as condições de temperatura e umidade do ambiente (DUBEY, 2010).

Todos os três estágios infecciosos de *N. caninum* estão envolvidos na transmissão do parasita (Figura 2). Assim como ocorre no ciclo de *T. gondii*, acredita-se que os carnívoros se infectam com *N. caninum* por carnivorismo, pela ingestão de tecidos contendo bradizoítos e os herbívoros se infectam quando ingerem alimentos ou água contaminados com oocistos esporulados. A transmissão vertical pela rota transplacentária também foi descrita (DUBEY et al., 2007) sendo considerada a principal via de transmissão de *N. caninum* em bovinos (HIETALA e THURMOND, 1999). Em cavalos, apesar dessa via de transmissão ter sido sugerida (DUBEY e PORTERFIELD, 1990; TOSCAN et al., 2010), só foi comprovada recentemente pela infecção por *N. hughesi* (PUSTERLA et al., 2011).

Pesquisas anteriores indicam que uma ampla variedade de animais domésticos e selvagens foram expostos ao *N. caninum*. No entanto, *Neospora* viável tem sido isolado em apenas alguns hospedeiros, entre eles, bovinos, ovinos, bubalinos, equinos, cães, bisões e veados de cauda branca (DUBEY et al., 2007).

### 2.2.2 Neosporose equina

A neosporose é uma doença que acomete principalmente os bovinos e cães e não é considerada uma zoonose (DUBEY e SCHARES, 2011). Embora não se conheça completamente a ecologia de *Neospora* spp. em cavalos, muitas comparações foram feitas em relação à infecção por *N. caninum* como causa de doença neuromuscular em cães e abortos em bovinos em todo o mundo (PUSTERLA et al., 2011). De acordo com pesquisadores, em equinos, a infecção por *N. caninum* causa problemas reprodutivos e doença neonatal (VILLALOBOS et al., 2005) e a infecção por *N. hughesi* causa doença neurológica (LINDSAY, 2001; KLIGLER et al., 2007; VERONESI et al., 2008).

Não há publicações sobre o impacto econômico da neosporose em equinos, mas em rebanhos bovinos existem registros de ampla distribuição do agente, alta prevalência nos plantéis e graves problemas na esfera reprodutiva e produtiva (DUBEY e LINDSAY, 1993, 1996; DUBEY, 1999). Reichel (2000)

descreveu prejuízos de \$ 100 milhões ao ano na Austrália, correspondendo a 2-5% das perdas em explorações bovinas por ano no país.

A infecção transplacentária por *Neospora* sp. e a patogênese do aborto causada por esse parasito em equinos são pouco conhecidas (PITEL et al., 2003; HOANE et al., 2006), mas em bovinos descreve-se que a morte fetal resulta provavelmente de insuficiência cardíaca associada à miocardite e necrose do miocárdio, além da placentite, com necrose do epitélio coriônico da placenta. As lesões no cérebro são importantes, porém, não são consideradas as principais causas de morte fetal (ANDERSON et al., 2000).

Um estudo sobre a associação entre a presença de anticorpos anti-*Neospora* spp. em soro de equinos adultos e histórico de perda fetal dentro dos rebanhos foi realizado no estado de São Paulo, demonstrando haver associação positiva ( $p < 0,001$ ) entre as variáveis. Os autores destacaram a participação deste coccídeo na gênese dos distúrbios reprodutivos e a necessidade de mais investigações (VILALOBOS et al., 2006).

Pesquisas têm sido desenvolvidas com o objetivo de verificar a importância da transmissão transplacentária de *Neospora* spp. em equinos. Duarte et al. (2004a) avaliaram o risco de transmissão transplacentária de *Neospora hughesi* em potros na Califórnia durante 3 temporadas de parto e observaram não haver risco detectável desse tipo de transmissão no rebanho estudado. Ao contrário, Antonello et al. (2012), ao avaliarem amostras de soro de éguas Puro Sangue e seus recém-nascidos em fazendas do Sul do Brasil observaram que éguas soropositivas dão origem a um número maior de potros soropositivos pré-colostrais quando comparadas às éguas soronegativas. Segundo os pesquisadores, os resultados mostraram a importância do desafio endógeno e da transmissão transplacentária em cavalos.

Vários trabalhos descreveram a infecção por *Neospora* em cavalos nos Estados Unidos. Dubey e Porterfield (1990) encontraram taquizoítos em tecido pulmonar de feto com dois meses de idade na Carolina do Norte. Neosporose congênita foi encontrada em uma fêmea, Quarto de Milha, de um mês de idade, em Wisconsin, EUA, que apresentava cegueira aparente, e cistos teciduais foram encontrados em seu cérebro na necropsia (LINDSAY et al. 1996).

Neosporose visceral foi descrita em uma égua Appaloosa de 10 anos de idade com histórico de perda de peso e anemia. Nesse animal foram encontradas

lesões nos linfonodos mesentéricos e intestino delgado e taquizoítos foram vistos na lâmina própria da submucosa do intestino delgado (GRAY et al., 1996). A localização das lesões indicou infecção recente por via oral com oocistos. Uma égua de 19 anos de idade com história de paralisia dos membros traseiros e comportamento anormal foi diagnosticada com neosporose, a partir da observação dos parasitos no cérebro, medula espinhal e nervos periféricos (DAFT et al., 1997). A égua também apresentava sinais de doença de Cushing, o que pode ter contribuído para imunossupressão, permitindo a reativação de uma infecção latente (DAFT et al., 1997).

Marsh et al. (1998) diagnosticaram infecção por *Neospora hughesi* em um equino, Quarto de Milha, de 11 anos de idade que apresentava incoordenação leve durante 3 meses, que evoluiu subitamente para um quadro grave de incoordenação. Da mesma forma, uma espécie de *Neospora* foi identificada por Hamir et al. (1998) em cérebro e medula espinhal de um cavalo de 20 anos de idade, em Oregon, Estados Unidos, com ataxia severa. Posteriormente, o parasita foi isolado e identificado como *N. hughesi* a partir de técnicas moleculares (DUBEY et al., 2001a).

Cheadle et al. (1999) diagnosticaram uma infecção por *Neospora* em um equino de 13 anos, Quarto de Milha, do Alabama, EUA, que apresentava ataxia e fraqueza nos membros traseiros há 5 meses. Não foram encontradas lesões na necropsia, mas os parasitas foram isolados em culturas celulares e identificados como *N. hughesi* por técnicas moleculares (MARSH et al., 1998).

Nenhum caso de infecção por *Neospora* associada a encefalite foi relatado em cavalos fora dos EUA até o ano de 2001 (LINDSAY, 2001). Fora do continente americano, a infecção em equinos foi descrita pela primeira vez na França, por Pronost et al. (1999) que diagnosticaram a infecção a partir de um feto, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com primers para *Neospora caninum*.

Como a maioria dos isolados de *Neospora* em eqüinos foi identificada como *N. hughesi*, têm sido sugerido que a neosporose eqüina é predominantemente causada por esta espécie, mas a relativa importância dos dois parasitos para esses animais é, até o momento, desconhecida, devendo ser considerada no diagnóstico da neosporose equina, a infecção pelas duas espécies de *Neospora* (JAKUBEK et al., 2006).

De acordo com Lindsay (2001), pouco se sabe sobre a patogenicidade ou prevalência de *Neospora* em cavalos e não há nenhuma maneira de diferenciar *N. hughesi* e *N. caninum* sorologicamente. O pesquisador ressaltou que estudos precisam ser feitos em cavalos infectados experimentalmente para determinar as respostas sorológicas a *N. hughesi* e *N. caninum*. Os resultados destes tipos de estudos aumentam a eficiência do diagnóstico da neosporose em cavalos e possibilitam determinar a sua importância para a indústria do cavalo (LINDSAY, 2001).

### **2.2.3 Diagnóstico da infecção por *Neospora* spp. em equinos**

Devido aos sinais inespecíficos da neosporose, o diagnóstico laboratorial deve ser realizado para confirmar a infecção por *Neospora* spp. (PACKHAM et al., 2002). Assim, métodos sorológicos e parasitológicos são utilizados. Os testes sorológicos utilizados são a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio Imunoenzimático (ELISA), Soroaglutinação Direta e Western blot. Dentre os métodos parasitológicos estão os exames histopatológicos, imunohistoquímicos, isolamento *in vitro* e *in vivo* e a detecção do DNA do parasita (PCR) (HEMPHILL et al., 2000; HOANE et al., 2006).

Tanto no diagnóstico sorológico de Soroaglutinação Direta quanto na RIFI são utilizados taquizoítos de *N. caninum* ou *N. hughesi* como antígenos e os títulos considerados positivos são a partir de 50, porém, para RIFI são encontrados estudos utilizando como ponto de corte o título 100 (VARDELEON et al., 2001; McDOLE e GAY, 2002). De acordo com Vardeleon et al. (2001), a utilização do título 50 pode aumentar a sensibilidade de diagnóstico e um cavalo infectado poderá ser identificado. A exemplo, Locatelli-dittrich et al. (2006a) identificaram potros pré-colostrais soropositivos nascidos de éguas soropositivas com títulos 50.

O Western blot é considerado específico e tem sido utilizado como teste confirmatório para *Neospora* spp. em muitas espécies animais. Em equinos de diferentes regiões da América do Norte esse teste revelou uma soroprevalência bem menor dentro dos rebanhos, quando comparada às obtidas na RIFI ou ELISA, sugerindo que a infecção é menos comum do que indicam outros estudos (VARDELEON et al., 2001; JAKUBEK et al., 2006). Dessa forma, Gupta et al.

(2002) destacam a presença de limitações no diagnóstico da soroprevalência para a infecção por *Neospora sp.* em populações equinas.

#### **2.2.4 Soroprevalência e fatores de risco para a infecção por *Neospora spp.* em equinos**

Muitos pesquisadores destacaram a carência de dados sobre a infecção em equinos e descreveram prevalências bastante variadas (HOANE et al., 2006; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006; VILLALOBOS et al., 2006). Nos Estados Unidos, a soroprevalência varia de 11 a 23% (CHEADLE et al., 1999; DUBEY et al., 1999d; Mc DOLE e GAY, 2002; DUBEY, 2003). Na Coreia foi encontrada prevalência de apenas 2% em rebanhos equinos (GUPTA et al., 2002) e na Europa, Pitel et al. (2001) encontraram uma soroprevalência de 23% em amostras de soro equino submetidos a diagnóstico em um laboratório francês, achado semelhante ao de Ciaramella et al. (2004), que encontraram 28% de soroprevalência em rebanhos equinos nascidos e criados na Itália. Na Suécia foi relatada uma frequência de 1% de anticorpos anti-*Neospora spp.* em equinos, sendo considerada a mais baixa de todas, comparada com outros países (JAKUBEK et al., 2006).

Nas Américas, além dos Estados Unidos, outros países como Argentina, Chile e Costa Rica também realizaram levantamentos sobre a soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora spp.* em equinos. Na Argentina não foram observados equinos soropositivos (DUBEY et al., 1999a) e no Chile a soroprevalência encontrada foi de 32% em animais com sintomatologia nervosa e/ou abortos (PATITUCCI et al., 2004). Recentemente, na Costa Rica, América Central, Dangoudoubiyam et al. (2011), encontraram anticorpos em 3,5% dos cavalos avaliados no ELISA (NhSAG1), e concluíram ser incomum a infecção em equinos nesse país.

No Brasil, em primeiro estudo, não foi observada soropositividade em rebanhos equinos (DUBEY et al., 1999b), porém, pesquisas posteriores revelaram taxas variadas de soroprevalência para a espécie. Foi observada prevalência de 2,5% em amostras de equinos procedentes de 10 estados brasileiros (HOANE et al., 2006); uma frequência de 10,3% de anticorpos anti-*Neospora caninum* foi encontrada em amostras de equinos adultos de diferentes municípios do Estado

de São Paulo (VILALOBOS et al., 2006); no Paraná, uma soroprevalência de 30 a 47% foi observada em matrizes equinas e 22,2% em potros antes da ingestão de colostro (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006); no Rio Grande do Sul, pesquisadores identificaram uma frequência de 13,8% em uma população de fêmeas da raça Crioula em idade reprodutiva (TOSCAN et al., 2010). Variações na soroprevalência podem ser atribuídas a diferentes condições de manejo, localização geográfica das propriedades e se há ou não exposição ao parasito (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006).

Pesquisas sobre os fatores de risco associados à infecção por *Neospora* spp. em equinos não são encontradas. De modo geral, com relação ao ciclo biológico do *Neospora caninum*, Wouda et al. (1999) ressaltaram que a criação de espécies diferentes com o mesmo manejo e criados no mesmo ambiente, pode aumentar o risco de exposição aos hospedeiros suscetíveis, especialmente quando as espécies envolvidas são fundamentais ao ciclo. Nesse contexto, Lindsay (2001) ressaltou a presença de cães dentro de rebanhos bovinos como risco potencial à ocorrência de sintomas da Neosporose nesses plantéis.

De acordo com pesquisadores, para a infecção por *Neospora* spp. em cavalos, muitas questões ainda precisam ser elucidadas, tais como a forma como esses animais se infectam, se o parasita pode ser mantido na população equina por transmissão vertical e se o cão é o hospedeiro definitivo de *N. hughesi* (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006b).

### **2.2.5 Medidas de controle**

Devido, provavelmente, ao desconhecimento de aspectos epidemiológicos da infecção por *Neospora* spp. em equinos, não são descritos programas de controle direcionados à espécie. No entanto, Toscan et al. (2010), Pusterla et al. (2011) e Antonello et al. (2012), identificando imunoglobulinas em potros recém-nascidos antes da ingestão do colostro, chamaram a atenção para a importância da possível transmissão transplacentária nessa espécie, o que sugere a inclusão desse parasita na lista de agentes a serem pesquisados dentro dos programas sanitários, principalmente nas criações de cavalos para a reprodução.

## 2.3 Infecção por *Sarcocystis neurona* em equinos

*Sarcocystis neurona* é um protozoário coccídeo (Apicomplexa: Sarcocystidae), considerado o principal agente etiológico da Mieloencefalite Protozoária Equina (MPE), uma importante síndrome neurológica que acomete equídeos em todo o continente americano (DUBEY et al., 2001b).

### 2.3.1 Histórico e ciclo biológico

A síndrome conhecida como "mielite segmentar" foi descrita com detalhes pela primeira vez por Rooney et al. (1970), a partir de 52 casos procedentes de Lexington e Filadélfia, Estados Unidos. Já os protozoários foram identificados e relatados pela primeira vez por grupos separados de investigadores em 1974, os quais estudaram cavalos com lesões segmentares (CUSICK et al., 1974;. BEECH e DODD, 1974; DUBEY, 1974). Na época, o parasito recebeu erroneamente o nome de *Toxoplasma gondii* e a síndrome foi nomeada encefalomielite protozoária equina.

Posteriormente, Dubey (1974, 1976) reexaminou os casos descritos e concluiu que o parasito não era *T. gondii* e sim, provavelmente, uma espécie de *Sarcocystis*, o que mais tarde, Simpson e Mayhew (1980) também evidenciaram analisando o ultra-protozoário causador de MPE.

O nome *Sarcocystis neurona* foi proposto para o agente causador de MPE em cavalos, em 1991, e o parasito foi isolado pela primeira vez de um cavalo de Ithaca, Nova York (DUBEY et al., 1991a). Naquele ano, a confirmação da etiologia da MPE ocorreu após cultivo *in vitro* e multiplicação de formas assexuadas de *S. neurona* em monócito bovino (M617) de amostras coletadas de lesões em sistema nervoso central de equinos infectados (DAVIS et al., 1991; DUBEY et al., 1991a).

Infecções por *S. neurona* têm sido relatadas em várias espécies de animais como guaxinins (DUBEY et al., 1990, 1991b; STOFFREGEN e DUBEY, 1991; THULIN et al., 1992; HAMIR e DUBEY, 2001), tatú (CHEADLE et al., 2001a), gato doméstico (DUBEY et al., 1994;. DUBEY e HAMIR, 2000), vison (DUBEY e HEDSTROM, 1993; DUBEY e HAMIR, 2000), gambás (DUBEY et al., 1996; DUBEY e HAMIR, 2000), pônei (DUBEY e MILLER, 1986; DUBEY e HAMIR,

2000), zebra (MARSH et al., 2000), focas (LAPOINTE et al., 1998.), lontras marinhas (ROSONKE et al., 1999; LINDSAY et al., 2000b) e pássaros (MANSFIELD et al., 2008).

Os hospedeiros definitivos do parasita são os gambás, marsupiais da espécie *Didelphis virginiana* (América do Norte e Central) e o *D. albiventris* (América do Sul) (FENGER et al., 1995; DUBEY et al., 2001c). Os hospedeiros intermediários são considerados acidentais, sendo o hospedeiro intermediário natural ainda desconhecido (DUBEY et al., 2001c). Porém, em um estudo realizado na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Michigan – MSU (Estados Unidos) foi comprovada a presença de formas maduras e infectantes do *S. neurona* em um potro eutanasiado após tratamento para MPE (MULLANEY et al., 2005).

*S. neurona* possui um ciclo heteroxeno, necessitando de mais de um hospedeiro para completar seu ciclo de vida. O estágio assexuado ocorre nos hospedeiros intermediários, com a multiplicação do parasito através de merogonia dentro das células endoteliais e o estágio sexuado, ocorre no intestino dos hospedeiros definitivos através de gametogonia (DUBEY et al., 2001d).

Para *Sarcocystis* spp., os hospedeiros intermediários adquirem a infecção através da ingestão de oocistos esporulados ou esporocistos. Os esporozoítos são liberados no intestino do hospedeiro, invadem as células epiteliais, ganham os diversos órgãos e multiplicam-se por uma forma especializada de esquizogonia ou merogonia, chamada endopoligenia. Transformam-se em esquizontes, células multinucleadas, os quais produzem numerosos merozoítos. Em algumas espécies, os merozoítos invadem células endoteliais e produzem infecção sistêmica, havendo, muitas vezes, tropismo por tecidos específicos como cérebro ou músculo. Depois de um número indefinido de ciclos de merogonia, o organismo forma sarcocistos contendo bradizoítos, que são infectantes para o hospedeiro definitivo (DUBEY et al., 2001b; DUBEY et al., 2001c; LINDSAY et al., 2004).

A infecção do hospedeiro definitivo ocorre pela ingestão de carne contendo sarcocistos. Após a ruptura dos cistos, os bradizoítos são liberados e penetram na lâmina própria do trato intestinal onde se desenvolvem em estágios sexuais, os microgametas (machos) e os macrogametas (fêmeas). Através do processo de

gametogonia são originados os oocistos que são liberados nas fezes do hospedeiro definitivo (KISTHARDT e LINDSAY, 1997) (Figura 3).

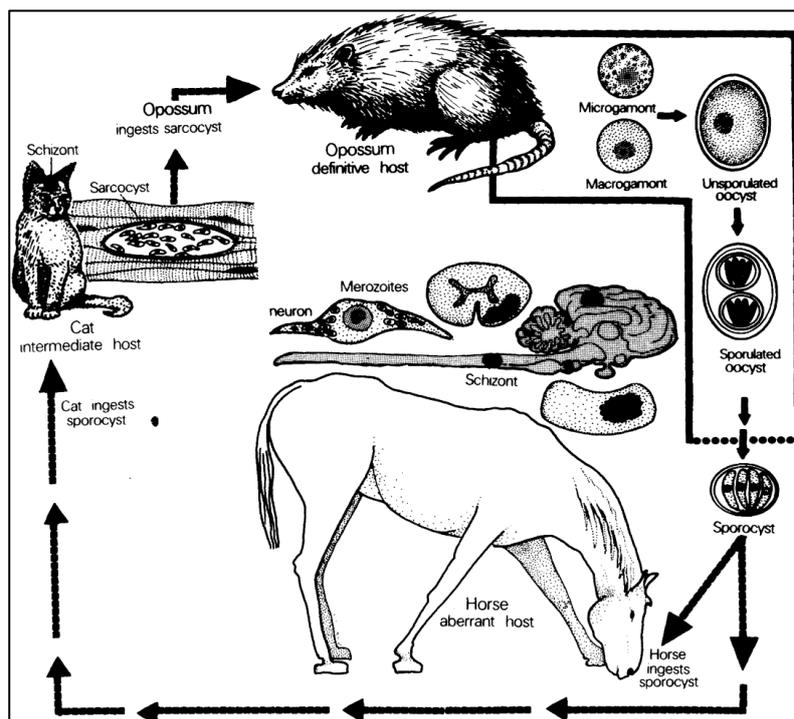


Figura 3 - Ciclo de vida de *Sarcocystis neurona* (DUBEY et al., 2001b).

Em estudo realizado com ratos alimentados com esporocistos de *S. neurona*, observou-se que após a multiplicação do parasito nos tecidos viscerais, este é transportado para o Sistema Nervoso Central (SNC) no interior de leucócitos, escapando assim da ação dos anticorpos (LINDSAY et al., 2006). Três semanas após a infecção, os parasitas já se encontram no SNC e os sinais clínicos da doença vão variar em função da área do SNC parasitada (DIVERS et al., 2000).

### 2.3.2 Sarcocistose Equina / Mieloencefalite Protozoária Equina

A sarcocistose em equídeos ocorre em todo o mundo, mas há dúvidas quanto às espécies de *Sarcocystis* responsáveis pela infecção e formação de sarcocistos em cavalos. Apesar de terem sido descritas quatro espécies de *Sarcocystis* formadoras de cistos em musculatura de cavalos (*S. bertrami*, *S. equicanis*, *S. fayeri* e *S. asinus*) os achados são questionáveis (DUBEY et al., 1989). No entanto, está bem estabelecido que *Sarcocystis neurona* é a espécie mais patogênica para os equinos, causando a Mieloencefalite Protozoária Equina (MPE) (DUBEY et al., 1991a).

Nos Estados Unidos, o prejuízo anual com a doença foi estimado em até 100 milhões de dólares e esse impacto econômico deve-se a perda de carcaças, gastos com medicamentos e veterinários, além do longo período de tratamento dos animais (DUBEY et al., 2001b).

A doença é debilitante e progressiva caracterizada por sinais de fraqueza, ataxia, perda de propriocepção, incoordenação motora, perda de massa muscular, alterações comportamentais e morte (DUBEY et al., 2001b). Nos achados histopatológicos são descritos infiltrado linfocítico e malácea em região perivascular, hemorragia difusa em Sistema Nervoso Central (SNC) e presença de estruturas ovóides ou alongadas, intra e extracitoplasmáticas, semelhantes a protozoários (BEECH e DODD, 1974).

A MPE é frequentemente relatada em cavalos de corrida de 3-6 anos de idade. Os fatores que determinam a gravidade da doença são desconhecidos e a clínica da MPE não parece estar associada com má nutrição e infecções concomitantes conhecidas (DUBEY et al., 2001b).

Os sinais podem decorrer de lesões focais ou multifocais de doença neurológica envolvendo o cérebro, tronco cerebral, medula espinal ou qualquer combinação das regiões do SNC. Como os sinais clínicos de MPE dependem da área parasitada, o envolvimento do cérebro, por exemplo, pode causar depressão, mudanças de comportamento ou convulsões, assim como, lesões no tronco cerebral e medula espinal podem causar anormalidades da marcha, o envolvimento de tratos ascendentes e descendentes pode ocasionar incoordenação ou ataxia de um ou mais membros. Uma variedade de sinais atribuíveis a lesões de pares de nervos cranianos, principalmente paralisia do nervo facial, pode causar sinais de alterações posturais como inclinação da cabeça, tendência a inclinar-se para um lado, paralisia da língua, disfagia e atrofia de músculos masséter-temporais (MACKAY et al., 1992; DIVERS et al., 2000).

Alguns cavalos afetados com MPE tem a função anormal das vias aéreas superiores, e em casos graves, podem apresentar dificuldade em manter-se de pé, caminhar ou engolir, e a doença pode progredir muito rapidamente. Sinais clínicos iniciais de tropeços frequentes são facilmente confundidos com claudicação de membros torácico e/ou pélvicos. Em muitos cavalos a doença tende a ter uma progressão gradual dos sinais, incluindo a ataxia, mas em alguns cavalos a doença parece permanecer estática por um período de tempo, apenas

com sinais clínicos leves, e em seguida apresentar curso rápido e progressivo do quadro (DUBEY et al., 2001b).

### **2.3.3 Diagnóstico da infecção por *Sarcocystis neurona* em equinos**

Vários testes imunológicos têm sido desenvolvidos para o diagnóstico de MPE. O mais antigo e bem estabelecido é o teste WB, semiquantitativo e utilizado na detecção de anticorpos anti-merozoítos (GRANSTROM et al., 1993). As estimativas iniciais de sua eficiência foram de 89% de sensibilidade e 71% de especificidade em soro e 89% tanto de sensibilidade quanto de especificidade em líquido cefalorraquidiano (CSF) (GRANSTROM, 1997).

Um teste de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) foi desenvolvido e avaliado comparativamente por Duarte et al. (2003, 2004), sendo estimada uma sensibilidade de 83% em soro e 100% em CSF, e uma especificidade de 97% e 99%, em soro e CSF, respectivamente. Quando comparada diretamente com o WB, a sensibilidade da RIFI era equivalente, mas sua especificidade era bem maior. A RIFI é um teste quantitativo que produz resultados baseados em títulos e as estimativas acima mencionados foram obtidas após a otimização do teste com valores de corte de 1:80 (soro) e 1:5 (CSF). Segundo Duarte et al. (2003), em testes quantitativos como a RIFI, o ponto de corte mais adequado pode variar em diferentes circunstâncias, de forma que, maiores valores maximizam a especificidade e menores pontos de corte maximizam a sensibilidade do teste.

A RIFI vem sendo utilizada com bastante frequência na detecção de rebanhos soropositivos, pois além de apresentar alta sensibilidade e especificidade, é menos trabalhosa e dispendiosa quando comparada ao WB, considerado padrão ouro para o diagnóstico sorológico de exposição a *S. neurona* (DUBEY et al., 2001b).

Algumas pesquisas também compararam a sensibilidade e a especificidade da RIFI com o Imunoensaio enzimático (ELISA) (JOHNSON et al., 2010, 2013). Foram utilizados cavalos atendidos em um Hospital Veterinário dos Estados Unidos, durante um período de dois anos.

No primeiro trabalho, os pesquisadores identificaram maior sensibilidade da RIFI (94,4% em soro e 92,3% em CSF) e maior especificidade do ELISA em soro (97,1%), e este perdeu mais uma vez para a RIFI na especificidade em CSF (89,7% contra 85,2%). Os títulos de corte ótimos utilizados foram 1:80 na RIFI e

1:32 no ELISA (JOHNSON et al., 2010). No segundo estudo, o ELISA mostrou uma precisão global de sensibilidade e especificidade mais elevada quando comparado à RIFI, que também apresentou alta precisão, mas mostrou sensibilidade reduzida no CSF. Para maximizar a sensibilidade e especificidade dos testes foram utilizados títulos de corte de 1:10 em soro e de 1:5 em CSF na RIFI, e para o ELISA melhores resultados foram obtidos com títulos de corte de 1:500 em soro e de 1:10 em CSF (JOHNSON et al., 2013).

Johnson et al. (2013) chamaram atenção para a menor sensibilidade dos testes sorológicos comparados às estimativas encontradas em pesquisas anteriores (DUARTE et al., 2003; JOHNSON et al., 2010).

Geralmente o diagnóstico definitivo da infecção por *S. neurona* é confirmado após o óbito do animal, através de histopatologia, imunoistoquímica, cultivo celular e PCR (DUBEY et al., 2001c; JOHNSON et al., 2010). As técnicas sorológicas consistem na detecção de anticorpos circulantes em fluidos corporais, podendo ser realizadas como indicadores de infecção em animais sintomáticos, bem como para inquéritos epidemiológicos (JOHNSON et al., 2010).

#### **2.3.4 Soroprevalência e fatores de risco para a infecção por *Sarcocystis neurona* em equinos**

Estudos sobre soroprevalência da infecção por *Sarcocystis neurona* em equinos são realizados com mais frequência nas Américas. Os primeiros estudos sobre a exposição de cavalos ao parasito nos Estados Unidos revelaram soroprevalências variando de 45-50% (BENTZ et al., 1997; BLYTHE et al., 1997; SAVILLE et al., 1997; TILLOTSON et al., 1999). Pesquisas posteriores demonstraram maiores variações. Foi encontrada uma prevalência de 60% em cavalos criados em Michigan (ROSSANO et al., 2001); em Oklahoma observou-se uma soropositividade de 89% (BENTZ et al., 2003) e uma prevalência de 34% foi identificada no norte do Colorado (TILLOTSON et al., 1999).

A soroprevalência em rebanhos equinos nos Estados Unidos e na América do Sul é de aproximadamente 50 e 35%, respectivamente (DUBEY et al., 1999a,b; MACKAY, 1997; SAVILLE et al., 1997; BENTZ et al., 2003). Em outras regiões geográficas, fora do continente americano, prevalências bastante variadas são relatadas, como a de 4% encontrada na Grã-Bretanha e na Irlanda

(EDWARDS, 1984) e 93% na Mongólia (FUKUYO et al., 2002). Na França, anticorpos contra *S. neurona* também têm sido encontrados tanto em equinos saudáveis como em animais com síndrome neurológica (PITEL et al., 2002, 2003).

Mais recentemente, uma pesquisa conduzida com cavalos aparentemente saudáveis da região da Galícia, na Espanha, identificou uma soroprevalência superior a 80% em um conjunto de 138 amostras de soro equino, através do WB, utilizando merozoítos de *Sarcocystis neurona* como antígeno heterólogo (ARIAS et al., 2012). Os pesquisadores ressaltaram que animais poderiam ter sido expostos a *S. neurona* através de alimentos contaminados provenientes das Américas e ainda levantaram a possibilidade de resultados falso-positivos, devido aos ensaios sorológicos anteriores não terem sido realizados para cavalos do Velho Mundo.

Um estudo realizado na Costa Rica, América Central, identificou anticorpos anti-*S. neurona* em 42,2% dos cavalos analisados, usando o SnSAG2 ELISA (DANGOUDOUBIYAM et al., 2011). Com os resultados, os autores sugeriram uma elevada contaminação ambiental com esporocistos de *S. neurona* eliminados por *Didelphis marsupialis* e *D. Virginiana*, espécies de marsupiais nativos na Costa Rica.

Na América do sul, principalmente no Brasil, os estudos sobre a soroprevalência da infecção por *S. neurona* nos rebanhos equinos ainda são escassos. Porém, os poucos estudos descreveram elevadas prevalências nesta região geográfica. Dubey et al. (1999a) encontraram uma soroprevalência de 35,5% em equinos na Argentina e Dubey et al. (1999b) relataram uma soroprevalência de 35,6% para anticorpos anti-*Sarcocystis neurona* em equinos Puro Sangue no Brasil, através da técnica de immunoblot utilizando merozoítos como antígeno. Hoane et al. (2006) identificaram uma soroprevalência de 69,9% em amostras provenientes de dez diferentes estados do Brasil (São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Bahia, Rondônia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás). Ainda, Lins et al. (2008), estudando 27 equinos Puro Sangue Inglês com histórico de incoordenação motora no Rio Grande do Sul detectaram soropositividade em 18 animais (66,6%), utilizando o WB.

São poucas as pesquisas sobre os fatores de risco associados à infecção por *Sarcocystis neurona* em rebanhos equinos. A maioria desses estudos foi desenvolvida nos Estados Unidos e estes descreveram como variáveis importantes a idade dos animais, proximidade geográfica com áreas de ocorrência do hospedeiro definitivo, estresse, intensidade de exercício e fatores sazonais (SAVILLE et al., 1999; SAVILLE et al., 2000). Na América do Norte, o efeito da sazonalidade pode ser observado durante o inverno, quando há redução de esporocistos viáveis no ambiente e conseqüentemente do número de animais soropositivos (RICKARD et al., 2001).

Em estudo de casos-controle realizado com equinos de 11 hospitais veterinários de referência nos Estados Unidos foi observada associação significativa entre a presença de gatos e casos de MPE, porém essa variável não foi considerada desencadeante da doença e apenas importante para a epidemiologia do agente (COHEN et al., 2007).

### **2.3.5 Medidas de controle**

O tratamento dos equinos é recomendado nos casos em que os sinais clínicos de MPE são reconhecidos e o sucesso da terapia depende da precocidade na identificação dos sinais. São utilizados inibidores da diidrofolato redutase que causam bloqueio sequencial do metabolismo do ácido fólico nos protozoários, sendo o exemplo mais comum a combinação de pirimetamina (1,0 mg/kg, por via oral, uma vez ao dia) com sulfadiazina (20mg/Kg, por via oral, duas vezes ao dia) por um período de 120 dias a seis meses. O tratamento deve ser realizado enquanto o CSF for positivo e/ou os animais estiverem demonstrando sinais clínicos (MACKAY et al., 2000; DUBEY et al., 2001b).

Outra alternativa terapêutica é a administração de diclazuril (5,6mg/kg, por via oral, uma vez ao dia) ou toltrazuril (10mg/kg por via oral, uma vez ao dia), ambos coccidiostáticos, pertencentes ao grupo benzeno acetonitrila, por um período de no mínimo 28 dias. Segundo pesquisas, o diclazuril consegue eliminar os estágios primários do *S. neurona*, podendo ser útil na profilaxia da MPE e o toltrazuril desestabiliza o metabolismo do parasita e a divisão celular, apresentando alta eficácia para o tratamento da doença. O uso de antiinflamatórios tais como, Fenilbutazona e Flunixin Meglumine (1,1mg/Kg, por

via intravenosa, duas vezes ao dia, por três a sete dias) associado ao DMSO (1g/kg em 10% de solução, via intravenosa ou via oral), auxiliam no tratamento da doença (STASHAK, 2006).

As medidas preventivas nas criações de equinos têm como principal objetivo impedir o acesso dos gambás às cocheiras e estábulos, e como esses hospedeiros são onívoros, deve-se manter alimentos armazenados em locais fechados, assim como os depósitos de lixo que contenham restos de alimentos (MACKAY et al., 2000).

Desde 2000, uma vacina inativada contendo merozoítos de *S. neurona* foi condicionalmente licenciada à Fort Dodge Animal Health (FDAH) nos Estados Unidos, como recurso auxiliar na prevenção de MPE. Segundo a equipe técnica da FDAH a vacinação estimularia uma resposta imune humoral e celular, o que diminuiria a carga periférica infecciosa e, subseqüentemente, reduziria o número de organismos que penetrariam a barreira hematoencefálica podendo causar doença. Os primeiros estudos feitos pela FDAH revelaram que alguns cavalos tornaram-se positivos no líquido cefalorraquidiano (CSF), utilizando a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), 14 dias após uma segunda vacinação. A empresa declarou também que a soroconverção após vacinação apresentava padrões diferenciados de bandas na WB, não havendo dificuldade na definição de um cavalo soropositivo ou CSF positivo, devido à vacinação ou exposição natural (WITONSKY et al., 2004).

No entanto, sem dados que apoiassem as alegações da FDAH quanto aos padrões de banda, surgiram preocupações quanto à interferência da vacinação em testes de diagnóstico para MPE, assim como para outras doenças neurológicas. Nesse sentido, Witonsky et al. (2004) estudaram 29 equinos com mais de seis meses de idade sem evidência de doença neurológica, os quais receberam a vacina em duas aplicações com intervalo de 3-4 semanas. Os pesquisadores relataram que 89% dos animais inicialmente soronegativos soroconverteram e 80% dos animais inicialmente soropositivos tiveram incremento na quantidade de IgG anti-*S. neurona*. E ainda, não observaram diferenças nos padrões de bandas no WB entre as amostras de cavalos que soroconverteram devido à vacinação contra a exposição natural.

Elevação importante nos títulos de anticorpos anti-*S. neurona* em equinos pós- vacinação também foi relatada por Marsh et al. (2004) e Duarte et al. (2004),

e também, neste último estudo foi sugerida a interferência da vacina no diagnóstico com mieloencefalite protozoária equina.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

Estudar os aspectos epidemiológicos das infecções por *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis neurona* em equinos criados em três Mesorregiões do Estado de Alagoas.

#### 3.2. Específicos

- ✓ Determinar a prevalência da infecção por *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis neurona* em equinos criados no Estado de Alagoas;
- ✓ Identificar os fatores de risco associados às infecções por *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp. e *Sarcocystis neurona* em criações de equinos no Estado de Alagoas.

## REFERÊNCIAS

- ACLAND, H.M. Abortion in Mares. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, p.554-62.
- AJIOKA, J. W.; SOLDATI, D. **Toxoplasma molecular and cellular biology**. Norfolk, UK: Horizon Bioscience, 2007.
- AKCA, A. et al. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in horses in the province of Kars, Turkey. **Veterinary Medicine**, v.49, p.9–13, 2004.
- ALANAZI, A.D.; ALYOUSIF, M.S. Prevalence of Antibodies to *Toxoplasma gondii* in Horses in Riyadh Province, Saudi Arabia. **Journal of Parasitology**, vol. 97, p.943-945, 2011.
- AI-KHALIDY, N.W.; OUBEY, J.P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in horses. **Journal of Parasitology**, n.65, p.331-334, 1979.
- ALMEIDA, F.Q.; SILVA, V.P. Progresso científico em equideocultura na 1ª década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.119-129, 2010.
- ALVARADO-ESQUIVEL, C. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic horses in Durango State, Mexico. **Journal of Parasitology**, v.98, n.5, p.944–945, 2012.
- ALVES, C.J. et al. Avaliação dos níveis de aglutininas anti-toxoplasma em soros de caprinos de cinco centros de criação do nordeste do Brasil, **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.4, n.2, p.75-77, 1997.
- ANDERSON, M.L.; ANDRIANARIVO, A.G.; CONRAD, P.A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.60–61, p.417–431, 2000.
- ANTONELLO, A. M. et al. The importance of vertical transmission of *Neospora* sp. in naturally infected horses, **Veterinary Parasitology**, n.187, p.367– 370, 2012.
- ARIAS, M. et al. Exposure to *Sarcocystis* spp. in horses from Spain determined by Western blot analysis using *Sarcocystis neurona* merozoites as heterologous antigen. Short communication. **Veterinary Parasitology**. v.185, p.301– 304, 2012.
- BARR, B.C. 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**, v.202, p.113–117, 1993.
- BEECH, J.; DODD, D.C., *Toxoplasma*-like encephalomyelitis in the horse. **Veterinary Pathology**, v.11, p.87–96, 1974.
- BENTZ, B.G.; GRANSTROM, D.E.; STAMPER, S., Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in a county of southeastern Pennsylvania. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n.210, p.517–518, 1997.

BENTZ, B.G. et al. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in equids residing in Oklahoma. **The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.15, p.597–600, 2003.

BEYER, T.V.; SHEVHUNOVA, E.A. A review of toxoplasmosis of animals in the U.S.S.R. **Veterinary Parasitology**, v.19, p.225–243, 1986.

BJERKÅS, I.; MOHN, S.F.; PRESTHUS, J. Unidentified cystforming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift fur Parasitenkunde-Parasitology Research**, v.70, p.271-274, 1984.

BLYTHE, L. L. et al. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in Oregon. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n.210, p.525–527, 1997.

BOUGHATTAS, S. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among horses in Tunisia. **Parasites & Vectors**, vol.4, p.218, 2011.

CAMOSSI, L.G.; SILVA, A.V.; LANGONI, H. Inquérito sorológico para toxoplasmose em equinos na região de Botucatu-SP. Comunicação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.2, p.484-488, 2010.

CHEADLE, M.A. et al. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horses. **The International Journal for Parasitology**, v.29, p.1497–1507, 1999.

CHEADLE, M. A. et al. The nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) is an intermediate host for *Sarcocystis neurona*. **The International Journal of Parasitology** v.31, n.4, p. 350-355, 2001.

CIARAMELLA, P. et al. Seroprevalence of *Neospora* spp. in asymptomatic horses in Italy, **Veterinary Parasitology**, v.123, n.1-2, p.11-15, 2004.

COIRO, C.J.; LANGONI, H.; SILVA R.C. Epidemiological Aspects in the *Lep-tospira* spp. and *Toxoplasma gondii* Infection in Horses from Botucatu, São Paulo, Brazil. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.1, p.4. 2012.

COHEN, N. D. et al. A multicenter case-control study of risk factors for equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.231, n.12, December 15, 2007.

CUSICK, P.K. et al. Toxoplasmosis in two horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.164, p.77–80, 1974.

DAFT, B.M. et al. *Neospora* encephalomyelitis and polyradiculoneuritis in an aged mare with Cushing's disease. **Equine Veterinary Journal**, v.29, p.240-243, 1997.

DANGOUDOUBIYAM, S. J. B. et al. Detection of Antibodies Against *Sarcocystis neurona*, *Neospora* spp., and *Toxoplasma gondii* in Horses From Costa Rica. **Journal of Parasitology**, v.97, n.3, p. 522–524, 2011.

DAVIS, S.W.; DAFT, B.M.; DUBEY, J.P. *Sarcocystis neurona* cultured in vitro from a horse with equine protozoal myelitis. **Equine Veterinary Journal**, v.23, p.315–317, 1991.

DIVERS, T.J.; BOWMAN, D.D.; DE LAHUNTA, A. Equine protozoal myeloencephalitis: recent advances in diagnosis and treatment. **Veterinary Medicine** (Suppl.), February, p.3–17, 2000.

DUARTE, P.C. et al. Comparison of a serum indirect fluorescent antibody test with two Western blot tests for the diagnosis of equine protozoal myeloencephalitis. **The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.15, p.8–13, 2003.

DUARTE, P.C. et al. Risk of transplacental transmission of *sarcocystis neurona* and *Neospora hughesi* in California horses. **Journal of Parasitology**, v.90, n.6, p.1345–1351, 2004a.

DUARTE, P.C. et al. Evaluation and comparison of an indirect fluorescent antibody test for detection of antibodies to *Sarcocystis neurona*, using serum and cerebrospinal fluid of naturally and experimentally infected, and vaccinated horses. **Journal of Parasitology**, v.90, p.379–386, 2004.

DUBEY, J.P.; MILLER, N.L.; FRENKEL, J.K. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. **The Journal of Experimental Medicine**, vol.132, p.636–662, 1970.

DUBEY, J.P.; FRENKEL, J.K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **Journal of Protozoology**, vol.19, p.155–177, 1972.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis in horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.165, p.668, 1974.

DUBEY, J.P.; FRENKEL, J.K. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. **Journal of Protozoology**, vol.23, p.537–546, 1976.

DUBEY, J.P. A review of *Sarcocystis* of domestic animals and of other coccidia of cats and dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.169, p.1061–1078, 1976.

DUBEY, J. P. et al. Serologic evaluation of cattle inoculated with *Toxoplasma gondii*: comparison of Sabin-Feldman dye test and other agglutination tests. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, p.1085–1088, 1985.

DUBEY, J.P.; MILLER, S. Equine protozoal myeloencephalitis in a pony. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.188, p.1311–1312, 1986.

DUBEY, J.P. et al. Newly recognised fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, vol.192, p.1269–1285, 1988a.

- DUBEY, J.P. et al. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, vol.193, p.1259-1263, 1988b.
- DUBEY, J.P.; SPEER, C.A.; FAYER, R. Sarcocystosis of Animals and Man. **Parasitology**, June, v.100, n.3, p.500, 1989.
- DUBEY, J.P.; PORTERFIELD, M.L. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. **The Journal of Parasitology**, v.76, p.732–734, 1990.
- DUBEY, J.P. et al. Fatal necrotizing encephalitis in a raccoon associated with a *Sarcocystis*-like protozoan. **The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, vol. 2, p.345–347, 1990.
- DUBEY, J.P. et al. *Sarcocystis neurona* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa), the etiologic agent of equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of Parasitology**, v.77, p.212–218, 1991a.
- DUBEY, J.P. et al. Development of a *Sarcocystis*-like apicomplexan protozoan in the brain of a raccoon (*Procyon lotor*). **Journal of Helminthology**, Soc. Washington, v.58, p.250–255, 1991b.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis. **Parasitology Today**, Amsterdam, v.9, n.12, p.452-458, 1993.
- DUBEY, J.P.; HEDSTROM, O.R. Meningoencephalitis in mink associated with a *Sarcocystis neurona*-like organism. **The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, vol.5, p.467–471, 1993.
- DUBEY, J.P. et al. *Sarcocystis*-associated meningoencephalomyelitis in a cat. **The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.6, p.118–120, 1994.
- DUBEY, J. P. et al. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. **Journal of Parasitology**, v. 81, p.723–729, 1995.
- DUBEY, J.P. et al. Infectivity of low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts to pigs. **Journal of Parasitology**, vol.82, p.438–443, 1996.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, vol.67, p.1-59, 1996.
- DUBEY, J.P. et al. A *Sarcocystis neurona*-like organism associated with encephalitis in a striped skunk (*Mephitis mephitis*). **Journal of Parasitology**, v.82, p.172–174, 1996.
- DUBEY, J.P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, Oxon, v. 28, p. 1019-1024, 1998.
- DUBEY J.P. et al. Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses from Argentina. **Veterinary Parasitology**, vol.86, p.59-62, 1999a.

- 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**, v.215, n.7, p.970-972, 1999b.
- DUBEY, J.P. et al. Serologic prevalence of *Toxoplasma gondii* in horses slaughtered for food in North America. **Veterinary Parasitology**, v.86, p.235-238, 1999c.
- DUBEY, J.P. et al. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horses in North America. **The Journal of Parasitology**, vol.85, p.968-969, 1999d.
- DUBEY, J.P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, n.84, p.349-367, 1999.
- DUBEY, J.P.; HAMIR, A.N. Immunohistochemical confirmation of *Sarcocystis neurona* infections in raccoons, mink, cat, skunk and pony. **Journal of Parasitology**, v.86, p.1150-1152, 2000.
- DUBEY, J.P. et al. Characterisation of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. **The Journal of Parasitology**, April, v.87, n.2, p.345-53, 2001a.
- DUBEY J.P. et al. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, vol.95, n. 2-4, p.89-131, 2001b.
- DUBEY, J.P. et al. First isolation of *Sarcocystis neurona* from the South American opossum, *Didelphis albiventris*, from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.95, p.295-304, 2001c.
- DUBEY, J. P. et al. *Sarcocystis neurona* infections in raccoons (*Procyon lotor*): evidence for natural infection with sarcocysts, transmission of infection to opossums (*Didelphis virginiana*), and experimental induction of neurologic disease in raccoons. **Veterinary Parasitology**, October, v.100, n.3-4, p.117-129, 2001d.
- DUBEY, J.P. et al. Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: unexpected findings. **International Journal for Parasitology**, vol.32, p.99-105, 2002a.
- DUBEY, J. P. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v.32, p.929-946, 2002b.
- DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Korean Journal of Parasitology**, v.41, p.1-16, 2003.
- DUBEY, J. P. et al. Biologic, morphologic, and molecular characterization of *Neospora*

*caninum* isolates from littermate dogs. **International Journal for Parasitology**, vol.34, p.1157–1167, 2004.

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

DUBEY, J. P. et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in rats (*Rattus norvegicus*) in Grenada, West Indies. **Journal of Parasitology**, vol.92, p.1107–1108, 2006.

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

DUBEY, J. P.; SU, C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p.190–195, 2009.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis of Animals and Humans. 2.ed. New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2010, 313p.

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

DUBEY, J.P. et al. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, vol.181, p.382–387, 2011.

DUMÈTRE, A.; DARDÉ, M.L. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? **FEMS Microbiology Reviews**, p. 1-11, 2003.

EDWARDS, G.T. Prevalence of equine Sarcocystis in British horses and a comparison of two detection methods. **Veterinary Record**, v.115, p.265–267, 1984.

EL-GHAYSH, A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Egyptian donkeys using ELISA. **Veterinary Parasitology**, v.80, p.71–73, 1998.

EUGSTER, A. K.; JOYCE, J. R.. Prevalences and diagnostic significance of *Toxoplasma gondii* antibodies. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice Medicine**, vol.71, p.1469–1473, 1976.

FAO - **Food and Agriculture Organization United Nations**. 2011. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>> Acesso em: 24/09/2010.

FENGER, C.K. et al. Identification of opossums (*Didelphis virginiana*) as the putative definitive host of *Sarcocystis neurona*. **Journal of Parasitology**, vol.81, p.916–919, 1995.

FILHA, S.E. et al. *Toxoplasma gondii* em eqüinos: estudo serológico e tentativa de isolamento. **Biologico**, n.52, p.73-74, 1986.

- FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P.; MILLER, N.L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, vol.167, p.893–896, 1970.
- FRENKEL, J.K. et al. Prospective vaccine prepared from a new mutant of *Toxoplasma gondii* for use in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 759–763, 1991.
- FRENKEL J.K. Toxoplasmose. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, v. 2, p. 1310-1325, 2004.
- FREYRE, A. et al. Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. **Journal of Parasitology**, vol.75, p.750–755, 1989.
- FREYRE, A. et al. Immunization of cats with tissue cysts, bradyzoites and tachyzoites of the T. 263 strain of *T.gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 79, n. 5, p. 716-719, 1993.
- FUKUYO, M.; BATTSETSEG, G.; BYAMBAA, B. Prevalence of Sarcocystis infection in horses in Mongolia. Southeast Asian. **Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.33, p.718–719, 2002.
- GARCÍA-BOCANEGRA, I. et al. Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* in domestic pigs from Spain. **Parasitology International**, v.59, p.421–426, 2010.
- GARCÍA-BOCANEGRA, I. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in equids from Southern Spain. **Parasitology International**, v.61, p.421–424, 2012.
- GARCIA J.L. et al. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii*, em suínos, bovinos, ovinos e eqüinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná - Brasil. **Ciência Rural**, vol.29, p.91-97, 1999.
- GAZÊTA, G.S. et al. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em soros de eqüinos no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, vol.6, p.87-91, 1997.
- GONDIM, L.F.P. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, vol.34, p.159–161, 2004.
- GRANSTROM, D.E. et al. Equine protozoal myeloencephalitis: Antigen analysis of cultured *Sarcocystis neurona* merozoites. **The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.5, p.88–90, 1993.
- GRANSTROM, D.E. Equine protozoal myeloencephalitis: parasite biology, experimental disease, and laboratory diagnosis. In: **Proceedings of the International Equine Neurology Conference**, 1997, p.4.

GRAY, M.L. et al. Visceral neosporosis in a 10-year-old horse. **The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.8, p.130-133, 1996.

GUNN, H.M.; FRAHER, J.P. Incidence of sarcocysts in skeletal muscles of horses. **Veterinary Parasitology**, vol.42, p.33-40, 1992.

GUPTA, G.D. et al. Seroprevalence of *Neospora*, *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from Jeju Island, South Korea. **Veterinary Parasitology**, vol.106, p.193-201, 2002.

HAMIR, A.N. et al. *Neospora caninum* associated equine protozoal myeloencephalitis.

**Veterinary Parasitology**, v.79, p.269-274, 1998.

HAMIR, A.N.; DUBEY, J.P. Myocarditis and encephalitis associated with *Sarcocystis neurona* infection in raccoons (*Procyon lotor*). **Veterinary Parasitology**, v.95, p.335-340, 2001.

HEJLÍČEK, K.; LITERAK, I. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in horses in the Czech Republic. **Acta Parasitologica**, v.39, p.217-219, 1994.

HEMPHILL, A. et al. An European perspective on *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.877-924, 2000.

HIETALA, S.K.; THURMOND, M.C. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1669-1676, 1999.

HITT, J.; FILICE, G. Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by gene amplification cell culture and mouse-inoculation. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.10, p.3181-3184, 1992.

HOANE J.S. et al. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora* spp. infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. **Veterinary Parasitology**, v.136, p.155-159, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da pecuária municipal**. 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>> Acesso em: 24/5/2012.

ISHIZUKA, M. M. et al. Toxoplasmose: Estudo comparativo entre as provas de Sabin-Feldman e imunofluorescência indireta para a avaliação de anticorpos antitoxoplasma em soros de eqüinos Puro Sangue Inglês. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Universidade de São Paulo, vol.12, p.283-8, 1975.

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

- JOHNSON, A.L.; BURTON, A.J.; SWEENEY, R.W. Utility of 2 Immunological Tests for Antemortem Diagnosis of Equine Protozoal Myeloencephalitis (*Sarcocystis neurona* Infection) in Naturally Occurring Cases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, vol.24, p.1184–1189, 2010.
- JOHNSON, A.L.; MORROW, J.K.; SWEENEY, R.W. Indirect Fluorescent Antibody Test and Surface Antigen ELISAs for Antemortem Diagnosis of Equine Protozoal Myeloencephalitis. Brief Communication. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 2013.
- KAMANI J.; MANI, A.U.; EGWU, G.O. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic sheep and goats in Borno State, Nigeria. **Tropical Animal Health and Production**, vol.42, n.4, p.793-797, 2010.
- KING, J.S. et al. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, n.40, p.945–950, 2010.
- KISTHARDT, KK; LINDSAY, D.S. Equine protozoal myeloencephalitis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.19, p.8-13, 1997.
- KLINGER, E.B. et al. Seroprevalence of *Neospora* spp. among asymptomatic horses, aborted mares and horses demonstrating neurological signs in Israel, **Veterinary Parasitology**, v.148, n.2, p.109-113, 2007.
- KOMPALIC-CRISTO, A.; BRITTO, C.; FERNANDES, O. Molecular diagnosis of toxoplasmosis: review. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, p. 229-235, 2005.
- KOUAM, M.K. et al. A seroepidemiological study of exposure to *Toxoplasma*, *Leishmania*, *Echinococcus* and *Trichinella* in equids in Greece and analysis of risk factors. Short communication. **Veterinary Parasitology**, v.170, p.170–175, 2010.
- KUPFERSCHMIDT, O. et al. Quantitative detection of *Toxoplasma gondii* DNA in human body fluids by TaqMan polymerase chain reaction. **Clinical Microbiology and Infection**, v.7, n.3, p.120-124, March, 2001.
- LANGONI, H. et al. Utilization of modified agglutination test and indirect immunofluorescent antibody test for the detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in naturally exposed horses. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, vol.44, p.27-32, 2007.
- LAPOINTE, J.M. et al. Meningoencephalitis due to a *Sarcocystis neurona*-like protozoan in Pacific harbor seals (*Phoca vitulina richardsi*). **The Journal of Parasitology**, v.84, p.1184–1189, 1998.
- LAUGIER C. et al. A 24-year retrospective study of equine abortion in Normandy (France). **Journal of Equine Veterinary Science**, vol.31, p.116-123, 2011.

- LARANJEIRA, N.L.; ISHIZUKA, M.M.; HYAKUTAKE, S. Prevalência da toxoplasmose equina avaliada pela técnica de imunofluorescência indireta, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, vol.99, p.158-162, 1985.
- LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **American Journal of Veterinary Research**, v.50, p.1981-1983, 1989.
- LINDSAY, D.S. et al. Central nervous system neosporosis in a foal. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, vol.8, p.507-510, 1996.
- LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; DUNCAN Jr., R.B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v.82, p.327-333, 1999.
- LINDSAY, D.S.; THOMAS, N.J.; DUBEY, J.P. Biological characterization of *Sarcocystis neurona* from a Southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*). **International Journal for Parasitology**, v.30, p.617-624, 2000.
- LINDSAY, D. S. Neosporosis: an emerging protozoal disease of horses **Equine Veterinary Journal**, v.33, n.2, p.116-118, 2001.
- LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B.L.; DUBEY, J.P. Survival of nonsporulated *Toxoplasma gondii* oocysts under refrigerator conditions. **Veterinary Parasitology**, vol.103, p.309-313, 2002.
- LINDSAY, D.S. et al. Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in sea water. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, vol.50, p.687-688, 2003.
- LINDSAY, D. S. et al *Sarcocystis neurona* (Protozoa: Apicomplexa): description of oocysts, sporocysts, sporozoites, excystation, and early development. **The Journal of Parasitology**, v.90, n.3, p. 461-465, 2004.
- LINDSAY, D.S. et al. Penetration of equine leukocytes by merozoites of *Sarcocystis neurona*. **Veterinary Parasitology**, v.138, p.371-6, 2006.
- LINS, L. A. et al. Mieloencefalite protozoária eqüina em equinos nativos do município de Bagé-RS, sul do Brasil, **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.103, n.567-568, p.177-180, 2008.
- LOCATELLI-DITTRICH, R. et al. 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, 2006a.
- LOCATELLI-DITTRICH, R.; HOFFMANN, D.C.S.; DITTRICH, J.R. Neosporose eqüina – Revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 3, p. 1-10, 2006b.

- MCALLISTER, M.M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, n.28, p.1473-1478, 1998.
- MC DOLE, 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, p.257–260, 2002.
- MACKAY, R.J.; DAVIS, S.W.; DUBEY, J.P. Equine protozoal myeloencephalitis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.14, p.1359–1367, 1992.
- MACKAY, R.J. Equine protozoal myeloencephalitis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, n.13, p.79–96, 1997.
- MACKAY, R.J. et al. Equine Protozoal Myeloencephalitis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, n.16, p.405-25, 2000.
- MAITANI, T. Serological investigation toxoplasmosis in human and various animais, and isolation 01 *Toxoplasma gondii* (in Japanese). **Niigata Medical Journal**, n.84, p.325-341, 1970.
- MANSFIELD, L. S. et al. Brown-headed cowbirds (*Molothrus ater*) harbor *Sarcocystis neurona* and act as intermediate hosts. **Veterinary Parasitology** v.153, n.1-2, p. 24-43, 2008.
- MARSH, A.E. et al. Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n.209, p.1907-1913, 1996.
- MARSH, A.E. et al. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **Journal of Parasitology**, v. 84, p.983-991, 1998.
- MARSH, A.E. et al. Detection of *Sarcocystis neurona* in the brain of a Grant's zebra (*Equus burchelli bohme*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, n.31, p.82–86, 2000.
- MARSH, A.E. et al. Evaluation of Immune Responses in Horses Immunized Using a Killed *Sarcocystis neurona* Vaccine. **Veterinary Therapeutics**, v.5, n.1, Spring, 2004.
- MARQUES, L.C. et al. Experimental toxoplasmosis in pregnant mares: a study of fetuses and placentas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, vol.32, p.246–250, 1995.
- MARQUES, J. M. et al. Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em animais de uma comunidade rural do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 4, p. 889-898, out./dez., 2009.
- MARTINS, C.S.; VIANA, J.A. Toxoplasmose- o que todo profissional da saúde deve saber- Revisão. **Clínica Veterinária**, n. 15, p. 33-37, 1998.

MATEUS-PINILLA, N.E.; HANNON, B.; WEIGEL, R.N. A computer simulation of the prevention of the transmission of *Toxoplasma gondii* on swine farms using a feline *T. gondii* vaccine. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 55, p. 17–36, 2002.

MENDONÇA, A. de O. et al. 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.

MILLAR, P.R. et al. A importância dos animais de produção na infecção por *Toxoplasma gondii* no Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n.3, p. 693-706, jul./set., 2008.

MOREIRA, N. et al. Aspectos etiológicos e epidemiológicos do aborto equino. **Archives of Veterinary Science**, v.3, n.1, p.25-30, 1998.

MULLANEY, T. et al. Evidence to support horses as natural intermediate hosts for *Sarcocystis neurona*. **Veterinary Parasitology**, v.133, p.27–36, 2005.

NAVES, C.S. et al. Soroprevalência da toxoplasmose em equinos da raça Mangalarga Marchador no município de Uberlândia, Minas Gerais. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v.11, p.45-52, 2005.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infectio a corps de *Leishmania* (ou du organismes voisins) du gondi. **Comptes Rendus Academy Science**, v.147, p.763-766, 1908.

NEVES, D.P. **Parasitologia dinâmica**. São Paulo: Atheneu, 2003, 474p.

OLIVEIRA FILHO, R.B. et al. Situação epidemiológica da infecção por *Toxoplasma gondii* em equídeos na microrregião do Brejo Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, p.995-1000, outubro, 2012.

OLIVEIRA, E. de et al. Occurrence of Antibodies to *Toxoplasma gondii* in Mules and Donkeys in the Northeast of Brazil. **Journal of Parasitology**, v.99, n.2, p. 343–345, 2013.

PACKHAM, A.E. et al. Qualitative evaluation of selective tests for detection of *Neospora hughesi* antibodies in serum and cerebrospinal fluid of experimentally infected horses. **Journal of Parasitology**, v.88, n.6, p.1239-1246, 2002.

PATITUCCI, A.N. et al. Presencia de anticuerpos sericos contra *Neospora caninum* en equinos en Chile, **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.36, n.2, p.203-206, 2004.

PITEL, P.H. et al. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horses in France. **Equine Veterinary Journal**, n.33, p.205–207, 2001.

PITEL, P.H. et al. Detection of *Sarcocystis neurona* antibodies in French horses with neurological signs. **International Journal for Parasitology**, n.32, p.481–485, 2002.

PITEL, P.H. et al. Investigation of *Neospora* sp. antibodies in aborted mares from Normandy, France. **Veterinary Parasitology**, v.118, p.1-6, 2003.

PRONOST, S. et al. *Neospora caninum*: première mise en évidence en France sur un avorton équin analyse et perspectives. **Prat. vét. Equine**, n.31, p.111-113, 1999.

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.

REED, S. M. *Sarcocystis neurona* infections in raccoons (*Procyon lotor*): evidence for natural infection with sarcocysts, transmission of infection to opossums (*Didelphis virginiana*), and experimental induction of neurologic disease in raccoons. **Veterinary Parasitology** . v.100, n.3-4, p. 117-129, 2001c.

REICHEL, M. P. *Neospora caninum* infection in Australia and New Zealand. **Australian Veterinary Journal**, v. 78, p. 258-261, 2000.

RICKARD, L.G. et al. Risk factors associated with the presence of *Sarcocystis neurona* sporocysts in opossums. **Veterinary Parasitology**, n.102, p.179–84, 2001.

ROONEY, J.R. et al. Focal myelitis–encephalitis in horses. **Cornell Veterinary**, n.50, p.494–501, 1970.

ROSONKE, B.J. et al. Encephalomyelitis associated with a *Sarcocystis neurona*-like organism in a sea otter. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n.215, p.1839–1842, 1999.

ROSSANO, M. G. et al. The seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in Michigan equids. **Preventive Veterinary Medicine**, n.48, p.113–128, 2001.

SAVILLE, W.J.A. et al. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in Ohio. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n.210, p.519–524, 1997.

SAVILLE, W.J.A.; REED, S.M., MORLEY, P.S. Examination of risk factors for equine protozoal myeloencephalitis. **In: Proceedings of the 45th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners; 1999, Albuquerque. Albuquerque: AAEP; 1999, p.48-9.**

SAVILLE, W.J.A. et al. Analysis of risk factors for the development of equine protozoal myeloencephalitis in horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.217, p.1174–80, 2000.

SEBASTIAN, M.M. et al. Review paper: mare reproductive loss syndrome. **Veterinary Pathology**, v.45, n.5, p.710-722, 2008.

SHAAPAN, R.M. et al. PCR and serological assays for detection of *Toxoplasma gondii* infection in sport horses in Cairo, Egypt. **Asian Journal of Animal and Veterinary**, v.7, p.158- 165, 2012.

SHERDING, R.G. Toxoplasmose, Neosporose e Outras Infecções Protozoárias Multissistêmicas. In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. (eds). **Manual Saunders Clínica de Pequenos Animais**. São Paulo : Editora Roca, p. 157-162, 1998.

SILVEIRA, C. Toxoplasmose - Levantamento bibliográfico de 1997-2000. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.64, p.263-270, 2001.

SINGH, S. Mother-to- child transmission and diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Indian Journal of Medical Microbiology**, Mumbai, v. 21, n. 2, p. 69-76, 2003.

SIMPSON, C.F.; MAYHEW, I.G., Evidence for *Sarcocystis* as the etiologic agent of equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of Protozoology**, n.27, p.288–292, 1980.

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

SPLENDRE, A. Um nuovo protozoo parassita de' conigli – incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il kala-azar dell'uomo. **Revista da Sociedade de Ciencias**, v.3, p.109-112, 1908.

STASHAK, T.S. **Claudicação em equinos segundo Adams**. 5. ed. São Paulo-SP: Roca, 2006, p. 1006-1008.

STELMANN, U.J.P.; AMORIM, R.M. Mieloencefalite Protozoária Equina. **Veterinária e Zootecnia**, v.17, n.2, p.163-176, jun, 2010.

STOFFREGEN, D.A.; DUBEY, J.P. A *Sarcocystis* sp.-like protozoan and concurrent canine distemper virus infection associated with encephalitis in a raccoon (*Procyon lotor*). **Journal of wildlife diseases**, n.27, p.688–692, 1991.

TASSI, P. *Toxoplasma gondii* infection in horses. A review. **Parassitologia**. Università degli Studi di Bari, Italy, v.49, p.7-15, 2007.

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

THOMAZ-SOCCOL, V. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em ovinos das áreas urbanas e periurbanas de Curitiba, Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, vol.18, n.1, p.69-70, 2009.

THULIN, J.D. et al. Concurrent protozoal encephalitis and canine distemper virus infection in a raccoon (*Procyon lotor*). **Veterinary Record**, n.130, p.162–164, 1992.

TILLOTSON, K. et al. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in northern Colorado. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.19, p.122–126, 1999.

TIZARD, I.R.; HARMESON, J.; LAI, C.H. The prevalence of serum antibodies to *Toxoplasma gondii* in Ontario mammals. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, p.177-183, 1978.

TOSCAN G. et al. 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.

TURNER, C. B.; SAVVA, D. Evidence of *Toxoplasma gondii* in an equine placenta. **Veterinary Record**, v.127, p.96–96, 1990.

TURNER, C.B.; SAVVA, D. Detection of *Toxoplasma gondii* in equine eyes. **Veterinary Record**, v.129, p.128, 1991.

TURNER, C. B.; SAVVA, D. Transplacental infection of a foal with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Record**, v.131, p.179–180, 1992.

UGGLA, A.; MATTSON, S.; JUNTTI, N. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cats, dogs and horses in Sweden. **Acta Veterinaria Scandinavica**, n.31, p.219–222, 1990.

VARDELEON, D. et al. Prevalence of *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from various geographical locations. **Veterinary Parasitology**, v.95, p.273-282, 2001.

VERONESI, F. et al. *Neospora* spp. infection associated with equine abortion and/or stillbirth rate. **Veterinary Research Communications**, v.32, n.1, p.223-226, 2008.

VIDOTTO, O. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em eqüinos procedentes de quatro estados (SP, PR, MS e MT) abatidos em Apucarana, PR. **Semina: Ciências Agrárias**, v.18, n.9, p.13, 1997.

VILLALOBOS, E.M.C. et al. Estudo de caso-controle para verificação de associação entre distúrbios reprodutivos em fêmeas da espécie eqüina e infecção por *Neospora* sp. In:“I Fórum Brasileiro de Estudos sobre *Neospora caninum*”, USP, São Paulo, **Anais...** 2005.

VILLALOBOS, E.M.C. et al. Association between the presence of serum antibodies against *Neospora* spp. and fetal loss in equines. **Veterinary Parasitology**, v.142, p.372-375, 2006.

VAN KNAPEN, F. et al. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cattle and swine in the Netherlands: towards an integrated control of livestock production. **Vet. Q.**, v.17, p.87-91, 1995.

WALSH, C.P. et al. *Neospora hughesi*: Experimental infections in mice, gerbils, and dogs. **Veterinary Parasitology**, n.98, p.119-129, 2000.

WITONSKY, S. et al. *Sarcocystis neurona*-specific immunoglobulin G in the serum and cerebrospinal fluid of horses administered *S. neurona* vaccine. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, n.18, p.98–103, 2004.

WOUDA, W. et al. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n.10, p.1677-1682, 1999.

YILMAZ, S. M.; HOPKINS, S. H. Effects of different conditions on duration of infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. **Journal of Parasitology**, v.58, p.938–939, 1972.

ZARDI, O. et al. Studi epidemiologici sulla toxoplasmosi. Isolamento di stipiti di *Toxoplasma gondii* da animali domestici. **Nuovi Ann Ig Microbiol**, n.15, p.545-551, 1964.

ZARDI, O. et al. Serological studies on *T. gondii* infection in a limited number of animal species. **Zooprofilassi**, n.22, p.223–237, 1968.

## **CAPÍTULO 1**

Prevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* em equinos no Estado de Alagoas, Brasil.

## **Prevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* em equinos no Estado de Alagoas, Brasil.**

**Resumo:** Objetivou-se pesquisar a prevalência e os fatores de risco associados à infecção por *Toxoplasma gondii* em equinos criados no Estado de Alagoas, Brasil. Foram avaliadas 440 amostras procedentes de 36 propriedades localizadas em 23 municípios distribuídos nas Mesorregiões Leste, Agreste e Sertão do Estado de Alagoas. O estudo dos fatores de risco foi realizado por meio da aplicação de questionários investigativos sobre o manejo produtivo, reprodutivo e sanitário dos rebanhos, posteriormente submetidos à análise estatística. O diagnóstico sorológico da infecção por *T. gondii* foi realizado pela técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI), utilizando o ponto de corte 64. A prevalência foi de 14,4% (I.C.=11,0%-17,8%) com equinos positivos em 69,4% das propriedades estudadas. Foi encontrada associação significativa entre a presença de anticorpos contra-*T. gondii* e o consumo e o armazenamento de feno (OR = 2,08 / IC = 1,20 – 3,62). Este é o primeiro relato da infecção por *T. gondii* em equinos criados no Estado de Alagoas, Brasil. Os resultados demonstram que os equinos do Estado de Alagoas estão expostos ao risco de infecção por *T. gondii*, sendo a utilização do feno um recurso que merece cuidado em relação à disseminação de *Toxoplasma gondii* nos rebanhos.

**Termos de indexação:** Toxoplasmose, soroprevalência, fatores de risco, equinos.

## INTRODUÇÃO

*Toxoplasma gondii* é um parasito protozoário intracelular zoonótico de distribuição mundial. Os seres humanos e praticamente todas as espécies de sangue quente podem ser hospedeiros intermediários (DUBEY, 2010). Apresenta como único hospedeiro definitivo os felídeos, sendo o gato doméstico o maior representante na sua transmissão (FRENKEL et al., 1991; DUBEY, 1995). Em equinos infectados, sinais como febre, ataxia, degeneração da retina, aborto, danos ao feto e grave encefalomielite podem ser observados, porém, a doença é geralmente assintomática (SILVEIRA, 2001; TASSI, 2007).

Apesar da baixa prevalência de *T. gondii* em equinos quando comparada com outras espécies domésticas (MILLAR et al., 2008), trabalhos vem sendo realizados apoiando-se no fato de que o estudo da toxoplasmose animal, baseia-se fundamentalmente na condição desses animais representarem importantes fontes de infecção do protozoário para o homem e pelo fato da doença acarretar perdas econômicas aos rebanhos, principalmente pelos casos de abortamento e nascimento de fetos inviáveis (NAVES, 2005).

São poucos os estudos envolvendo os fatores de risco para a infecção por *T. gondii* em rebanhos equinos brasileiros, especialmente na região Nordeste do país, além de demonstrarem percentuais variados de prevalência (OLIVEIRA FILHO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013). Devido à ausência de dados sobre esta enfermidade no estado de Alagoas, Brasil, objetivou-se estudar a prevalência da infecção por *T. gondii* e identificar os fatores de risco associados à infecção em equinos criados no Estado de Alagoas, Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Área de estudo

O estudo foi desenvolvido em criações de equinos situadas no Estado de Alagoas, Brasil (Figura 1). Este Estado situa-se na porção Centro-Oriental do Nordeste Brasileiro, em uma faixa intertropical e apresenta longos períodos de irradiação solar com variação de 2200 a 2600 horas de sol distribuídas durante o ano. A temperatura é elevada durante a maior parte do ano, com variações

ocorrendo entre 22°C e 28°C. Divide-se em três mesorregiões: Leste Alagoano, Agreste Alagoano e Sertão Alagoano (ASSIS et al., 2007).

A Mesorregião Leste caracteriza-se por clima tropical litorâneo úmido, com umidade relativa do ar de 79,2% e índice pluviométrico de 1.410 mm/ano. O sol impera nos meses de setembro a maio e nesse período a temperatura varia de 19°C à 32°C. Os meses de junho a agosto são representados por chuvas e a temperatura varia de 15°C à 26°C. A Mesorregião Sertão apresenta clima semi-árido, com precipitação irregular de chuvas e umidade relativa do ar baixa. A Mesorregião Agreste, por estar entre o Sertão e o Leste Alagoano, apresenta características das duas regiões (ANEXO, 2013).

### **Amostragem**

Para compor a amostra foi considerada uma prevalência esperada de 50%, com nível de confiança de 95% e erro estatístico de 5% (THRUSFIELD, 2004). Esses parâmetros indicaram uma amostra mínima de 385 animais.

Foi realizado um estudo transversal, utilizando 440 amostras de soro equino. Os animais eram de ambos os sexos, com idade acima dos 36 meses, escolhidos por conveniência e procedentes de 36 propriedades, localizadas em 22 municípios distribuídos nas Mesorregiões Leste, Agreste e Sertão do Estado de Alagoas, Brasil (Figura 1). As amostras foram coletadas por meio de venopunção jugular utilizando sistema de coleta de sangue a vácuo (BD Vacutainer®).

Os equinos eram utilizados para a reprodução com manejo de monta natural e/ou inseminação artificial, pertencentes a diferentes raças e submetidos a um manejo semi-intensivo, em criações situadas no Leste e Agreste Alagoano e intensivo nas propriedades do Sertão. Recebiam alimentação à base de forragem verde e/ou feno, além de ração balanceada.

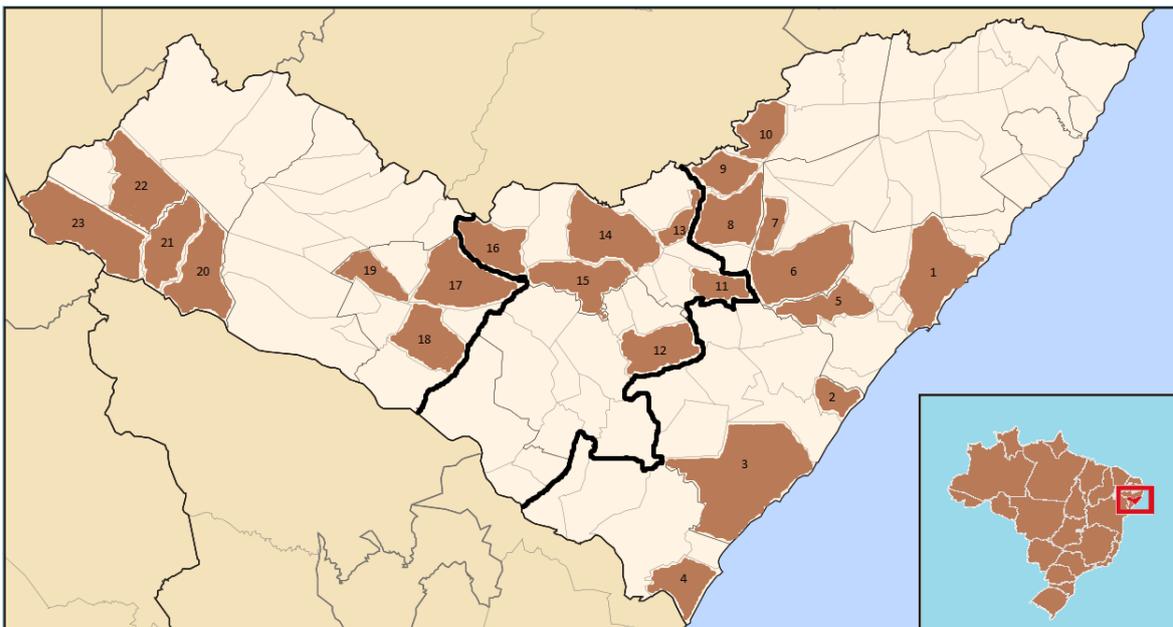


Figura 1- Distribuição dos 22 municípios estudados dentro das três Mesorregiões do Estado de Alagoas, Nordeste do Brasil. (Leste: 1 - Maceió; 2 - Jequiá da Praia; 3 – Coruripe; 4 – Piaçabuçu; 5 – Pilar; 6 – Atalaia; 7 – Cajueiro; 8 – Viçosa; 9 – Chã Preta; 10 – Santana do Mundaú. Agreste: 11 – Marimbondo; 12 – Limoeiro de Anadia; 13 – Mar Vermelho; 14 – Palmeira dos Índios; 15 - Igaci; 16 – Cacimbinhas; Sertão: 17 – Major Isidoro; 18 – Batalha; 19 – Olho D’Água das Flores; 20 – Piranhas; 21 – Olho D’Água do Casado; 22 – Água Branca; 23 – Delmiro Gouveia)

## Sorologia

Para a pesquisa de anticorpos IgG contra-*Toxoplasma gondii* foi empregada a técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (CAMARGO,1974), utilizando-se anticorpos anti-IgG-equino conjugado ao isotiocianato de fluoresceína da marca Sigma-Chemical®. Em todas as reações foram incluídos controle positivo e negativo, previamente conhecidos. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram fluorescência total na diluição 1:64. As amostras positivas foram submetidas a diluições seriadas na razão dois até a obtenção da maior diluição positiva. O título do soro foi a recíproca da maior diluição que apresentou resultado positivo.

## Análise estatística

Foi utilizada a análise estatística descritiva para cálculos das frequências relativa e absoluta dos resultados obtidos no teste sorológico. O estudo dos

fatores de risco foi realizado por meio da aplicação de questionários investigativos, constituídos por perguntas objetivas referentes ao manejo produtivo, reprodutivo e sanitário dos animais. Para identificar os fatores de risco associados à infecção por *Toxoplasma gondii* foi realizada inicialmente uma análise univariada das variáveis de interesse através do teste Qui-quadrado de Pearson, ou Exato de Fisher, quando necessário, com nível de significância de 5%. Posteriormente foi feita uma análise multivariada utilizando o modelo de regressão logística, considerando como variável dependente o status sorológico do animal (positivo ou negativo). As variáveis independentes ou explanatórias consideradas no modelo foram aquelas que apresentaram significância estatística  $<0,20$ . Essa probabilidade foi estipulada para que possíveis fatores de risco do evento não sejam excluídos da análise (HOSMER e LEMESHOW, 1989). Para a execução dos cálculos estatísticos foi utilizado o programa Epi Info, versão 3.5.1 – *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*.

## RESULTADOS

Das 440 amostras analisadas, 63 (14,3% - I.C.=11,0%-17,8%) foram positivas na RIFI. O título 64 foi identificado em 27 (42,85%) amostras; título 128 em 16 (25,39%); título 256 em 15 (23,8%); título 512 em três (4,76%) e título 1024 em duas amostras (3,17%). Foram observados equinos positivos em 69,4% das propriedades estudadas com uma variação de 4,34% a 50%.

Não houve diferença significativa entre as Mesorregiões estudadas ( $p=0,186$ ), contudo a Mesorregião Leste apresentou a maior prevalência (18,2%) (Tabela 1).

Tabela 1 – Prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em equinos no estado de Alagoas, Brasil.

MESORREGIÃO	RIFI <i>Toxoplasma gondii</i>		
	N	(+)	Prevalência
Leste	214	39	18,2%
Agreste	38	04	10,5%
Sertão	188	20	10,6%
Total	440	63	14,3%

Verificou-se maior prevalência (18,9%) em propriedades onde havia consumo de feno, contra 10% de positivos em criações onde os animais

consumiam o volumoso verde ( $p=0,005$ ) (Tabela 2), sendo a sua utilização deste tipo de alimento confirmada como fator de risco na análise multivariada (Tabela 4).

Tabela 2 - Fatores de manejo geral dos equinos pesquisados na análise univariada para a associação com a infecção por *Toxoplasma gondii*.

VARIÁVEL	N	RIFI Positivo	ANÁLISE UNIVARIADA	P
			OR (I.C. 95%)	
<b>Raças</b>				
Quarto-de-Milha	132	19 (14,4%)	-	0,000
Mangalarga	165	35 (21,2%)	1,60 (0,84 – 3,14)	
Mestiça/SRD	143	9 (6,3%)	0,35 (0,13 – 0,88)	
<b>Cochos e Bebedouros</b>				
Individuais	241	43 (17,8%)	-	0,011
Coletivos	126	16 (12,7%)	0,67 (0,34 – 1,28)	
Ambos	73	4 (5,5%)	0,20 (0,04 – 0,65)	
<b>Consumo de ração</b>				
Sim	440	63 (14,3%)	-	0,184
Não	0	0 (0%)	-	
<b>Local de armazenamento de ração</b>				
Galpões fechados	381	60 (16,1%)	-	0,000
Local aberto	59	3 (5,0%)	0,01 (0,00 – 0,03)	
<b>Consumo de feno</b>				
Sim	201	38 (18,9%)	-	0,005
Não	239	24 (10%)	2,08 (1,16 - 3,78)	
<b>Local de armazenamento do feno</b>				
Galpõesfechados	201	38 (18,9%)	-	0,005
Local aberto	239	24 (10,5%)	2,08 (1,16 - 3,78)	
<b>Esterqueira</b>				
Não	181	36 (19,9%)	-	0,002
Sim	259	27 (10,4%)	2,22 (1,24 - 4,00)	
<b>Animais de reposição</b>				
Próprio haras	89	6 (6,7%)	-	0,001
Propriedades vizinhas	102	9 (8,8%)	1,63 (0,47 – 6,41)	
Outros Municípios ou Estados	249	48 (19,3%)	4,01 (1,52 – 13,33)	
<b>Presença de gatos</b>				
Sim	222	30 (13,5%)	-	0,415
Não	218	33 (15,1%)	0,90 (0,51 – 1,61)	
<b>Trânsito de gatos nos locais de armazenamento de alimentos</b>				
Sim	141	15 (10,6%)	-	0,098
Não	299	48 (16,0%)	0,63 (0,31 - 1,21)	

OR = "Odds Ratio" (razão de chances); IC = Intervalo de confiança de 95%.

Tabela 3 - Fatores de manejo reprodutivo dos equinos pesquisados na análise univariada.

VARIÁVEL	N	RIFI Positivo	ANÁLISE UNIVARIADA OR (I.C. 95%)	P
<b>Utiliza reprodutores de outro haras</b>				
Sim	337	53 (15,7%)		
Não	103	10 (9,7%)	1,69 (0,81 - 3,89)	0,094
<b>Adiquiriu matrizes nos últimos 5 anos</b>				
Sim	347	55 (15,8%)		
Não	93	8 (8,6%)	1,95 (0,87 - 4,94)	0,056
<b>Introduziu reprodutores nos últimos 5 anos</b>				
Sim	287	45 (15,7%)		
Não	153	18 (11,8%)	1,35 (0,73 - 2,59)	0,190

OR = "Odds Ratio" (razão de chances); IC = Intervalo de confiança de 95%.

Tabela 4 – Análise de regressão logística para a variável associada à infecção por *T. gondii* em equinos no Estado de Alagoas, Brasil.

VARIÁVEIS	Valor de p	OR	IC 95%	Coeficiente	S.E.
<b>Consumo Feno</b>					
Sim/Não	0,008	2,08	1,20 3,62	0,736	0,280

OR = "Oddsratio" (razão de chances); IC = Intervalo de confiança de 95%.

## DISCUSSÃO

No Brasil são descritos diferentes percentuais de prevalência para a infecção por *T. gondii* em equinos, como demonstrado nos trabalhos de Mendonça et al. (2001) que detectaram prevalência de 1,5% (5/343) em equinos no Estado da Bahia; Costa et al. (2012) que encontraram prevalência de 43,7% no arquipélago de Fernando de Noronha, Estado de Pernambuco e Oliveira Filho et al. (2012) que observaram prevalência de 8,3% em equinos criados no Estado da Paraíba.

Da mesma forma, em outros países valores distintos de prevalência foram divulgados por Kouam et al. (2010), os quais relataram uma prevalência global de 1,8% em cavalos, mulas e pôneis na Grécia e García-Bocanegra et al. (2012), que descreveram soroprevalências de 14,7% em equinos, 23,9% em asininos e 34,0% em muares na Espanha.

A variação na prevalência pode decorrer de vários fatores como o método sorológico utilizado, a idade dos animais e área geográfica estudada. Segundo Tassi (2007), em condições naturais, esses fatores podem influenciar na prevalência variando-a de 0 a 90%. Oliveira Filho et al. (2012) acrescentaram como possíveis causas de variações na prevalência, a amostragem, as condições ambientais, o ponto de corte utilizado no teste, bem como, o tipo de criação, alimentação, fonte de água e presença de felídeos.

No presente estudo, apesar de não ter sido observada diferença significativa entre a prevalência e a mesorregião pesquisada, as maiores prevalências ocorreram nos municípios da Mesorregião Leste do estado de Alagoas, região de clima tropical com moderado índice pluviométrico, temperatura amena (25 a 28°C) e umidade relativa alta (ARAÚJO et al., 2012). Semelhantemente, Alves et al. (1997) e Oliveira Filho et al. (2012) registraram maior prevalência da infecção em áreas com as mesmas características, no estado da Paraíba e Oliveira et al. (2013) em outros estados da região Nordeste. Dessa forma, a capacidade do oocisto sobreviver por longos períodos nestas condições de umidade e temperatura (DUBEY, 2010) pode justificar a prevalência mais elevada nos animais criados nesta Mesorregião quando comparada às outras no mesmo Estado que apresentam temperatura mais elevada e menor índice pluviométrico.

No Brasil, as prevalências em asininos e muares têm sido superiores às encontradas em equinos, no entanto, Mendonça et al. (2001) sugeriram que os muares são tão resistentes à infecção por *T. gondii* como os cavalos. Oliveira et al. (2013) identificaram prevalências de 23,8% em muares e 43,2% em asininos de quatro estados da região do Nordeste, destacando que a condição de abandono dos asininos em áreas urbanas e de aterro sanitário, além do clima da região estudada são determinantes para a alta prevalência nesta espécie.

Na presente pesquisa, não houve associação da presença de gatos e do consumo de pasto verde com a prevalência; do contrário, verificou-se que a utilização do feno na alimentação dos animais teve um efeito significativo na infecção. Na maioria (90%) das propriedades onde se utilizava o feno, os equinos eram criados para atividades esportivas ou de recreação, sendo mantidos, durante a maior parte do dia, em baias ou pequenos piquetes consumindo feno e

ração no cocho. Essa associação também foi identificada por Alvarado-Esquivel et al. (2012) em rebanhos equinos no México.

Neste caso, o feno pode ser produzido de forma inadequada ou estar mal armazenado e desta forma ser contaminado com oocistos liberados nas fezes dos gatos, que foram relatados por alguns proprietários, circulando nos locais de armazenamento do feno, apesar da sua presença não ter sido significativa neste estudo. A ausência do fator de risco relacionado à presença de gatos nas propriedades também foi descrito por García-Bocanegra et al. (2012) em estudo com equinos na Espanha, porém os autores discutiram a dificuldade em avaliar a real presença desses hospedeiros nas instalações ou campos onde os equinos eram mantidos, sem descartar a sua importância para a infecção dos animais.

Machacova et al. (2013) descreveram a presença dos gatos nas fazendas e o seu acesso à alimentação como fator de risco para a infecção em asininos na Itália, além de outros fatores não identificados na presente pesquisa, como o sexo (fêmeas), a idade (entre 5 e 9 anos), e o pastejo dos animais durante todo o ano.

Maiores prevalências foram observadas em propriedades peri-urbanas quando comparadas àquelas de área rural. Da mesma forma, Oliveira et al. (2013) e Oliveira Filho et al. (2012), em estudos com equídeos do Nordeste brasileiro identificaram tal associação e relacionaram o evento à presença de gatos peri-domiciliares nessas propriedades. O contrário, porém, foi relatado por Alvarado-Esquivel et al. (2012), no México, que observaram a área rural com maior prevalência quando comparada à urbana, sendo destacada a falta de cuidados e higiene com o alimento dos animais na zona rural como fator importante para esse resultado. Em outros estudos com as espécies ovina no Brasil (THOMAZ-SOCCOL et al., 2009) e caprina, na Nigéria (KAMANI et al., 2010), a proximidade das criações aos centros urbanos também foi destacada como fator de risco. Os pesquisadores descreveram que o evento ocorre devido a maior variação da densidade populacional e dinâmica de hospedeiros definitivos e intermediários nesses locais.

## CONCLUSÃO

Este é o primeiro relato da infecção por *T. gondii* em equinos criados no Estado de Alagoas, Brasil. A presença de equinos soropositivos para *Toxoplasma gondii* com um elevado número de focos no Estado de Alagoas, Brasil, demonstra a frequente exposição desses animais ao *T. gondii*, principalmente na mesorregião Leste. A utilização do feno é uma prática que merece cuidado, principalmente no que se refere ao armazenamento, para reduzir a prevalência da infecção nos rebanhos.

## REFERÊNCIAS

ALVARADO-ESQUIVEL, C. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Infection in Domestic Horses in Durango State, Mexico, **Journal of Parasitology**, v.98, n.5, p.944-945, 2012.

ALVES, C.J. et al. Avaliação dos níveis de aglutininas anti-toxoplasma em soros de caprinos de cinco centros de criação do nordeste do Brasil, **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.4, n.2, p.75-77, 1997.

ANEXO: **Lista de mesorregiões de Alagoas**. Wikipédia: Enciclopédia livre. 2013. Disponível em:

[http://pt.wikipedia.org/wiki/Anexo:Lista\\_de\\_mesorregi%C3%B5es\\_de\\_Alagoas](http://pt.wikipedia.org/wiki/Anexo:Lista_de_mesorregi%C3%B5es_de_Alagoas)

ARAÚJO, T.M. et al. Erosão e progradação do litoral brasileiro – Alagoas.

**Ministério do Meio Ambiente, BRASIL**, 2012. Disponível em:

[www.mma.gov.br/estruturas/sqa\\_sigercom/.../al\\_erosao.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/sqa_sigercom/.../al_erosao.pdf)

ASSIS, J.S.; ALVES, A.L.; NASCIMENTO, M.C.. **Atlas escolar Alagoas: espaço geohistórico e cultural**. João Pessoa: Grafset, 2007. 208p.

CAMARGO, M. E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, vol.10, p.143–169, 1974.

COSTA, D. G. C. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Domestic and Wild Animals From the Fernando de Noronha, Brazil. **Journal of Parasitology**, vol. 98, n.3, p.679-680, 2012.

DUBEY, J. P. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.81, n.3, p.410-415, 1995.

DUBEY, J. P. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. 2.ed. New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2010, 313p.

FRENKEL, J.K. et al. Prospective vaccine prepared from a new mutant of *Toxoplasma gondii* for use in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 759–763, 1991.

GARCÍA-BOCANEGRA, I. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in equids from Southern Spain, **Parasitology International**, v.61, p.421–424. 2012.

HOSMER, D.W.; LEMESHOW, S. **Applied Logistic Regression**, 2.ed., New York: Wiley Interscience, 1989.

KAMANI, J.; MANI, A.U.; EGWU, G.O. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic sheep and goats in Borno State, Nigeria, **Tropical Animal Health and Production**, v.42, n.4, p.793-797, 2010.

KOUAM, M.K. et al. 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.

MACHACOVA, T. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Donkeys (*Equus asinus*) in Italy, **Journal of Veterinary Medical Science**, v.76, n.2, p.265–267, 2014.

MENDONÇA, A.O. et al. Inquérito sorológico para toxoplasmose em equídeos procedentes de duas regiões do Estado da Bahia, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.22, p.115-118, 2001.

MILLAR, P.R. et al. A importância dos animais de produção na infecção por *Toxoplasma gondii* no Brasil, **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n.3 (jul./set.), p. 693-706, 2008.

NAVES, C.S. et al. Soroprevalência da toxoplasmose em equinos da raça Mangalarga Marchador no município de Uberlândia, Minas Gerais. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, vol.11, p.45-52, 2005.

OLIVEIRA FILHO, R. B. et al. Situação epidemiológica da infecção por *Toxoplasma gondii* em equídeos na microrregião do Brejo Paraibano **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol.32 (OUT), p.995-1000, 2012.

OLIVEIRA, E. et al. Occurrence of Antibodies to *Toxoplasma gondii* in Mules and Donkeys in the Northeast of Brazil, **Journal of Parasitology**, vol.99, n.2, p. 343–345, 2013.

SILVEIRA C. Toxoplasmose - Levantamento bibliográfico de 1997-2000, **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v.64, p.263-270. 2001.

TASSI, P. *Toxoplasma gondii* infection in horses. A review. **Parassitologia**. v.49, p.7-15, 2007.

THOMAZ-SOCCOL, V. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em ovinos das áreas urbanas e periurbanas de Curitiba, Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, vol.18, n.1, p.69-70, 2009.

THRUSFIELD, M.V. **Epidemiologia Veterinária**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2004. 556p.

## **CAPÍTULO 2**

Prevalência da infecção por *Neospora caninum* em equinos no Estado de Alagoas, Brasil.

## **Prevalência da infecção por *Neospora caninum* em equinos no Estado de Alagoas, Brasil.**

**Resumo:** Objetivou-se pesquisar a prevalência e os fatores de riscos associados à infecção por *Neospora caninum* em equinos criados no Estado de Alagoas, Região Nordeste do Brasil. Foram avaliadas 427 amostras, procedentes de 36 propriedades localizadas em 23 municípios, distribuídos em três Mesorregiões. Para a pesquisa de anticorpos contra *Neospora caninum* foi empregada a técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta. O estudo dos fatores de risco foi realizado por meio da aplicação de questionários investigativos sobre o manejo produtivo, reprodutivo e sanitário, sendo posteriormente submetidos à análise estatística. A prevalência de anticorpos contra-*Neospora caninum* foi de 18% (I.C. 14,4 – 22,1%) e 26 (72,2%) propriedades apresentaram pelo menos um animal positivo. Os fatores de risco associados à infecção foram o acesso de outras espécies animais à fonte de água dos equinos ( $p = 0,017$ ; OR = 1,84; IC = 1,11 – 3,04), não utilizar feno na alimentação dos equinos ( $p=0,000$ ; OR = 3,33; IC = 1,87 – 5,94), a compra de animais oriundos de comércio informal ( $p=0,000$ ; OR = 8,43; IC = 3,06 – 23,16) e a ausência de quarentena ( $p=0,000$ ; OR = 8,70; IC = 3,10 – 24,39). Os resultados obtidos neste estudo indicam que os equinos do Estado de Alagoas estão expostos ao risco de infecção por *N. caninum*, sendo o ambiente e a procedência dos animais os fatores que requerem cuidados quanto à disseminação do agente nos rebanhos.

**Termos de indexação:** Neosporose, cavalos, soroprevalência, fatores de risco.

## INTRODUÇÃO

*Neospora* spp. é um parasita intracelular obrigatório que apresenta duas espécies, *N. caninum* e *N. hughesi*. *N. caninum* foi relatado em cães (hospedeiro definitivo) e em várias espécies de animais. *N. hughesi* foi isolado em cavalos (LINDSAY, 2001), porém não se conhece o hospedeiro definitivo, há dúvidas quanto aos hospedeiros intermediários e ainda permanece incerta a forma de exposição a esse parasito (HOANE et al., 2006).

Segundo Dubey et al. (2003), a transmissão de *Neospora* spp. pode ocorrer por via horizontal ou vertical. Em equinos, a infecção por *N. caninum* está associada a problemas reprodutivos e doença neonatal (PITEL et al., 2003) e a infecção por *N. hughesi* tem sido relatada como causa de distúrbios neurológicos (CHEADLE et al., 1999; DUBEY et al., 2001).

No Brasil, as pesquisas sobre a ocorrência de *Neospora* spp. em equinos são escassas e os estudos disponíveis têm revelado prevalências bastante variadas. Hoane et al. (2006) relataram uma prevalência de 2,5% em amostras de soro provenientes de 10 estados da Federação, Villalobos et al. (2006) relataram prevalência de 15,1% em animais residentes no estado de São Paulo e Locatelli-Dittrich et al. (2006) observaram prevalências de 30 a 47% no estado do Paraná. Trabalhos mais recentes relataram frequência de 13,8% (TOSCAN et al., 2010) e 15,4% (SANGIONI et al., 2011), ambos realizados no Rio Grande do Sul.

No Brasil não existem trabalhos relacionados ao estudo dos fatores de risco para *N. caninum* e na Região Nordeste do Brasil pouco se sabe sobre a prevalência deste parasito em equinos.

Objetivou-se estudar a prevalência e os fatores de risco associados à infecção por *Neospora caninum* em equinos criados no Estado de Alagoas, região nordeste do Brasil.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Área de estudo**

O estudo foi desenvolvido em criações de equinos situadas no Estado de Alagoas, Brasil (Figura 1). Este Estado situa-se na porção Centro-Oriental do Nordeste Brasileiro, em uma faixa intertropical, e apresenta longos períodos de irradiação solar com variação de 2200 a 2600 horas de sol distribuídas durante o ano. A temperatura é elevada durante a maior parte do ano, com variações ocorrendo entre 22°C e 28°C. Divide-se em três mesorregiões: Leste Alagoano, Agreste Alagoano e Sertão Alagoano (ASSIS et al., 2007).

A Mesorregião Leste caracteriza-se por clima tropical litorâneo úmido, com umidade relativa do ar de 79,2% e índice pluviométrico de 1.410 mm/ano. O sol impera nos meses de setembro a maio e nesse período a temperatura varia de 19°C à 32°C. Os meses de junho a agosto são representados por chuvas e a temperatura varia de 15°C à 26°C. A Mesorregião Sertão apresenta clima semi-árido, com precipitação irregular de chuvas e umidade relativa do ar baixa. A Mesorregião Agreste, por estar entre o Sertão e o Leste Alagoano, apresenta características das duas regiões (ANEXO, 2013).

### **Amostragem**

Para compor a amostra foi considerada uma prevalência esperada de 50%, com nível de confiança de 95% e erro estatístico de 5% (THRUSFIELD, 2004). Esses parâmetros indicaram uma amostra mínima de 385 animais.

Foi realizado um estudo transversal, utilizando 427 amostras de soro equino. Os animais eram de ambos os sexos, com idade acima dos 36 meses, escolhidos por conveniência e procedentes de 36 propriedades, localizadas em 23 municípios distribuídos nas Mesorregiões Leste, Agreste e Sertão do Estado de Alagoas, Brasil (Figura 1). As amostras foram coletadas por meio de venopunção jugular utilizando sistema de coleta de sangue a vácuo (BD Vacutainer®).

Os equinos eram utilizados para a reprodução com manejo de monta natural e/ou inseminação artificial, pertencentes a diferentes raças e submetidos a um manejo semi-intensivo, em criações situadas no Leste e Agreste Alagoano, e intensivo nas propriedades do Sertão. Recebiam alimentação à base de forragem verde e/ou feno, além de ração balanceada.

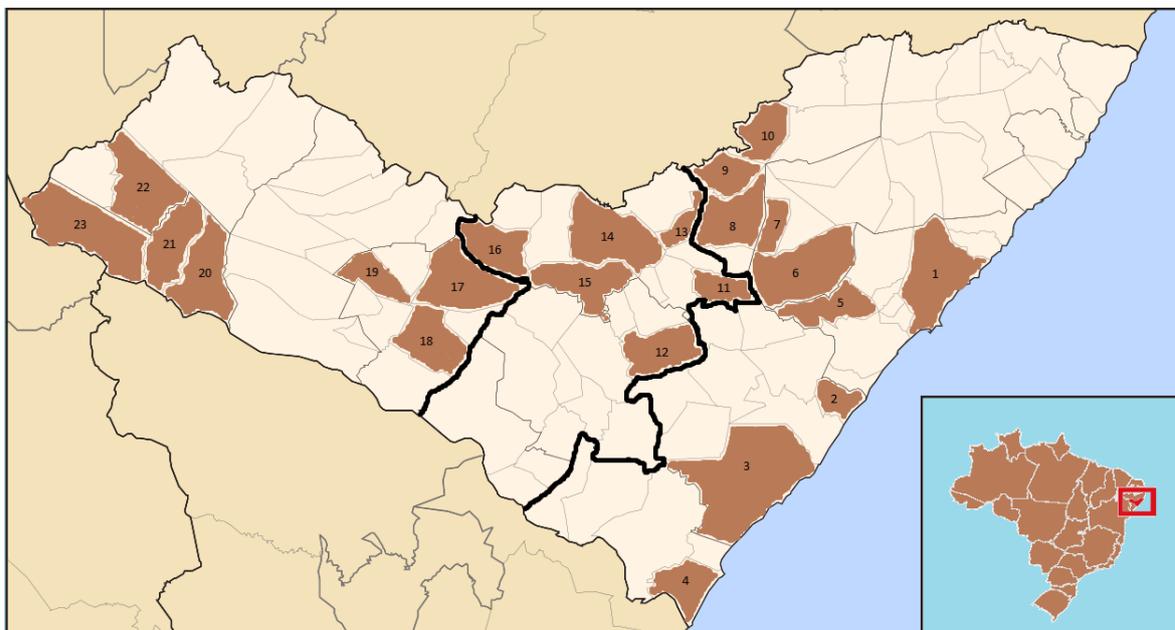


Figura 1- Distribuição dos 23 municípios estudados dentro das três Mesorregiões do Estado de Alagoas, Nordeste do Brasil (Leste: 1 - Maceió; 2 - Jequiá da Praia; 3 – Coruripe; 4 – Piaçabuçu; 5 – Pilar; 6 – Atalaia; 7 – Cajueiro; 8 – Viçosa; 9 – Chã Preta; 10 – Santana do Mundaú. Agreste: 11 – Marimbondo; 12 – Limoeiro de Anadia; 13 – Mar Vermelho; 14 – Palmeira dos Índios; 15 - Igaci; 16 – Cacimbinhas; Sertão: 17 – Major Isidoro; 18 – Batalha; 19 – Olho D’Água das Flores; 20 – Piranhas; 21 – Olho D’Água do Casado; 22 – Água Branca; 23 – Delmiro Gouveia).

## Sorologia

Para a pesquisa de anticorpos IgG contra-*Neospora caninum* foi empregada a técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), utilizando-se anticorpos anti-IgG-equino conjugado ao isotiocianato de fluoresceína da marca Sigma-Chemical®. Em todas as reações foram incluídos controle positivo e negativo previamente conhecidos. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram fluorescência total na diluição 1:50 (VARDELEON et al., 2001). As amostras positivas foram submetidas a diluições seriadas de razão dois até a

obtenção da maior diluição positiva. O título do soro foi a recíproca da maior diluição que apresentou resultado positivo.

### **Análise estatística**

Foi utilizada a análise estatística descritiva para cálculos das frequências relativa e absoluta dos resultados obtidos no teste sorológico. O estudo dos fatores de risco foi realizado por meio da aplicação de questionários investigativos, constituídos por perguntas objetivas referentes ao manejo produtivo, reprodutivo e sanitário dos animais. Para identificar os fatores de risco associados à infecção por *Neospora caninum*, foi realizada inicialmente a análise univariada das variáveis de interesse através do teste Qui-quadrado de Pearson ou Exato de Fisher quando necessário, com nível de significância de 5%. Posteriormente foi realizada uma análise de regressão logística, considerando como variável dependente o exame sorológico (positivo ou negativo). As variáveis independentes ou explanatórias consideradas no modelo foram aquelas que apresentaram significância estatística  $<0,20$ . Essa probabilidade foi estipulada para que possíveis fatores de risco do evento não fossem excluídos da análise (HOSMER e LEMESHOW, 1989). A propriedade foi considerada como foco quando foi detectado pelo menos um animal positivo. Foi utilizado o programa Epi Info, versão 3.5.1 – *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)* para a execução dos cálculos estatísticos.

## **RESULTADOS**

Das 427 amostras analisadas, 77 (18% - I.C. 14,4 – 22,1%) foram positivas na RIFI. O título 50 foi identificado em 24 (31,17%) amostras, título 100 em 28 (36,36%), 200 em 19 (24,68%), 400 em cinco (6,49%) e 800 em uma única amostra (1,3%).

Em relação ao número de focos observou-se que 26 (72,2%) propriedades apresentaram pelo menos um animal positivo. A prevalência de animais positivos nas propriedades analisadas variou de 9,1 a 100,0%.

Houve diferença significativa da prevalência entre as Mesorregiões estudadas com maior prevalência para as propriedades da Mesorregião Agreste (Tabela 1).

Tabela 1 – Análise multivariada da prevalência para a infecção por *N. caninum* em equinos por Mesorregião, Estado de Alagoas, Nordeste, Brasil.

MESORREGIÃO	RIFI		OR	Valor de p
	Positivo	Negativo		
Leste	13	196	-	
Agreste	15	22	10,28(3,94 -26,58)	0,000
Sertão	49	134	0,54 (0,24 – 1,21)	

Foram identificados como fatores de risco o acesso de outras espécies animais à fonte de água dos equinos (OR=1,84), não utilizar feno para a alimentação dos animais, (OR=3,33), a compra de animais oriundos de comércio informal (OR=8,43) e a ausência do manejo de quarentena (OR=8,70) (Tabela 3).

Tabela 2- Fatores do manejo geral e reprodutivo dos equinos na análise univariada.

VARIÁVEL	N	RIFI Positivo	ANÁLISE UNIVARIADA OR (I.C. 95%)	P
<b>Raças</b>				
Quarto-de-Milha	133	42 (31,6%)	-	
Mangalarga	150	5 (3,3%)	0,07 (0,02 – 0,20)	0,000
SRD	144	30 (20,8%)	7,63 (2,79 – 25,84)	
<b>Acesso seguro à água</b>				
Seguro (Sim)	283	42 (14,8%)		
De fácil acesso a outros animais (Não)	144	35 (24,3%)	0,54 (0,31 – 0,92)	0,012
<b>Consumo de Feno</b>				
Sim	187	17 (9,1%)		
Não	240	60 (25,0%)	0,30 (0,16 – 0,52)	<0,000
<b>Armazenamento de feno</b>				
Sim	187	17 (9,1%)		
Não	240	60 (25,0%)	0,30 (0,16 – 0,52)	<0,000
<b>Local de compra dos animais de reposição</b>				
Exposições	94	5 (5,3%)	-	
Informal	277	72 (26,0%)	6,25 (2,43 – 20,44)	<0,000
<b>Quarentena</b>				
Sim	117	4 (3,4%)		
Não	310	73 (23,5%)	0,11 (0,03 – 0,29)	<0,000
<b>Presença de cães</b>				
Sim	314	62 (19,7%)		
Não	67	3 (4,5%)	5,25 (1,62 - 26,91)	0,002
<b>Manejo Reprodutivo</b>				
Monta natural	287	62 (21,6%)		
Monta natural+I.A.	140	15 (10,7%)	2,29 (1,27 – 4,31)	0,006

OR = "Odds ratio" (razão de chances); IC = Intervalo de confiança de 95%.

Tabela 3 - Análise de regressão logística para as variáveis associadas à infecção por *N. caninum* em equinos no Estado de Alagoas, Brasil.

VARIÁVEIS	Valor de p	OR	IC 95%	Coeficiente	S.E.
<b>Acesso de outros animais à água</b>					
Não/Sim	0,017	1,84	1,11 3,04	0,611	0,256
<b>Consumo de Feno</b>					
Não/Sim	0,000	3,33	1,87 5,94	1,204	0,294
<b>Armazenam. de Feno</b>					
Não/Sim	0,000	3,33	1,87 5,94	1,204	0,294
<b>Local de compra dos animais de reposição</b>					
Exposições					
Informal	0,000	8,43	3,06 23,16	2,132	0,515
<b>Quarentena</b>					
Não/Sim	0,000	8,70	3,10 24,39	2,163	0,526

OR = "Oddsratio" (razão de chances); IC = Intervalo de confiança de 95%.

## DISCUSSÃO

A prevalência de 18% encontrada neste estudo pode ser considerada alta quando comparada aos resultados de outros trabalhos realizados no Brasil. Hoane et al. (2006) encontraram prevalência de 2,5% em amostras de equinos provenientes de dez estados brasileiros; Villalobos et al. (2006) observaram uma ocorrência de 10,3% em equinos provenientes do estado de São Paulo e Moura et al. (2013) relataram um percentual de 4,1% em amostras de equinos de duas regiões do estado de Santa Catarina, Brasil.

Em outros países, valores maiores de prevalência foram divulgados. Patitucci et al. (2004) relataram 34% em equinos de trabalho no Chile e Ciaramella et al. (2004) descreveram 28% em equinos de diferentes faixas etárias na Itália. No entanto, valores reduzidos também foram revelados fora do país, como a prevalência de 3,5% encontrada por Dangoudoubiyam et al. (2011) em animais de sete províncias da Costa Rica.

A variação na prevalência pode decorrer de vários fatores como o método sorológico, o ponto de corte utilizado, a presença de animais gestantes e a fase gestacional. Segundo Locatelli-dittrich et al. (2006), esses fatores podem influenciar na prevalência variando-a de 1 a 47%. Hoffmann Kormann et al. (2008), considerando o ponto de corte 50 observaram que o oitavo mês de gestação correspondeu na maior soroprevalência e quando considerado como ponto de corte o título 100, o 11º mês mostrou maior soroprevalência. No 9º mês

a prevalência foi considerada menor. No presente estudo adotou-se o ponto de corte 50, recomendado para pesquisas soroepidemiológicas e a presença de éguas gestantes e a idade gestacional não foram objetos da pesquisa.

A presença de distúrbios reprodutivos nos rebanhos equinos tem mostrado resultados de maior soropositividade para a infecção por *N. caninum*. O que não foi estudado na presente pesquisa. Villalobos et al. (2006), observaram uma ocorrência de 10,3% de anticorpos contra *Neospora* spp. em equinos provenientes do estado de São Paulo, e ao selecionar apenas amostras de animais com distúrbios reprodutivos, como aborto e mortalidade neonatal, a positividade elevou-se para 15,1%. Adiciona-se ainda, os resultados encontrados por Kligler et al. (2007) em Israel, relacionando maior prevalência (11,9%) de anticorpos anti-*Neospora* spp. em éguas que passaram por episódios de aborto, bem como em cavalos com distúrbios neurológicos se comparados a equinos assintomáticos.

Conforme ressaltado por Locatelli-Dittrich (2002), títulos baixos podem ocorrer em éguas que abortaram fetos infectados, o que sugere, possivelmente, a soroconversão recente ao parasito, correspondendo à fase de janela imunológica.

Conforme descrito na tabela 1, foi observada associação significativa entre a prevalência e a região estudada, sendo identificada a Mesorregião Agreste, a área geográfica que apresentou 10,28 vezes mais chances de infecção para os animais. Para Dubey et al. (2007), as condições favoráveis para a sobrevivência do agente no ambiente, são temperatura e umidade elevada. No Agreste do Estado o clima é tropical sub-úmido com variabilidade climática alternando entre quente e seco a quente e úmido, a depender da precipitação de chuvas que oscila entre 300 e 1200 mm/ano (BRASIL, 2011). No período das coletas das amostras (agosto–novembro), a região apresentava condições favoráveis à sobrevivência do parasito no ambiente.

Na presente pesquisa, a maioria das criações de equinos estudadas são semi-intensivas onde o tipo de volumoso fornecido varia de acordo com a época do ano, sendo utilizado o feno em períodos de maior estiagem e o pasto nativo na época das chuvas. Conforme observado na tabela 3, tanto o acesso de outros animais à fonte de água dos equinos (OR= 1,84), quanto o fato de não utilizar o feno na alimentação dos animais (OR= 3,33) foram identificados como fatores de risco. Dubey et al. (2007) e Dubey e Schares (2011) descreveram a contaminação

da água, da capineira e do pasto com oocistos eliminados nas fezes de cães, sendo portanto, importantes fontes de infecção para os equinos nesse tipo de manejo de criação.

Apesar de não ter sido identificada como fator de risco (regressão logística) para infecção nos rebanhos equinos estudados, a presença de cães deve ser considerada, visto que, segundo Dubey et al. (2007), a ingestão de oocistos é o único modo de transmissão horizontal pós-natal em herbívoros e a presença de cães em fazenda é o fator de risco mais importante nesse tipo de transmissão, através da ingestão de oocistos eliminados nas fezes de cães infectados.

A compra de animais oriundos de comércio informal (OR=8,43) e a ausência do manejo de quarentena (OR= 8,70) também foram identificadas como fatores de risco. Para Oliveira Filho et al. (2012), ao se introduzir novos animais em uma propriedade, devem-se adotar as devidas medidas sanitárias para que se evite a introdução de agentes infecciosos. A introdução de um animal infectado no plantel, principalmente quando utilizado para a reprodução, pode determinar a disseminação do agente no rebanho. Antonello et al. (2012) ressaltaram a transmissão vertical como forma de disseminação do parasito em equinos e reforçaram a importância do diagnóstico e controle do mesmo neste tipo de criação.

## CONCLUSÃO

Este é o primeiro relato da infecção por *Neospora caninum* em equinos criados no Estado de Alagoas, Brasil. A prevalência encontrada foi considerada alta e o elevado número de focos demonstrou que os animais estão expostos ao risco de infecção pelo agente, sendo o ambiente e a procedência dos animais os fatores que requerem cuidados quanto à disseminação do *Neospora caninum* nos rebanhos.

## REFERÊNCIAS

ANEXO: **Lista de mesorregiões de Alagoas**. Wikipédia: Enciclopédia livre. 2013. Disponível em: [http://pt.wikipedia.org/wiki/Anexo:Lista\\_de\\_mesorregi%C3%B5es\\_de\\_Alagoas](http://pt.wikipedia.org/wiki/Anexo:Lista_de_mesorregi%C3%B5es_de_Alagoas)

ANTONELLO, A. M. et al. The importance of vertical transmission of *Neospora* sp. in naturally infected horses, **Veterinary Parasitology**, n.187, p.367– 370, 2012.

ARAÚJO, T.M. et al. Erosão e progradação do litoral brasileiro – Alagoas.

**Ministério do Meio Ambiente, BRASIL**, 2012. Disponível em:

[www.mma.gov.br/estruturas/sqa\\_sigercom/.../al\\_erosao.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/sqa_sigercom/.../al_erosao.pdf)

ASSIS, J.S.; ALVES, A.L.; NASCIMENTO, M.C.. **Atlas escolar Alagoas: espaço geohistórico e cultural**. João Pessoa: Grafset, 2007. 208p.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Agrário. Secretaria de Desenvolvimento Territorial. Instituto de Assessoria para o Desenvolvimento Humano. Plano Territorial de Desenvolvimento Rural Sustentável do Agreste de Alagoas, 2011.

CIARAMELLA, P. et al. Seroprevalence of *Neospora* spp. in asymptomatic horses in Italy, **Veterinary Parasitology**, v.123, n.1-2, p.11-15, 2004.

CHEADLE, M.A. et al. 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.

DANGOUDUBIYAM, S. et al. Detection of Antibodies Against *Sarcocystis neurona*, *Neospora* spp., and *Toxoplasma gondii* in Horses From Costa Rica, **Parasitology**, v.97, n.3, p.522–524, 2011.

DUBEY, J.P. et al. Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse, **The Journal of Parasitology**, v.87, n.2, p.345-353, 2001.

DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Korean Journal of Parasitology**, v.41, p.1-16, 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. e SCHARES, G. Neosporosis in animals - The last five years, **Veterinary Parasitology**, v.180, p.90 – 108, 2011.

HOANE J.S. et al. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora* spp. infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. **Veterinary Parasitology**, v.136, p.155-159, 2006.

HOFFMANN KORMANN, D.C.S. et al. Soroprevalência e cinética mensal de anticorpos anti-*neospora* sp. em éguas gestantes, **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, Supl. 1, p.335-338, 2008.

KLINGER, E.B. et al. Seroprevalence of *Neospora* spp. among asymptomatic horses, aborted mares and horses demonstrating neurological signs in Israel, **Veterinary Parasitology**, v.148, n.2, p.109-113, 2007.

LINDSAY, D.S. Neosporosis: An emerging protozoal disease of horses. *Equine Vet. J.* 33(2):116-118.2001.

LOCATELLI-DITTRICH, R. Diagnóstico sorológico, isolamento, cultivo e caracterização molecular de *Neospora caninum* em bovinos leiteiros e em equinos no estado Paraná, Brasil. 2002. 184p. **Tese (Doutorado)** – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

LOCATELLI-DITTRICH R. et al. 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.

MOURA, A. B. de et al. *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.

OLIVEIRA FILHO, R. B. et al. Situação epidemiológica da infecção por *Toxoplasma gondii* em equídeos na microrregião do Brejo Paraibano, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol.32, p.995-1000, out, 2012.

PATITUCCI, A.N. et al. Presencia de anticuerpos sericos contra *Neospora caninum* en equinos en Chile, **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.36, n.2, p.203-206, 2004.

PITEL, P.H. et al. Investigation of *Neospora* sp. antibodies in aborted mares from Normandy, France, **Veterinary Parasitology**, v.118, p.1–6, 2003.

SANGIONI, L. A. et al. 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, fevereiro, 2011.

TOSCAN, G. et al. 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.

THRUSFIELD, M.V. **Epidemiologia Veterinária**, 2.ed., São Paulo: Roca, 556p, 2004.

VARDELEON, D. et al. Prevalence of *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from various geographical locations, **Veterinary Parasitology**, v.95, p.273-282, 2001.

VILLALOBOS, E.M.C. et al. Association between the presence of serum antibodies against *Neospora* spp. and fetal loss in equines, **Veterinary Parasitology**, v.142, p.372-375, 2006.

### **CAPÍTULO 3**

Prevalência de anticorpos anti-*Sarcocystis neurona* em equinos no Estado de Alagoas, Brasil.

## **Prevalência da infecção por *Sarcocystis neurona* em equinos no Estado de Alagoas, Nordeste do Brasil.**

**Resumo:** Objetivou-se neste estudo pesquisar a prevalência e os fatores de risco associados à infecção por *Sarcocystis neurona* em equinos criados no Estado de Alagoas, Brasil. Foram analisadas 427 amostras procedentes de 36 propriedades localizadas em 23 municípios distribuídos nas Mesorregiões Leste, Agreste e Sertão do Estado de Alagoas. O estudo dos fatores de risco foi realizado por meio da aplicação de questionários investigativos sobre o manejo produtivo, reprodutivo e sanitário dos rebanhos; posteriormente submetidos à análise estatística. O diagnóstico sorológico da infecção por *Sarcocystis neurona* foi realizado pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). A prevalência de anticorpos anti-*Sarcocystis neurona* foi de 8,0% (I.C. 5,7 – 11,1%), com equinos positivos em 52,7% das propriedades estudadas. Foi encontrada correlação significativa entre a presença de anticorpos anti-*Sarcocystis neurona* e o fato de não utilizar animais de outras propriedades no manejo reprodutivo do rebanho ( $p=0,032$ ;  $OR=2,38$ ;  $IC=1,07-5,28$ ). Este é o primeiro relato da infecção por *Sarcocystis neurona* em equinos criados no Estado de Alagoas, Brasil. Os resultados obtidos no presente estudo indicam que os equinos do Estado de Alagoas estão expostos ao risco de infecção por *Sarcocystis neurona*. Destaca-se aqui a importância de melhorar os cuidados com as novas aquisições de animais e com o manejo do ambiente para reduzir o risco de infecção.

**Palavras-chave:** Mieloencefalite Protozoária Equina, diagnóstico, epidemiologia.

## INTRODUÇÃO

*Sarcocystis neurona* é um coccídeo do filo Apicomplexa, pertencente à família Sarcocystidae, cujo gambá (*Didelphis virginiana*) é o hospedeiro definitivo na América do Norte e o *Didelphis albiventris*, na América do Sul, além de uma variedade de outros mamíferos que atuam como hospedeiros intermediários (DUBEY et al., 2001a; REJMANEK et al., 2009; REJMANEK et al., 2010). É considerado o principal agente causador de Mieloencefalite Protozoária Equina (MEP), síndrome neurológica que acomete os cavalos e que apresenta ampla distribuição no continente americano (DUBEY et al., 2001b).

A doença causa morbidade significativa em equinos e impacto econômico à indústria do cavalo resultante do tratamento e prevenção da doença (COHEN et al., 2007). Apesar da sua importância econômica, ainda são poucos os estudos sobre a prevalência e os fatores de risco para a infecção por *S. neurona* em equinos na América do Sul, sendo relatadas prevalências de 35,5% na Argentina (DUBEY et al., 1999) e 69,6% no Brasil (HOANE et al., 2006); este último utilizando amostras de animais provenientes de cinco regiões do país (Sul, Sudeste, Norte, Nordeste e Centro-oeste).

A escassez de dados envolvendo a infecção por este agente em cavalos na região Nordeste do Brasil motivou a realização deste estudo uma vez que são observados casos clínicos sugestivos desta enfermidade em cavalos que podem estar associados a este agente. Objetivou-se estudar a prevalência e os fatores de risco associados à infecção por *Sarcocystis neurona* em equinos criados no Estado de Alagoas, Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Área de estudo

O estudo foi desenvolvido em criações de equinos situadas no Estado de Alagoas, Brasil (Figura 1). Este Estado situa-se na porção Centro-Oriental do Nordeste Brasileiro, em uma faixa intertropical, e apresenta longos períodos de irradiação solar com variação de 2200 a 2600 horas de sol distribuídas durante o

ano. A temperatura é elevada durante a maior parte do ano, com variações ocorrendo entre 22°C e 28°C. Divide-se em três mesorregiões: Leste Alagoano, Agreste Alagoano e Sertão Alagoano (ASSIS et al., 2007).

A Mesorregião Leste caracteriza-se por clima tropical litorâneo úmido, com umidade relativa do ar de 79,2% e índice pluviométrico de 1.410 mm/ano. O sol impera nos meses de setembro a maio e nesse período a temperatura varia de 19°C à 32°C. Os meses de junho a agosto são representados por chuvas e a temperatura varia de 15°C à 26°C. A Mesorregião Sertão apresenta clima semi-árido, com precipitação irregular de chuvas e umidade relativa do ar baixa. A Mesorregião Agreste, por estar entre o Sertão e o Leste Alagoano, apresenta características das duas regiões (ANEXO, 2013).

### **Amostragem**

Para compor a amostra foi considerada uma prevalência esperada de 50%, com nível de confiança de 95% e erro estatístico de 5% (THRUSFIELD, 2004). Esses parâmetros indicaram uma amostra mínima de 385 animais.

Foi realizado um estudo transversal, utilizando 427 amostras de soro equino. Os animais eram de ambos os sexos, com idade acima dos 36 meses, escolhidos por conveniência e procedentes de 36 propriedades, localizadas em 23 municípios distribuídos nas Mesorregiões Leste, Agreste e Sertão do Estado de Alagoas, Brasil (Figura 1). As amostras foram coletadas por meio de venopunção jugular utilizando sistema de coleta de sangue a vácuo (BD Vacutainer®).

Os equinos eram utilizados para a reprodução com manejo de monta natural e/ou inseminação artificial, pertencentes a diferentes raças e submetidos a um manejo semi-intensivo, em criações situadas no Leste e Agreste Alagoano, e intensivo nas propriedades do Sertão. Recebiam alimentação à base de forragem verde e/ou feno, além de ração balanceada.

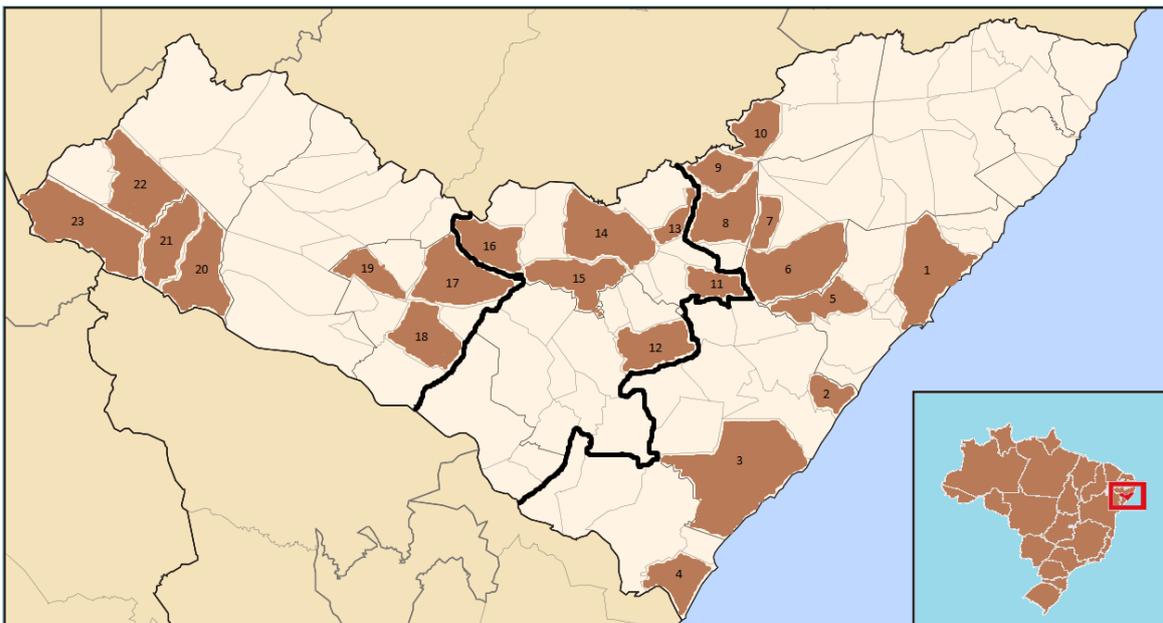


Figura 1- Distribuição dos 23 municípios estudados dentro das três Mesorregiões do Estado de Alagoas, Nordeste do Brasil (Leste: 1 - Maceió; 2 - Jequiá da Praia; 3 – Coruripe; 4 – Piaçabuçu; 5 – Pilar; 6 – Atalaia; 7 – Cajueiro; 8 – Viçosa; 9 – Chã Preta; 10 – Santana do Mundaú. Agreste: 11 – Marimondo; 12 – Limoeiro de Anadia; 13 – Mar Vermelho; 14 – Palmeira dos Índios; 15 - Igaci; 16 – Cacimbinhas; Sertão: 17 – Major Isidoro; 18 – Batalha; 19 – Olho D’Água das Flores; 20 – Piranhas; 21 – Olho D’Água do Casado; 22 – Água Branca; 23 – Delmiro Gouveia).

## Sorologia

Para a pesquisa de anticorpos IgG contra-*Sarcocystis neurona* foi empregada a técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), utilizando-se anticorpos anti-IgG-equino conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Chemical®). Em todas as reações foram incluídos controle positivo e negativo previamente conhecidos. Para a interpretação dos resultados foi considerado como ponto de corte a diluição 1:20 para a triagem, segundo Duarte et al. (2004). As amostras positivas foram submetidas a diluições seriadas de razão dois até a obtenção da maior diluição positiva. O título do soro foi a recíproca da maior diluição que apresentou resultado positivo.

## **Análise estatística**

Foi utilizada a análise estatística descritiva para cálculos das frequências relativa e absoluta dos resultados obtidos no teste sorológico. O estudo dos fatores de risco foi realizado por meio da aplicação de questionários investigativos, constituídos por perguntas objetivas referentes ao manejo produtivo, reprodutivo e sanitário dos animais. Para identificar os fatores associados à infecção por *Sarcocystis neurona*, inicialmente foi realizada uma análise univariada das variáveis de interesse através do teste Qui-quadrado de Pearson, ou Exato de Fisher, quando necessário, com nível de significância de 5%. Posteriormente, foi feita uma análise multivariada utilizando o modelo de regressão logística, considerando como variável dependente o status sorológico do animal (positivo ou negativo). As variáveis independentes ou explanatórias consideradas no modelo foram aquelas que apresentaram significância estatística  $<0,20$ . Essa probabilidade foi estipulada para que possíveis fatores de risco do evento não sejam excluídos da análise (HOSMER e LEMESHOW, 1989). A propriedade foi considerada como foco quando foi detectado pelo menos um animal positivo. Para a execução dos cálculos estatísticos foi utilizado o programa Epi Info, versão 3.5.1 – *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*.

## **RESULTADOS**

Das 427 amostras analisadas, 34 (8% - I.C. 5,7 – 11,1%) foram positivas na RIFI. O título 20 foi identificado em sete (20,6%) amostras, título 40 em 15 (44,1%), 80 em oito (23,5%), 160 em três (8,9%) e 320 em uma amostra (2,9%). Em relação ao número de focos observou-se que 19 (52,7%) propriedades apresentaram pelo menos um animal positivo. A prevalência de animais positivos nas propriedades analisadas variou de 4,5 a 50,0%.

Não houve diferença significativa para a soroprevalência entre as Mesorregiões estudadas, porém a Mesorregião Leste apresentou a maior prevalência (11%) quando comparada com as demais (Tabela 1).

Tabela 1 - Análise multivariada da prevalência para a infecção por *Sarcocystis neurona* em equinos por Mesorregião, Estado de Alagoas, Nordeste, Brasil.

MESORREGIÃO	RIFI		OR	Valor de p
	Positivo	Negativo		
Leste	23 (11,0%)	186		
Agreste	02 (5,4%)	35	0,46 (0,05 – 2,02)	p= 0,162
Sertão	11 (6,01%)	172	1,12 (0,23- 10,83)	

Na análise univariada, os fatores que apresentaram associação significativa com a presença da infecção foram: compra de novos animais em Feiras/Exposições (16%), não utilizar animais de outra propriedade (12,6%) e a aquisição de reprodutores nos últimos cinco anos (10,6%), assim como a ausência de cães nas propriedades (16,4%) (Tabela 2).

Tabela 2 - Fatores do manejo geral dos equinos pesquisados na análise univariada para a associação com a infecção por *Sarcocystis neurona*.

VARIÁVEL	N	RIFI Positivo	ANÁLISE UNIVARIADA		P
			OR	(I.C. 95%)	
<b>Consumo de Feno</b>					
Sim	187	19 (10,2%)	1,69	(0,78 – 3,69)	0,097
Não	240	15 (6,3%)			
<b>Armazenamento de Feno</b>					
Sim	187	19 (10,2%)	1,69	(0,78 – 3,69)	0,097
Não	240	15 (6,3%)			
<b>Local de compra de novos animais</b>					
Feiras/ Exposições	94	15 (16,0%)	-		
Outros	277	16 (5,8%)	0,32	(0,14 – 0,74)	0,005
Ambos	56	3 (5,4%)	0,92	(0,17 – 3,37)	
<b>Presença de cães</b>					
Sim	360	23 (6,4%)	0,35	(0,15 – 0,84)	0,005
Não	67	11 (16,4%)			
<b>Presença de gambá</b>					
Sim	147	9 (6,1%)	0,66	(0,26 – 1,52)	0,205
Não	280	25 (8,9%)			
<b>Utiliza animais de outra propriedade para a reprodução</b>					
Sim	324	21 (6,5%)	0,47	(0,21 – 1,08)	0,040
Não	103	13 (12,6%)			
<b>Aquisições de garanhões nos últimos 5 anos</b>					
Sim	274	29 (10,6%)	3,50	(1,29 – 11,92)	0,004
Não	153	5 (3,3%)			

OR = "Odds ratio" (razão de chances); IC = Intervalo de confiança de 95%.

A utilização de animais do próprio haras para o manejo reprodutivo foi identificada como fator de risco na regressão logística, correspondendo a 2,38 vezes mais chances de infecção por *S. neurona* (Tabela 3).

Tabela 3 – Análise de regressão logística dos fatores de risco associados à infecção por *Sarcocystis neurona* em equinos no Estado de Alagoas.

VARIÁVEIS	Valor de p	OR	IC 95%	Coefficiente	S.E.	
<b>Utiliza animais de outra propriedade para reprodução</b>						
Sim/Não	0,032	2,38	1,07	5,28	0,868	0,406

## DISCUSSÃO

A prevalência encontrada foi considerada baixa quando comparada aos índices de 35,5% e 35,6% descritos anteriormente na Argentina e no Brasil, respectivamente (DUBEY et al., 1999a e b) e ao percentual de 69,6% encontrado por Hoane et al. (2006) em estudo feito com amostras de dez estados brasileiros. Mais recentemente, uma prevalência de 42,2% foi relatada em equinos da Costa Rica (DANGOUDOUBIYAM et al., 2011).

Altas prevalências também foram relatadas na Europa, como 36% na França (PITEL et al., 2003) e 80% na Espanha (ARIAS et al., 2012). Nos Estados Unidos, onde maiores esforços foram empreendidos no estudo da MEP, pesquisas mostraram que 32% a 89% dos animais testados foram positivos, apesar da doença clínica se apresentar em menos de 1% dos animais (TILLOTSON et al., 1999; BENTZ et al., 2003).

As variações na prevalência são justificadas pelo uso de animais de diferentes idades e estado de saúde (HOANE et al., 2006), além de variações nas práticas de manejo (SAVILLE et al., 2000). Neste trabalho, a utilização de animais adultos, sem doença aparente e criados em propriedades que seguiam boas práticas de manejo, pode ter contribuído para a baixa prevalência encontrada quando comparada à literatura.

No presente estudo, apesar de não ter sido observada diferença significativa entre a prevalência e a mesorregião pesquisada, as maiores prevalências ocorreram nos municípios da mesorregião Leste do Estado de Alagoas, região de clima tropical com moderado índice pluviométrico, temperatura que varia entre 25 a 28°C e umidade relativa alta durante todo o ano (ARAÚJO et

al., 2012). Saville et al. (2000) identificaram em estudo na Califórnia, EUA, que o risco de ocorrência de EPM foi três vezes maior nos períodos de primavera e verão e seis vezes maior no outono.

Saville et al. (2000) relataram ainda, a importância do período de competições esportivas sob efeito sazonal da doença, para o surgimento de maior número de casos, bem como, um risco maior da ocorrência de MEP em propriedades onde havia a circulação de gambás e onde existia reservatórios de água naturais ou rios.

Apesar de não ter sido identificada associação entre a presença de gambás e a infecção neste estudo (Tabela 2), existe a possibilidade de contaminação do ambiente com oocistos eliminados nas fezes desses animais, uma vez que nas regiões estudadas é frequente o relato de gambás nas propriedades. De acordo com Fenger et al. (1995), os cavalos se infectam através da ingestão de esporocistos presentes no alimento.

No Brasil, as duas espécies de gambás encontradas são o *Didelphis albiventris*, gambá de orelha branca e o *D. marsupialis*, gambá de orelha preta (CABRERA e YEPES, 1960). Segundo Persson (1993), entre as duas espécies, *D. albiventris* é uma das poucas espécies nativas que suportam um grau elevado de antropização, apresentando maior ocorrência em ambiente urbano e de acordo com Dubey et al. (2001) é considerado hospedeiro definitivo competente do *Sarcocystis neurona*.

A ausência de cães nas propriedades apresentou associação significativa com a infecção na análise univariada (Tabela 2). A ausência dos cães pode aumentar a circulação e permanência dos gambás nas propriedades, contaminando o ambiente e os alimentos, favorecendo a infecção.

O tipo de teste sorológico e o ponto de corte utilizado também podem influenciar nas variações da prevalência. Mesmo considerando o teste de *Western Blot* (WB) como padrão para o diagnóstico de infecção por *S. neurona*, Duarte et al. (2003) obtiveram melhor precisão global com a utilização da RIFI, quando comparada a este teste no diagnóstico de MEP em animais da Califórnia, Estados Unidos.

Quanto à escolha do ponto de corte, Duarte et al. (2003) ressaltaram a importância de basear-se na finalidade do teste, na prevalência da doença e nos custos do exame, visto que, a utilização de um ponto de corte mais alto maximiza

a especificidade do teste, enquanto que menores títulos de corte maximizam a sua sensibilidade.

No presente estudo, o fato de não utilizar animais de outras propriedades no manejo reprodutivo do rebanho revelou 2,38 vezes mais chances de infecção dos animais (Tabela 3). *Sarcocystis neurona* não é transmitido por via reprodutiva e desta forma, sugere-se que a introdução e manutenção da infecção nos rebanhos pode estar associada à aquisição de animais já infectados de outras propriedades, visto que, novas aquisições de reprodutores nos últimos cinco anos, realizadas em Feiras/Exposições apresentaram associação significativa com a prevalência nas criações (Tabela 2).

Mesmo não identificando outros fatores de risco para a infecção nessa pesquisa, a participação de fatores relacionados ao manejo e ao ambiente não deve ser descartada na epidemiologia da infecção. Para Saville et al. (2000) o mau armazenamento de feno (OR=3,1), a estação do ano (primavera OR=3,1/ verão OR=3,2, outono OR=6,0) e eventos estressantes anteriores, como corridas, reprodução ou doenças (OR=10,0), podem favorecer a infecção e o surgimento de equinos doentes.

## CONCLUSÃO

Este é o primeiro relato da infecção por *Sarcocystis neurona* em equinos criados no Estado de Alagoas, Brasil. Apesar da baixa prevalência, o agente encontra-se disseminado nos rebanhos, diante do elevado número de focos identificados. Destaca-se aqui a importância de melhorar os cuidados com a aquisição de novos animais e o manejo do ambiente para reduzir o risco de infecção.

## REFERÊNCIAS

ANEXO: **Lista de mesorregiões de Alagoas**. Wikipédia: Enciclopédia livre. 2013. Disponível em: [http://pt.wikipedia.org/wiki/Anexo:Lista\\_de\\_mesorregi%C3%B5es\\_de\\_Alagoas](http://pt.wikipedia.org/wiki/Anexo:Lista_de_mesorregi%C3%B5es_de_Alagoas)

ARAÚJO, T.M. et al. Erosão e progradação do litoral brasileiro – Alagoas. **Ministério do Meio Ambiente, BRASIL**, 2012. Disponível em: [www.mma.gov.br/estruturas/sga\\_sigercom/.../al\\_erosao.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/sga_sigercom/.../al_erosao.pdf)

ARIAS, M. et al. Exposure to *Sarcocystis* spp. in horses from Spain determined by Western blot analysis using *Sarcocystis neurona* merozoites as heterologous antigen. **Veterinary Parasitology**, v.185, p.301–304, 2012.

ASSIS, J.S.; ALVES, A.L.; NASCIMENTO, M.C.. **Atlas escolar Alagoas: espaço geohistórico e cultural**. João Pessoa: Grafset, 2007. 208p.

BENTZ, B.G. et al. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in equids residing in Oklahoma. **The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.15, p.597–600, 2003.

CABRERA, A.; YEPES, J. **Mamíferos Sulamericanos. Vida, costumes y descripción**. 2.ed. Buenos Aires: Ediar, v.1, 1960, 370p.

COHEN, N. D. et al. A multicenter case-control study of risk factors for equine protozoal myeloencephalitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.231, n.12, December 15, 2007.

DANGOUDUBIYAM, J. B. et al. Detection of Antibodies Against *Sarcocystis neurona*, *Neospora* spp., and *Toxoplasma gondii* in Horses From Costa Rica. **Journal of Parasitology**, v.97, n.3, p. 522–524, 2011.

DUARTE, P.C. et al. Comparison of a serum indirect fluorescent antibody test with two Western blot tests for the diagnosis of equine protozoal myeloencephalitis **The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.15, p.8–13, 2003.

DUARTE, P. C. et al. Evaluation and comparison of an indirect fluorescent antibody test for detection of antibodies to *Sarcocystis neurona*, using serum and cerebrospinal fluid of naturally and experimentally infected, and vaccinated horses. **Journal of Parasitology**, v.90, n.2, p.379-386, 2004.

DUBEY, J.P. et al. Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses from Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.86, p.59–92, 1999a.

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*, v. 215, p.970–2, 1999b.

DUBEY, J.P. et al. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM), **Veterinary Parasitology**. v. 95, p.89 -131, 2001a.

DUBEY, J.P. et al. First isolation of *Sarcocystis neurona* from the South American opossum, *Didelphis albiventris*, from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.95, p.295–304, 2001b.

DUBEY, J. P. et al. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, v.95, n. 2-4, p. 89-131, 2001.

FENGER, C.K. et al. Identification of opossums (*Didelphis virginiana*) as the putative definitive host of *Sarcocystis neurona*. **Journal of Parasitology**, v.81, p.916-9, 1995.

HOANE J.S. et al. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora* spp. infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. **Veterinary Parasitology**, v.136, p.155-159, 2006.

HOSMER, D.W.; LEMESHOW, S. **Applied Logistic Regression**, 2.ed., New York: Wiley Interscience, 1989.

PERSSON, V.G. **Mamíferos terrestres**. In: SÁ, R.F.R. de; WANDEMBRUCK, A.; SCHERER NETO, P.; LANGE, R.R. eds.: Curso sobre fauna urbana de Curitiba, Curitiba: Universidade Livre do Meio Ambiente, 1993, 61p.

PITEL, P.H. et al. Reactivity against *Sarcocystis neurona* and *Neospora* by serum antibodies in healthy French horses from two farms with previous equine protozoal myeloencephalitis-like cases. **Veterinary Parasitology**, v.111, p.1–7, 2003.

REJMANEK, D. et al. Prevalence and risk factors associated with *Sarcocystis neurona* infections in opossums (*Didelphis virginiana*) from central California. **Veterinary Parasitology**, v.166, n.1-2, p. 8-14, 2009.

REJMANEK, D. A. et al. Molecular characterization of *Sarcocystis neurona* strains from opossums (*Didelphis virginiana*) and intermediate hosts from Central California. **Veterinary Parasitology**, v.170, n.1-2, p. 20-29, 2010.

SAVILLE, W. et al. Analysis of risk factors for the development of equine protozoal myeloencephalitis in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.217, n.8, October 15, 2000.

THRUSFIELD, M.V. **Epidemiologia Veterinária**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2004. 556p.

TILLOTSON, K. et al. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in northern Colorado. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.19, p.122–126, 1999.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesse estudo comprovam a presença das infecções por *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis neurona* em equinos do Estado de Alagoas, onde a contaminação do ambiente e a ausência de cuidados na compra de animais apresentam-se como fatores facilitadores na introdução e manutenção dos agentes dentro dos rebanhos. Medidas sanitárias de prevenção e controle destes agentes infecciosos devem ser incentivadas visando à adoção de um programa sanitário eficiente para os rebanhos equinos no Estado Alagoas, Brasil. A temática desta pesquisa necessita de mais estudos, principalmente no que se refere às consequências produtivas das infecções nos equinos e a padronização de provas de diagnóstico para o conhecimento da real situação das infecções nesta espécie.

## ANEXO

### Questionário Investigativo

#### Fatores de Risco Associados ao Desempenho Produtivo e Reprodutivo em Haras do Estado de Alagoas

Nome da propriedade:  
 Proprietário:  
 Telefone:  
 Município:  
 Data:

#### DADOS GERAIS DA PROPRIEDADE

- 1) Número de matrizes do rebanho:
- 2) Número total de animais:
- 3) Raça dos animais:

- 4) A propriedade possui energia elétrica?**  
 a) Sim                      b) Não

- 5) Qual o sistema de criação utilizado?**  
 a) Intensivo  
 b) Extensivo  
 c) Semi-intensivo

- 6) Qual a origem da água fornecida aos animais?**  
 a) Parada  
 b) Corrente

- 6.1) Em caso de água parada, responda:**  
 a) Segura  
 b) De fácil acesso a outros animais

- 7) Os animais consomem concentrados?**  
 a) Sim                      b) Não

- 8) Qual a origem da ração?**  
 a) Fabricação interna  
 b) Ração comercial

- 9) Tipo de armazenamento da ração?**  
 a) Sacaria  
 b) A granel

- 10) Os animais consomem feno?**  
 a) Sim                      b) Não

- 11) Qual a origem do feno?**  
 a) Fabricação interna  
 b) Compra

- 12) Tipo de armazenamento do feno?**  
 a) Galpões fechados com estrados  
 b) Locais abertos

- 13) Existe criação de outras espécies na propriedade?**  
 a) Sim                      b) Não

- 14) Dispõe de serviço veterinário?**  
 a) Sim                      b) Não

- 15) Empregados da propriedade?**  
 a) Familiares  
 b) Contratados

#### MANEJO SANITÁRIO

- 1) Realiza vermifugação?**  
 a) Sim                      b) Não

- 2) Realiza vacinação?**  
 a) Sim, quais?  
 b) Não

- 3) Tipo de Bebedouros?**  
 a) Individuais  
 b) Coletivos

- 4) Os bebedouros são comuns para jovens e adultos?**  
 a) Sim                      b) Não

- 5) Qual o tipo de cocho?**  
 a) Individual  
 b) Coletivo

- 6) Os comedouros são comuns para jovens e adultos?**  
 a) Sim                      b) Não

- 8) Qual a origem dos animais de reposição?**  
 a) Própria haras  
 b) Propriedades vizinhas  
 c) Outros Municípios e/ou Estados

- 9) Nas novas aquisições oriundas de fora utiliza-se:**  
 a) Feiras ou exposições  
 b) Negociações extra eventos

- 10) Quando importa animais realiza quarentena?**  
 a) Não  
 b) < 1 mês  
 c) > 1 mês

**11) Na aquisição de animais realiza exames?**

- a) Sim                    b) Não

**12) Realiza limpeza das instalações?**

- a) Não  
b) Raramente  
c) Periodicamente

**12) Desinfeta as instalações?**

- a) Não  
b) Desinfetantes físicos  
d) Desinfetantes químicos

**13) Realiza vazio sanitário?**

- a) Não  
b) < 15 dias    c) > 15 dias

**14) Utiliza esterqueira?**

- a) Sim                    b) Não

**15) Qual o destino das fezes?**

- a) Comercialização  
b) Utilização na própria propriedade

**16) Existe contaminação com fezes nos alimentos fornecidos aos animais?**

- a) Sim                    b) Não

**17) Qual a taxa de mortalidade no plantel?**

- a) Não sabe  
b) Abaixo de 10%  
c) Entre 10,1 e 50%  
e) Acima de 50%

**18) Existem animais com sintomas reprodutivos?**

- a) Sim                    b) Não

**19) Ocorrem abortos?**

- a) Sim                    b) Não

**20) Qual o destino dos animais que apresentaram estes distúrbios?**

- a) Descarte  
b) Comércio  
c) Ainda estão na propriedade

**21) Os animais suspeitos de doenças permanecem juntos ao restante do plantel?**

- a) Sim    b) Não

**22) Os tratadores que lidam com estes animais, cuidam do restante do plantel?**

- a) Sim                    b) Não

**MANEJO REPRODUTIVO****1) Qual o tipo de manejo reprodutivo do rebanho?**

- a) Monta natural  
b) Inseminação artificial  
c) Os dois métodos

**2) Utiliza sêmen refrigerado?**

- a) Sim                    b) Não

**3) Utiliza animais de outra propriedade?**

- a) Sim                    b) Não

**4) Disponibiliza seus reprodutores para outras propriedades?**

- a) Sim                    b) Não

**5) Comercializa sêmen para outros haras?**

- a) Sim                    b) Não

**6) Houve casos de aborto na propriedade?**

- a) Não  
b) Entre 1 a 10 casos  
c) Entre 11 a 20 casos  
d) Acima de 20 casos

**7) Qual o período de ocorrência dos abortos?**

- a) Começo  
b) Meio  
c) Fim

**8) Qual o destino dos produtos do aborto?**

- a) Consumido por outros animais  
b) Queimado  
c) Enterrado  
d) Descartados no ambiente

**9) Introduziu matrizes no rebanho nos últimos 5 anos?**

- a) Sim                    b) Não

**10) Introduziu reprodutores no rebanho nos últimos 5 anos?**

- a) Sim                    b) Não

**11) Os potros consomem colostro?**

- a) Sim                    b) Não

**DADOS SOBRE A PRESENÇA DE FELINOS E CANINOS NA PROPRIEDADE****1) Quantos gatos domésticos existem na propriedade?**

- a) Não há  
b) < 5  
b) > 5

**2) Existe a circulação de cães e gatos na propriedade?**

- a) Sim                    b) Não

**3) Há circulação de animais silvestres?**

- a) Sim                    b) Não

**4) Qual a alimentação dos gatos?**

- a) Ração
- b) Vísceras de animais abatidos

**5) Os gatos têm acesso à água consumida pelo plantel?**

- a) Sim b) Não

**7) Os gatos transitam nos depósitos ou fábricas de ração e/ou feno?**

- a) Sim b) Não

**8) Os gatos se alimentam de restos placentários?**

- a) Sim b) Não

**9) Há cães na propriedade?**

- a) Sim b) Não

**10) Quantos cães?**

- a) < 5
- b) > 5

**11) Os cães transitam na fábrica ou depósito de ração e/ou feno?**

- a) Sim b) Não

**DADOS SOBRE A PRESENÇA DE ROEDORES NA PROPRIEDADE****1) É comum a presença de ratos domésticos e/ou silvestres na propriedade?**

- a) Sim b) Não

**2) Os ratos têm acesso à água consumida pelo plantel?**

- a) Sim b) Não

**3) Os ratos transitam nos depósitos ou fábricas de ração e/ou feno?**

- a) Sim b) Não

**DADOS SOBRE A PRESENÇA DE MARÇUPIAIS (CAÇACO) NA PROPRIEDADE****1) É comum a presença de caçacos na propriedade?**

- a) Sim b) Não

**2) Os caçacos têm acesso aos cochos de alimentação?**

- a) Sim b) Não

**3) Os caçacos transitam nos depósitos ou fábricas de ração e/ou feno?**

- a) Sim b) Não

