

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TESE

FATORES ASSOCIADOS A BÚFALOS SORORREAGENTES A
***Neospora caninum* (APICOMPLEXA: TOXOPLASMATINAE) NO**
ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL

GIDEÃO DA SILVA GALVÃO

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

FATORES ASSOCIADOS A BÚFALOS SORORREAGENTES A *Neospora caninum*
(APICOMPLEXA: TOXOPLASMATINAE) NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO,
BRASIL

GIDEÃO DA SILVA GALVÃO

Sob a orientação do Professor

Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes

e Co-orientação de

Dr. Walter Flausino

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2014

636.208969

G182f

T

Galvão, Gideão da Silva, 1980-
Fatores associados a búfalos
sororreagentes a *Neospora caninum*
(Apicomplexa: Toxoplasmatinae) no Estado do
Rio de Janeiro, Brasil / Gideão da Silva
Galvão. - 2014.
121 f.: il.

Orientador: Carlos Wilson Gomes Lopes.
Tese (doutorado) - Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias, 2014.
Bibliografia: f. 36-52.

1. Búfalo - Parasito - Teses. 2. Búfalo
- Parasito - Rio de Janeiro (Estado) -
Teses. 3. Protozoário - Teses. I. Lopes,
Carlos Wilson Gomes, 1947-. II.
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. III. Título.

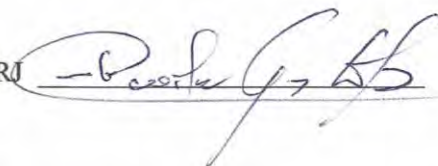
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

GIDEÃO DA SILVA GALVÃO

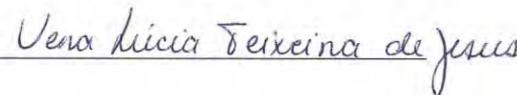
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

TESE APROVADA EM 27/02/2014

Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes, PhD, LD - UFRRJ



Dra. Vera Lúcia Teixeira de Jesus, DSc – UFRRJ



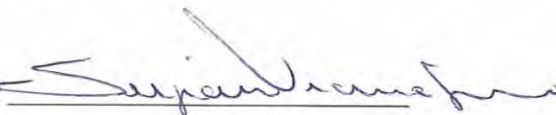
Dr. Bruno Pereira Berto, DSc – UFRRJ



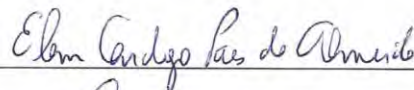
Dr. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira, PhD - UENF




Dr. Sergian Vianna Cardozo, DSc - UNIGRANRIO



Dra. Elan Cardozo Paes de Almeida, DSc - UFF



Dr. Walter Flausino, PhD – UFRRJ



DEDICATÓRIA

A Deus, o Senhor e Autor da minha vida.

Aos meus pais, Antonio Sampaio Galvão (in memorian) e Gessi da Silva Galvão, por ter tido a visão pedagógica, iniciando com meus irmãos a possibilidade de hoje eu chegar aqui.

Aos meus irmãos Gidelvan da Silva Galvão (sempre presente em minha vida acadêmica, um pai para mim), Geilton da Silva Galvão (in memorian),

Marlêde Galvão Malta, Betânia da Silva Galvão e Manoel Ramos da Silva Neto, por toda ajuda, prestabilidade e direcionamento, bem como por todo o carinho e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Dr. **Alexandre Dias Munhoz**, grande amigo e incentivador, que abriu portas permitindo que hoje eu aqui estivesse; orientador e amigo que me ajudou durante a graduação e mestrado, tornando esse momento hoje possível.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho, em especial, ao Dr. **Carlos Wilson Gomes Lopes** do Laboratório de Coccídios e Coccidioses (LCC), Projeto Sanidade Animal (PSA) (Embrapa/UFRRJ), Departamento de Parasitologia Animal (DPA), UFRRJ, pela orientação, amizade, confiança, conversas descontraídas e pelo privilégio de ser seu orientado, me orgulho de ter tido a possibilidade de ter conhecido uma pessoa com tamanha sabedoria e simplicidade, fico agradecido por ter dividido comigo um pouco de sua experiência e vasto conhecimento profissional.

Aos Drs. do LCC, DPA, UFRRJ: **Walter Flausino** pela co-orientação, amizade, auxílio técnico e principalmente pelo suporte nos primeiros momentos, em que aqui estava chegando e me adaptando, bem como todo o suporte de campo para execução desse trabalho e a **Walter Leira Teixeira Filho**, pela amizade, companheirismo, auxílio técnico e científico; a vocês dois meu muito obrigado.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, em especial a **Maria Julia Salim Pereira** pelos ensinamentos dentro e fora de sala de aula, pelo exemplo de profissionalismo e por ter sido uma pessoa importante na minha formação acadêmica.

Aos colegas do LCC: os já doutores **Gilberto Flausino**, **Cleide Domingues Coelho**, **Bruno Pereira Berto**, **Gisele Santos de Meireles**, **Landreani Ramirez Gonçalves**; aos doutorandos contemporâneos e colegas de turma **Paulo Daniel Sant'Anna Leal**, **Lianna Maria de Carvalho Balthazar**, **Caroline Spitz dos Santos**, **Bruno do Bomfim Lopes**; aos mestrandos, **Mônica Mateus Florião** e **Tassia Torres Furtado**, bem como também aos ex-bolsistas de iniciação científica que convivi **Roberto Laureano Melo**, **Natália Mello Pereira da Silva**, **Jhonata Gramião Belini**, por toda compreensão, amizade, pelos momentos de descontração e por todo tipo de ajuda... Pelo ouvido amigo e por toda paciência. Em especial

agradeço aos colegas de equipe LCC doutorandos, irmãos de doutorado que o tempo e as atividades acadêmicas/profissionais/pessoais fizeram questão de nos separar, mas que para sempre estarão presentes em minhas recordações: **Janaína da Soledad Rodrigues** e **Ulisses Jorge Pereira Stelmann**, que o destino nos reserve sempre bons momentos.

Aos colegas e amigos do CPGCV **Cassio Nascimento Florêncio**, **Wendell Marcelo de Souza Perinotto**, **Hermes Ribeiro Luz**, **Fábio Edir Macedo**, **Caio Marcio de Oliveira Monteiro**, **Cristiane Nunes Coelho da Rocha**, **Fabício Nascimento Gaudêncio**, **Marcus Sandes Pires**, **Rafaella Câmara Teixeira**, **Pedro Ivan Fazio Junior**, **Sabrina Rita da Fonseca Rezende**, **Isabela Helena Ferreira Leite**, **Ana Paula de Aragão Gama** e **Gabriel Alves Landulfo** obrigado por tornarem alguns momentos mais leves; em especial agradeço a **Maria Clara da S. N. Botelho** por ter sido muito mais que uma grande amiga, e por se fazer presente nos melhores momentos que tive por aqui durante estes quatro anos.

Agradeço a todos os colegas que convivi no alojamento da pós-graduação da UFRRJ, em especial aos amigos **Henrique Trevisan**, **Francisco Eduardo Aragão Catunda Júnior**, **Juliano Tiago de Paula**, **Antônio Amelia dos Santos Mucalane Tembue**, **Everton Behrmann Araújo**, pelos conselhos e pelo companheirismo; valendo também mencionar o mascote do alojamento **Billy “The kid”** amigo cachorro, companheiro de algumas madrugadas durante a construção da parte escrita.

Aos meus sobrinhos **Esdras Gusmão Galvão** e **Irlan Gusmão Galvão** pelo carinho e admiração de sempre... admiração que é recíproca! Vocês sempre se fizeram presentes nestes anos de distância física com um telefonema, mensagens e arquivos de mídia compartilhados, SMS... Tornaram-se assim para mim, um suporte importantíssimo em diversos momentos desta jornada.

Um agradecimento especial a todos os proprietários que permitiram acesso a sua propriedade e a seus animais, e a todos os seus funcionários que ajudaram na execução do trabalho de campo, tornando o trabalho laboratorial possível.

A UFRRJ por toda estrutura oferecida e Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/ MEC) que através do programa de Demanda Social (DS), concedeu auxílio financeiro ao meu Doutorado.

BIOGRAFIA

GIDEÃO DA SILVA GALVÃO, filho de Antonio Sampaio Galvão (*in memorian*) e Gessí da Silva Galvão, brasileiro, nasceu em 09 de setembro de 1980, no município do Itapetinga, Bahia.

Iniciou sua formação acadêmica no Colégio Batista Albert Schweitzer em 1985 permanecendo até o ano de 1995, onde fez o ensino fundamental. Posteriormente em 1996 se transferiu para a Cooperativa Educacional de Itapetinga (COOEDITA) para fazer o primeiro ano científico (primeiro ano do segundo grau). Em 1997, deu início a sua formação profissional, ingressando no Curso Técnico em Agropecuária da Escola Média de Agropecuária Regional da Ceplac (EMARC-IT), atualmente conhecida como Instituto Federal Baiano (IFBA), onde concluiu o curso Técnico em Agropecuária no ano de 1998. No ano seguinte, ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB, campus Itapetinga), porém para seguir o que desejava profissionalmente no ano de 2003 ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), onde foi bolsista de extensão pelo Programa da Propriedade Produtiva e Geradora de Alimentos (PPGA), dando início ao caminho da ciência e pesquisa posteriormente, sendo bolsista de iniciação científica (PIBIC/CNPq) sob a orientação do Professor Dr. Alexandre Dias Munhoz.

Após graduar-se como Bacharel em Medicina Veterinária em fevereiro de 2008, ingressou-se no mês seguinte, no Curso de Pós-graduação em Ciência Animal da UESC onde se titulou Mestre em Ciência Animal em fevereiro de 2010 sob a orientação do Professor Dr. Alexandre Dias Munhoz. No mês seguinte, ingressou no Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade Animal, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), para cursar o doutorado.

*"Ele (DEUS) muda as épocas e as estações;
destrona reis e os estabelece. Dá sabedoria
aos sábios e conhecimento aos que sabem
discernir. Revela coisas profundas e
ocultas; conhece o que jaz nas trevas, e a
luz habita com ele."*

Daniel, cap. 2. v. 21-23, Bíblia Sagrada.

RESUMO

Galvão, Gideão da Silva. **Fatores associados a búfalos sororreagentes a *Neospora caninum* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) no estado do Rio de Janeiro, Brasil.** 2014. 103p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Este estudo teve como objetivo verificar a presença de anticorpos anti-*Neospora caninum* e a distribuição entre a soropositividade nas diferentes faixas etárias em rebanhos bubalinos localizados nas mesorregiões que compõem o estado do Rio de Janeiro, Brasil. A frequência de animais soropositivos foi de 29,76% (86/289). Anticorpos contra-*N. caninum* foram detectados em 14 (87,5%) das 16 propriedades, com positividade variando de 3,57 a 100%. Foram analisados 289 animais, destes, 270 bubalinos puderam ser categorizados em três estratos: ≤ 2 anos, 2 a ≤ 4 anos, >5 anos e foram submetidas à técnica de reação de imunofluorescência indireta com ponto de corte de 1:200, apresentando assim 27,41% de animais sororreagentes (74/270). O teste exato de Fisher foi utilizado com nível de significância de 5%. No presente estudo observaram-se diferenças em relação à soropositividade em função das diferentes idades ($p=0,0243$), e animais com idade superior a cinco anos apresentaram 2,62 mais chances de exposição ao agente. Os resultados obtidos evidenciam a exposição de bubalinos ao agente nas mesorregiões estudadas, devendo-se incluir o parasito no diagnóstico diferencial nos possíveis casos de abortamento bubalino, bem como evidencia a necessidade de adoção de medidas sanitárias para o controle da infecção nos rebanhos avaliados. O modelo final de regressão logística demonstrou a influência da variável faixa etária e da presença de gatos frente à soropositividade dos bubalinos o que sugere que a transmissão horizontal seja a principal rota de transmissão nas propriedades analisadas.

Palavras-chave: Búfalos, neosporose, prevalência.

ABSTRACT

Galvão, Gideão da Silva. **Associated factors in water buffaloes with seropositivity at *Neospora caninum* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) in the state of Rio de Janeiro, Brazil.** 2014. 103p. Thesis (Doctor of Veterinary Science, Animal Health). Institute of Veterinary, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

This study aimed to determine the presence of antibodies against *Neospora caninum* seropositivity and the distribution among the different age groups in buffalo herds located in the regions that comprise the state of Rio de Janeiro, Brazil. Serum samples from 270 buffaloes categorized into three ages: ≤ 2 years, 2 to ≤ 4 years, >5 years were tested by use of an immunofluorescent antibody test with a cutoff of 1:200. The Fisher exact test was used with a significance level of 5 %. The frequency of seropositive animals was 29.76% (86/289). Antibodies against *N. caninum* was detected in 14 (87.5 %) of 16 properties, with positive ranging from 3.57 to 100%. In the present study we observed differences in seropositivity according to different ages ($p = 0.243$), and animals aged more than five years had 2.62 greater chance of exposure. The results show the exposure of buffaloes to the agent in the regions studied, one should include the parasite in the differential diagnosis of possible cases of buffalo abortion, and highlights the need to adopt health measures for the control of infection in herds reviews. The final logistic regression model showed the influence of the age variable and the presence of cats across the seropositivity of water buffaloes which suggests that horizontal transmission is the main route of transmission in the properties analyzed.

Keywords: Water buffaloes, neosporosis, prevalence.

LISTA DE QUADROS

	Págs
Quadro 1. Procedência dos bubalinos criados no continente Americano.....	4
Quadro 2. Soroprevalência de <i>N. caninum</i> em bubalinos no mundo.....	10
Quadro 3. Soroprevalência de <i>N. caninum</i> em bubalinos no Brasil.....	11

LISTA DE TABELAS

	Págs
Tabela 1. Frequência de bubalinos soropositivos para <i>Neospora caninum</i> , distribuídos por propriedades presentes nas mesorregiões do Estado do Rio Janeiro.....	27
Tabela 2. Distribuição de positividade nos bubalinos em função da faixa etária.....	28
Tabela 3. Associação da idade em búfalos sororreagentes para <i>Neospora caninum</i> nos rebanhos distribuídos por propriedades presentes nas mesorregiões do Estado do Rio Janeiro.....	29
Tabela 4. Modelo final da análise multivariada, para determinação dos fatores de risco e de proteção, associados a infecção por <i>Neospora caninum</i> , nas mesorregiões que compõem o estado do Rio de Janeiro.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Verificação da presença e estreita relação de cães e gatos nas propriedades da região estudada.....	32
--	----

LISTA DE ANEXOS

	Págs
Anexo 1. Declaração de aprovação na CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) protocolo número 007/2014.....	53
Anexo 2. Questionário epidemiológico aplicado durante as visitas às propriedades inseridas nos municípios que compõem as mesorregiões do Estado do Rio Janeiro.....	54
Anexo 3. Resultados de todas as variáveis testadas, citadas ou não citadas no corpo da tese frente a positividade ou negatividade dos bubalinos a anticorpos anti- <i>N.Caninum</i> , pela RIFI	55
Anexo 4. Valores de “p” observados nas variáveis relacionadas a epidemiologia da neosporose bubalina nas mesorregiões que compõem o estado do Rio de Janeiro, Brasil, com plausibilidade biológica.....	56
Anexo 5. GALVÃO, G.da S.; GONDIM, L.F.P.; PEREIRA, M. J. S.; DE OLIVEIRA, U. V.; MUNHOZ, A.D. Soropositividade para <i>Neospora caninum</i> e associação ao abortamento e natimortos em rebanhos leiteiros do sudeste da Bahia, Brasil. <i>Revista Brasileira de Medicina Veterinária</i> , v. 33, n. 4, p. 234-237, 2011.....	57

Anexo 6. De MEIRELES, G.S.; MELLO, N. M. P.; GALVAO, G. da S.; ALMEIDA, C.R.R.; FLAUSINO, W.; LOPES, C. W. G. Surto de coccidiose em bezerros búfalos (<i>Bubalus bubalis</i>) por <i>Eimeria bareillyi</i> GIL et al., 1963 (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) - Relato de casos. <i>Revista Brasileira de Medicina Veterinária</i> , v. 34, p. 116-120, 2012.....	62
Anexo 7. OLIVEIRA, U.V.; GALVÃO, G. da S.; PAIXÃO, A. R. R.; ANDRIOLLI, J.L.; MUNHOZ, A. D. Eficácia in vitro da gentamicina sobre bactérias isoladas de vacas com mastite subclínica na microrregião Ilhéus-Itabuna, Bahia. <i>Revista Brasileira de Medicina Veterinária</i> , v. 34, p. 213-218, 2012.....	68
Anexo 8. SICUPIRA, P. M. L.; DE MAGALHÃES, V. C. S.; GALVÃO, G. DA S.; PEREIRA, M. J. S.; GONDIM, L. F. P.; MUNHOZ, A. D. Factors associated with infection by <i>Neospora caninum</i> in dogs in Brazil. <i>Veterinary Parasitology</i> , v. 185, n. 2-4, p. 305–308, 2012.....	75
Anexo 9. OLIVEIRA, U.V.; GALVÃO, G. da S.; SAMPAIO de MAGALHÃES, V.C.; COSTA, S.C.L.; PAIXÃO RIBEIRO, A.R.P. ; ANDRIOLLI, J.L.; MUNHOZ, A.D. Seropositivity for <i>Neospora caninum</i> as factor associated with infectious mastitis in crossbred cows in Northeastern Brazil. <i>Revista Brasileira de Medicina Veterinária</i> , 2013.....	80
Anexo 10. LOPES, B.B.; BERTO, B.P.; LUZ, H.R.; GALVÃO G. da S.; LOPES, C.W.G. The ruby-crowned tanager <i>Tachyphonus coronatus</i> Vieillot (Passeriformes: Thraupidae): a new host for <i>Isospora navarroi</i> Berto, Flausino, Luz, Ferreira, Lopes, 2009 (Apicomplexa: Eimeriidae). <i>Coccidia</i> , v.1, n.1. p. 2-5, 2013.....	86
Anexo 11. GALVÃO, G. da S.; FLAUSINO, W.; LOPES, C.W.G. Anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> em rebanhos de búfalos (<i>Bubalus bubalis</i>) no estado do Rio de Janeiro, Brasil. v.35, supl.2, <i>Revista Brasileira de Medicina Veterinária</i> , 2013.....	91

Anexo 12. LOPES, B. do B.; LUZ, H.B.; GALVÃO, G. da S.; FERREIRA, I.; LOPES, C.W.G. <i>Isoospora pitiguari</i> n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the rufous-browed peppershrike (Aves: Passeriformes: Vireonidae) <i>Cyclarhis gujanensis</i> Gmelin, 1789. v. 3760, n. 1, <i>Zootaxa</i> , 2014.....	93
Anexo 13. LOPES, B. DO B.; BERTO, B. P.; LUZ, H. R.; GALVÃO, G. da S.; FERREIRA, I.; LOPES, C. W. G. <i>Isoospora massardi</i> sp. nov. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the white-necked thrush <i>Turdus albicollis</i> (Passeriformes: Turdidae) from Brazil. v. 59, n.2, <i>Acta Parasitologica</i> , 2014.....	99

SUMÁRIO

	Págs
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1. Os búfalos.....	3
2.2. <i>Neospora caninum</i>	4
2.3. Classificação.....	6
2.4. Formas infectantes e ciclo biológico.....	6
2.5. Prevalência de <i>N. caninum</i> em bubalinos.....	9
2.6. Transmissão e fatores de risco em ruminantes de produção: bovinos e bubalinos.....	12
2.7. Neosporose e o aborto.....	16
2.8.. Eimeriose em Búfalos.....	17
2.9. Dignóstico sorológico de <i>N. caninum</i> em bovinos e bubalinos.....	18
2.10. Prevenção e controle.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Local de coletas das amostras.....	22
3.2. Animais.....	22
3.3. Entrevistas.....	23
3.4. Coleta e obtenção das amostras.....	23
3.5. Análise laboratorial.....	23
3.5.1. Obtenção das lâminas com antígeno de <i>Neospora caninum</i>	24
3.5.2. Preparo das lâminas para reação de imunofluorescência indireta (RIFI).....	24
3.5.3. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos contra <i>N. caninum</i>	24
3.6. Análise estatística e sistema de unidades	25

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1. Prevalência de <i>Neospora caninum</i> em bubalinos e distribuição por propriedade e faixa etária.....	27
4.2. Análise multivariada.....	30
4.2.1. Propriedades rurais e presença de outros animais.....	30
4.2.1.1. Presença de gatos nas propriedades.....	31
4.2.2. Fatores associados à idade.....	32
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
6. CONCLUSÕES.....	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
8. ANEXOS.....	53

1. INTRODUÇÃO

A criação de búfalos *Bubalus bubalis* (Linnaeus, 1758) no Brasil pode ser considerada relativamente curta quando comparada com a criação bovina, e dada a nossa cultura de exploração do gado bovino tanto para o consumo da carne e do leite, faz-se a face um rebanho bubalino infinitamente menor que o efetivo bovino.

Embora ainda que de forma tímida, a bubalinocultura leiteira e de corte aparece como uma boa alternativa frente à bovinocultura, uma vez que o teor de gordura do leite de búfalas é maior, gerando maior interesse para as empresas de laticínios, aliado ao fato de que o queijo de búfala é um dos mais apreciados no Brasil. Quanto a sua carne, vem crescendo o consumo em função do apelo saudável e nutricional, visto que apresenta um teor menor de gordura, quando comparada com a de bovina; tornando assim, uma atividade rentável e sustentável, ainda mais, quando aliada aos fatores de produção, onde aparece como um animal rústico.

Registros na Associação Brasileira de Criadores de Búfalos indicam que esses animais foram introduzidos no país no final do século XIX. Porém, esses animais só ganharam maior projeção durante as últimas décadas, onde o maior efetivo brasileiro está localizado na região Norte, porém, já é possível observar criações de búfalos com certo destaque nas demais regiões do país, no Sudeste e em algumas regiões do Nordeste brasileiro.

O que tem facilitado a expansão da criação de búfalos no Brasil, de certa maneira, é o fato de búfalos poderem ocupar áreas onde a bovinocultura seria inviável, principalmente em áreas alagadiças. Aliado a isso, estão ótimas características de rusticidade, prolificidade e precocidade, tornando assim a bubalinocultura como uma grande alternativa frente à bovinocultura nessas regiões. A grande maioria das criações brasileiras ainda é manejo extensivo, onde os animais têm sido desafiados a ambientes com pastagens inadequadas e nativas; muitas vezes, com pouco ou nenhum manejo do pasto, mas mesmo assim, consideradas ideais para a criação de búfalos.

Mediante estes aspectos, um entrave surge como “gargalo” na bubalinocultura nacional, que é a falta de uma melhor gestão; pois, como cultura nova tem sido marcada pela inadequação na cadeia produtiva onde faltam frigoríficos especializados para a referida espécie, sem mencionar a visão simplificada no agronegócio, que ainda não dimensionam a

propriedade como uma fonte geradora de receita, devendo essa, ter a responsabilidade de exercer a sua função social no contexto nacional. A exercer a função social de forma retrógrada, acaba sendo uma alternativa de justificar a função social da propriedade, torna-se assim muito fácil criar búfalos em condições extremamente extensivas e na sua maioria das vezes sem a devida estruturação e controle zootécnico. E mesmo perante o tremendo desafio, em função da sua rusticidade, estes animais conseguem atingir um satisfatório nível de produção.

Mediante esse pensamento, é possível destacar a possibilidade de dispersão e manutenção de diversos agentes patogênicos no ambiente, responsáveis pela promoção de prejuízos econômicos para a bovinocultura e conseqüentemente bubalinocultura, destacando-se neste contexto os parasitas apicomplexa, tais como *Neospora caninum* que é apontado como importante patógeno em bovinos e cães, considerado o principal patógeno promotor de abortamento bovino em todo o mundo.

Embora existam suposições que a neosporose também pode determinar perdas reprodutivas e econômicas em bubalinos, ao se analisar a literatura específica, verifica-se que poucos trabalhos no Brasil e no mundo, foram desenvolvidos. O que se sabe é que já se isolou *N. caninum* de bubalinos (RODRIGUES et al., 2004) o que torna cada vez mais importante a adoção de trabalhos epidemiológicos, uma vez que muitos bubalinos são criados juntamente com bovinos demonstrando que bovinos podem ser infectados com isolados de *N. caninum* de bubalinos (GENNARI, 2004) e vice-versa. Desta forma, parte como proposta iniciar o estudo com *N. caninum* em bubalinos naturalmente infectados no estado do Rio de Janeiro, pela importância de se buscar assim mais informações da dinâmica da infecção nesta espécie e sua possível participação na epidemiologia da infecção em bovinos. Sendo assim, esta pesquisa tem como objetivo determinar a prevalência de búfalos soropositivos para *N. caninum* nas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro, bem como identificar os fatores associados à presença do mesmo nas propriedades analisadas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Os búfalos

Ao se fazer alusão aos búfalos observa-se que aqui foi incluído um grande número de espécies. Quando se atem as grandes caçadas descrevesse experiências com os ferozes búfalos africanos (*Synceros caffer caffer*). Por outro lado, quando se fala sobre o faroeste americano no tempo de “Buffalo Bill” onde existia no continente norte americano extensas manadas do bisonte americano (*Bison bison*) ou (syn. *Bos taurus bison*) e quando se fala sobre as regiões do extremo oriente se pensa no búfalo asiático (*Bubalus bubalis*) (COCKRILL, 1977).

Ainda comentários feitos por Cockrill (1977) pode-se classificar de maneira sucinta em uma ordenação zoológica onde se começa com as famílias dos ruminantes: os camelos, girafas, veados e bovídeos. Nesta última estão incluídas tribos nas quais se incluem os ovinos e caprinos, antílopes e a tribo Bovini. Nesta última estão incluídos três grupos: Bovina como os gêneros *Bos*, bovinos domésticos; *Poäphagus*, o iaque. No gênero *Bibos* o bantengue, o gaurus e o coprei. No gênero *Bison* o bisonte americano, *Bison bison* e o bisonte europeu, *Bison bonasus*, considerados como bovídeos e seus híbridos férteis. No grupo Syncerina pertencente a tribo bovina é incluído o búfalo do cabo, *S. c. caffer* e o búfalo do Congo (*Synceros nanus*), ainda com a possibilidade de espécies intermediárias. No grupo Bubalina pertencente também a tribo bovina, o que representa para este estudo como animal de produção, existe até o presente momento *Bubulus arniee*, búfalo selvagem com seus descendente domésticos como o búfalo asiático *B. bubalis*; o anoa, *Bubalus depressicornis* e carabao *Bubalus mindorensis*.

É sabido que os búfalos foram domesticados a um bom tempo atrás, provavelmente, no terceiro milênio A.C., o que demonstra que esses animais foram domesticados há muito tempo, a pesar de não se ter ideia de quando e onde isso ocorreu. Eles aparecem em representações encontradas em Mohenjo-Daro no vale do Indo, atualmente Paquistão, no vale

de Ur na Caldéia, hoje região sul do Iraque. Já, no segundo milênio D.C., já foram reportados na China. Menciona-se que só foi assinalado no Egito após a conquista árabe no século IX D.C. No vale do Jordão, Oriente Próximo no ano 723 D.C., provavelmente trazido com a expansão do império Árabe. A crença é que foram trazidos para a Europa pelos invasores mongóis, mais precisamente pelos cruzados no seu retorno à Europa do Oriente Médio. Pelo século XIII, um grande número de búfalos já eram mantidos na região da Trácia, península dos Balcãs, precisamente no vale do Danúbio e na região de Petine na Itália. Tentou-se manter búfalos na França, Inglaterra e Tunísia, porém não sobreviveram. Foram introduzidos em diversas regiões do mundo onde floresceram como criação economicamente viável, inclusive no continente Americano (Quadro 1) (MASON, 1977).

Dois tipos de búfalos podem ser caracterizados, os dos pântanos e os dos rios, estes foram introduzidos primeiramente na região norte do Brasil. Várias raças e seus cruzamentos vêm sendo utilizadas em criações extensivas para trabalho e corte e, para produção leiteira.

Quadro 1. Procedência dos bubalinos criados no continente Americano^a

Local de Criação	Procedência:
Brasil	Índia, Itália e Trinidad e Tobaco
Bolívia	Brasil
Colômbia	Trinidad Tobaco
Costa Rica	Austrália
Venezuela	Trinidad e Tobaco, Itália, Bulgária, Austrália

^aDe acordo com COCKRILL (1977)

2.2. *Neospora caninum*

Este coccídio é um protozoário intracelular obrigatório, originalmente observado em cães e bovinos (BJERKAS et al., 1984; O'TOOLE; JEFFREY, 1987; PARISH et al., 1987), e considerado um importante patógeno destas duas espécies (DUBEY; LINDSAY, 1996; DUBEY, 2003a; DUBEY; SCHARES, 2011).

O primeiro relato foi feito por Bjerkas et al. (1984), em um cão na Noruega, com encefalomielite e miosite, resultando em paralisia e morte. Em bovinos, as observações mais convincentes também ocorreram antes mesmo da identificação e classificação desse agente etiológico (O'TOOLE; JEFFREY, 1987; PARISH et al., 1987). Nas primeiras observações foi diagnosticado como *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1908) Nicolle e Manceaux, 1909 em virtude da semelhança biológica e estrutural apresentada em suas formas evolutivas teciduais, contudo pelas diferenças antigênicas e suas diferenças estruturais em nível de microscopia eletrônica de transmissão apresentadas para o parasito, esse foi descrito e identificado como uma nova espécie por Dubey et al. (1988).

A partir de então, começaram os relatos da presença de *N. caninum* e sua associação ao abortamento bovino, sendo relatada por Thilsted e Dubey (1989) em um rebanho com histórico de aborto persistente no Novo México, EUA. E desde então, a doença tem sido assinalada com maior frequência em bovinos, gerando com isso grande impacto econômico em função dos abortamentos e perdas neonatais nessa espécie animal (TREES et al., 1999; REICHEL et al., 2013), passando a ser considerada como uma das maiores causas reprodutivas em bovinos em todo o mundo (DUBEY, 2003a,b).

Embora existam suposições que a neosporose também pode determinar perdas reprodutivas e econômicas em bubalinos, ao se analisar a literatura específica, verifica-se que pouca importância tem recebido no mundo, inclusive no Brasil, onde não foram determinadas causas que possam comprometer esse agente etiológico com o intuito de elucidar tais inferências (GENNARI, 2004).

Como não existem fármacos que inibam eficientemente a infecção, o modo mais eficaz de controlar a neosporose em ruminantes é a prevenção, e nesse contexto, faz-se cada vez mais necessária a busca pela compreensão desse parasito; bem como, a sua interação nos diferentes sistemas de produção (DUBEY et al., 2007), buscando-se assim, cada vez mais elucidar os aspectos inerentes às diferenças biológicas entre *N. caninum* e os demais parasitos relacionados, em particular *T. gondii*. Tais estudos, poderão assim promover percepções mais apuradas e claras sobre a especificidade dos hospedeiros a *N. caninum* e sua patogênese (GOODSWEN et al., 2013).

2.3. Classificação

Baseado em Current et al. (1990) e Cavalier-Smith (1993) a classificação taxonômica para esse coccídio é a seguinte:

Império – Eukariota, Cavalier-Smith, 1993;

Reino – Protozoa Owen, 1858;

Filo – Apicomplexa Levine 1970;

Classe – Sporozoasida Leukart, 1879;

Subclasse – Coccidiasina Leukart, 1879;

Ordem – Eucoccidiorida Léger; Doboscq, 1910;

Subordem – Eimeriorina Léger, 1911;

Família – Sarcocystidae Poche, 1913;

Subfamília – Toxoplasmatinae Bioca, 1956;

Gênero – *Neospora* Dubey, Carpenter, Speer, Topper e Uggla, 1988;

Espécie – *N. caninum* Dubey, Carpenter, Speer, Topper e Uggla, 1988.

2.4. Formas infectantes e ciclo biológico

Neospora caninum possui desenvolvimento e morfologia tão semelhante a *T. gondii*, que antes da classificação e nomenclatura desse agente etiológico em 1988, infecções associadas ao parasito foram inadequadamente identificadas como de *T. gondii* (BJERKAS et al., 1984; DUBEY et al., 1988).

No entanto, duas diferenças básicas importantes são observadas quando se compara os dois protozoários: 1. A neosporose é primariamente uma doença do gado, possuindo canídeos como hospedeiros definitivos, enquanto que a toxoplasmose é primariamente uma doença dos seres humanos, ovelhas e cabras, tendo os felídeos como únicos hospedeiros definitivos de *T. gondii* (DUBEY et al., 2007). 2. Embora ambas as espécies sejam formadoras de cisto nos tecidos e compartilhem muitas características biológicas e morfológicas, o que caracteriza significativamente a diferença entre as duas espécies é o fato de *N. caninum* não ser isolada de humanos, e muito menos possuir a ampla variedade de hospedeiros como apresentado por *Toxoplasma* (DUBEY, 2009; BARRATT et al., 2010).

São três as formas infectantes de *N. caninum* conhecidas: 1. Taquizoítos intracelulares que se encontram presentes nos hospedeiros infectados intermediário e definitivo; 2. Bradizoítos que se encontram presentes dentro dos cistos teciduais (Sistema nervoso central dos hospedeiros intermediários e definitivos e musculatura); e 3. Esporozoítos, estes por sua vez presentes nos oocistos esporulados no ambiente sendo eles eliminados nas fezes pelos hospedeiros definitivos (DUBEY; LINDSAY, 1996; HEMPHILL et al., 1999; PETERS et al., 2001; DUBEY et al., 2002).

Taquizoítos de *N. caninum* podem invadir e infectar diferentes tipos de células do hospedeiro incluindo células neurais, macrófagos, fibroblastos, endotélio vascular, musculatura esquelética e células hepáticas (DUBEY et al. 2002). Possuem formato semilunar ou globular medindo 3-7 x 1-5 μm e a depender do estágio de divisão podem medir 7 x 2 μm (DUBEY et al., 2002), mas localizam-se geralmente no citoplasma da célula hospedeira, formando um vacúolo parasitóforo (HEMPHILL; GOTTSTEIS, 1996). A partir do momento que se inicia a resposta imune do hospedeiro frente ao parasito, os taquizoítas diferenciam-se em bradizoítas e estabelecem-se no hospedeiro a formação de um cisto tecidual persistente (BUXTON et al., 2002).

Cistos teciduais podem atingir até 100 μm de diâmetro com aspecto arredondado ou ovalado, sendo geralmente encontrados no cérebro, medula espinal ou na musculatura esquelética, e a espessura da parede do mesmo pode variar de 1 a 4 μm (DUBEY et al., 2002). A parede dos cistos é responsável pela proteção das formas do parasito frente a reação imunológica do hospedeiro e a espessura da parede do cisto vai variar de acordo com o tempo em que a infecção esteja presente (JARDINE, 1996), podendo persistir por toda a vida no hospedeiro intermediário sem causar manifestações clínicas (DUBEY; LINDSAY, 1996). No interior dos cistos, encontram-se formas infectantes chamadas bradizoítos, que são alongadas medindo cerca de 7 - 8 x 2 μm de diâmetro (DUBEY et al., 2004, PETERS, et al., 2001).

Os cistos de *N. caninum*, podem permanecer viáveis no hospedeiro infectado por vários anos de forma latente, sem promover manifestações clínicas; mas caso ocorra imunossupressão no hospedeiro, estas estruturas podem ser liberadas, resultando em parasitemia e conseqüentemente em infecção generalizada, principalmente do útero e placenta, desencadeando assim, uma resposta clínica ou mesmo promovendo uma resposta imunológica (WOUDA et al., 1999a; ATKINSON et al., 2000; BUXTON et al., 2002; MALEY et al., 2003; MACALDOWIE et al., 2004).

Ao lado dessas considerações, os canídeos desempenham papel importante no ciclo biológico, tendo o cão, *Canis lupus familiaris* (McALLISTER et al., 1998), o coiote, *Canis*

lúpus latrans (GONDIM et al., 2004a), o dingo australiano, *Canis lupus dingo* (KING et al., 2010) e mais recentemente o lobo cinzento, *Canis lupus lupus* (DUBEY et al., 2011) como únicos hospedeiros definitivos conhecidos até o presente momento; sendo eles responsáveis pela disseminação desse parasito no meio ambiente, eliminando oocistos não esporulados (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999), que nada mais são do que a forma de resistência do mesmo no meio exterior e única forma infectante não sistêmica do parasito, o oocisto (FAYER, 1980).

Os oocistos medem de 10 a 12 μm , e esporulam no ambiente em 24 horas (LINDSAY et al., 1999), com formação de dois esporocistos, cada qual contendo quatro esporozoítos (McALLISTER et al., 1998), tornando-se assim infectantes para bovinos (DE MAREZ et al., 1999) bem como para todos os demais hospedeiros intermediários, constituindo assim um importante reservatório de infecção no ambiente, uma vez que a parede do oocisto oferece resistência as diversidades do ambiente externo por um longo tempo (DUBEY et al., 2002).

O ciclo de vida se fecha, quando cães adquirem neosporose, após a ingestão de placentas, carne crua ou mal cozida, bem como através da ingestão de carcaças e vísceras contendo cistos em seus tecidos (McALLISTER et al., 1998; DIJKSTRA et al. 2001b; BASSO et al., 2001; TREES; WILLIAMS, 2000; GONDIM et al., 2004a) o que evidencia a transmissão do agente do bovino para o cão, e vice versa (DIJKSTRA et al. 2001a).

Os cistos, ao serem ingeridos, podem sobreviver à passagem através do estômago, mas após a liberação de bradizoítos infectam as células epiteliais do intestino delgado. Fases esquizogônicas e gametogênicas que são precedentes a formação dos oocistos ainda não foram observados para *N. caninum*, mas presume-se que estas fases precedem a formação de oocistos nos intestinos de cães (DUBEY et al., 2004).

Oocistos desta maneira são eventualmente formados e o ciclo de vida começa novamente, tendo o modo de transmissão do parasita a partir de hospedeiro definitivo para intermediário definido e referido como transmissão pós-natal ou horizontal, e o modo de transmissão da mãe para o feto sendo referido como transmissão transplacentária ou vertical (DIJKSTRA et al., 2001b; SCHARES et al., 2002; DE MAREZ et al., 1999; TREES et al., 2002; GONDIM et al., 2004b; TREES; WILLIAMS, 2005). É bom salientar aqui que oocistos semelhantes podem ser vistos nas fezes de cães, inclusive do cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* no Brasil dando um diagnóstico inadequado da presença de *N. caninum* nas fezes de cães. *Hammondia heydorni* (Tadros e Laarman, 1976) Dubey, 1977 cujos hospedeiros definitivos são, cães e o cachorro-do-mato no Brasil e tendo como hospedeiro intermediários ruminantes e o próprio cão, se assemelhando assim ao desenvolvimento

epidemiológico de *N. caninum* a não ser pela formação de cistos monozoicos na musculatura estriada esquelética e cardíaca (LOPES; FLAUSINO, 1981; PEREIRA; LOPES, 1987; PEREIRA; LOPES, 1990) diferindo assim de *N. caninum* que forma cistos sistêmicos.

2.5. Prevalência de *N. caninum* em bubalinos

Poucos são os estudos sobre a presença da infecção de *N. caninum* nesta espécie, mas especula-se que a neosporose também pode determinar perdas reprodutivas, visto que esse agente etiológico já foi isolado em bubalinos no Brasil (RODRIGUES et al., 2004).

Pela estreita relação da bovinocultura com a bubalinocultura, a relevância do estudo da neosporose nesta espécie ganha importância, visto que bovinos podem ser infectados com isolados de *N. caninum* de bubalinos como demonstrado por Rodrigues et al. (2004), deixando clara a possibilidade de uma participação importante dos bubalinos na epidemiologia da infecção de bovinos e vice-versa.

Muito tem sido feito em relação ao estudo da neosporose em nosso meio, mas alguns aspectos necessitam de maior compreensão e estudo. No caso dos bubalinos, existe a necessidade de mais estudos que visem investigar a importância dessa espécie na epidemiologia da infecção, bem como a interação de outras espécies nas condições de criação de nossos animais nas propriedades brasileiras (GENNARI, 2004).

Em búfalos, os primeiros estudos sobre *N. caninum*, foram realizados no Vietnã (HUONG et al. 1998) e Egito (DUBEY et al. 1998), relatando assim a detecção de anticorpos nessa espécie animal. Na Itália Guarino et al. (2000), além da detecção de anticorpos em 34,6% das amostras sorológicas, verificaram cistos semelhantes aos de *N. caninum* em dois de quatro fetos abortados, após análise de cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina, porém tal achado não foi confirmado por meio de exame imunohistoquímico ou de biologia molecular. E no Brasil sendo o protozoário isolado do cérebro de seis búfalos soropositivos na região de Pirassununga (RODRIGUES et al. 2004).

O que chama a atenção nos estudos em bubalinos é a diferenciação nos pontos de corte adotados variando nos estudos de soroprevalência de 1:25 até 1:200 na RIFI e 0.20 a 0.50 no ELISA. Tais achados são também comuns nos inquéritos bovinos, quanto a diferentes técnicas aplicadas, bem como aos seus diferentes pontos de corte adotados, o que dificulta e inviabiliza qualquer comparação entre os estudos (GONDIM et al., 2007), como demonstrado

nas no Quadros 2 e 3, onde é possível ter um resumo de levantamentos sorológicos evidenciando a presença de *N. caninum* em diferentes regiões do mundo e do Brasil, bem como as técnicas utilizadas e pontos de cortes adotados.

Quadro 2. Soroprevalência de *N. caninum* em bubalinos no mundo

País/Local	Nº animais	Aptidão	Positivos (%)	Técnica	Ponto de corte	Referências
Egito:						
Cairo	75	-	68	NAT	1:20	Dubey et al. 1998
Vietnam:						
Ho Chi Minh	200*	corde	1,5	ELISA RIFI	0.20 1:640	Huong et al. 1998 Huong et al. 1998
Itália:						
Caserta	1337		34,6	RIFI	1:200	Guarino et al. 2000
Índia:						
Punjab	32	leite	50	ELISA e RIFI**	0.30	Meenakshi et al., 2007
Karnataka e Andhra Pradesh	341	leite		ELISA	0.30	Sengupta et al., 2013
Íran:						
Região nordeste	181*	corde	37	ELISA	0.50	Hajikolaei et al., 2007
Paquistão:						
Lahore	300	leite	54,7	ELISA	0.30	Nasir et al., 2011
Argentina:						
	1024	-	64,9	RIFI	1:100	Crudeli et al., 2007
Corrientes	449	-	64	RIFI	1:100	Campero et al. 2007

*Amostras coletadas abatedouros

** Confirmando os resultados de soropositivos na RIFI

NAT (Teste de aglutinação direta)

ELISA (Ensaio imunoenzimático)

RIFI (Reação de imunofluorescência indireta)

Quadro 3. Soroprevalência de *N. caninum* em bubalinos no Brasil

Estado/Região	Nº animais	Aptidão	Positivos (%)	Técnica	Ponto de corte	Referências
São Paulo:						
Vale da Ribeira	222	mista	64	RIFI	1:25	Fujii et al. 2001
Vale da Ribeira	222	mista	53	NAT	1:40	Fujii et al. 2001
Zona oeste	404	leite	38,1	RIFI	1:100	Negrão et al., 2009
	411	-	56	RIFI	1:200	Souza et al., 2001
Rio Grande do Sul:						
	164	corde	14,6	ELISA	*	Vogel et al., 2006
Pará:						
	196	-	70,9	RIFI	1:25	Gennari et al., 2005
	374	-	40,91	RIFI	1:200	Silva et al., 2010
	288	-	53,12	RIFI	1:200	Silva et al., 2013
	288	-	17,36	ELISA	0.50	Silva et al., 2013
Bahia:						
	117	-	35,9	RIFI	1:200	Gondim et al., 2007
Amazônia:						
	212	-	88,21	ELISA	1:100	Viana et al., 2009

*Amostras com ponto de corte, segundo o fabricante CHEKIT®

2.6. Transmissão e fatores de risco em ruminantes de produção: bovinos e bubalinos

Existem dois meios possíveis de transmissão da infecção por *N. caninum* em grandes ruminantes de produção. A primeira e mais importante rota é usualmente chamada de transmissão vertical ou transmissão transplacentária, atualmente denominada transmissão transplacentária endógena (TREES; WILLIAMS, 2005). Esta via de transmissão refere-se à passagem transplacentária do parasito de uma vaca com infecção persistente para seu feto, ainda no útero, tendo origem na reativação de bradizoítos presentes nos cistos teciduais (ENTRICAN, 2002).

A segunda rota é denominada transmissão horizontal ou transmissão pós-natal, ocorrendo pela via oral, através da ingestão de oocistos esporulados no ambiente que acabam contaminando a água, bem como os alimentos dos bovinos (DIJKSTRA et al., 2001b; SCHARES et al., 2002; DE MAREZ et al., 1999; TREES et al., 2002; GONDIM et al., 2004a) e resultados encontrados por Campero et al. (2007), assinalam uma alta exposição dos bubalinos, a transmissão pós-natal nos quatro ranchos analisados na provincial de Corrientes na Argentina.

Em casos de transmissão horizontal, bovinos podem apresentar uma resposta imune específica no período correspondente a duas ou quatro semanas após a infecção experimental com a ingestão de 10^4 - 10^5 oocistos (DE MAREZ et al., 1999), porém abortamento pode não ocorrer após a ingestão de 600 oocistos esporulados, mas evidenciando após quatro meses da gestação a formação da infecção através da formação de cistos no cérebro das vacas desafiadas, confirmando assim a infecção através da PCR, concluindo que a ingestão de 600 oocistos, seja suficiente para a promoção da doença na vaca, sem favorecer a manifestação clínica através do aborto (TREES et al., 2002). Por outro lado, vacas quando desafiadas com a administração experimental de 1.500 a 115.000 oocistos, foi possível verificar que 17 (89%) das 19 vacas tornaram-se soropositivas para *N. caninum*, com infecção transplacentária em seis (35%) dos 17 bezerros, sendo que uma das vacas desafiadas acabou abortando e outra vaca deu a luz a um bezerro natimorto (GONDIM et al. 2004a)

Não existem estudos dessa natureza em bubalinos, mas pela estreita relação existente, pensa-se que essa espécie tenha reação semelhante frente ao desafio da ingestão oral de oocistos, uma vez que quando desafiadas com 10^8 taquizoítos da cepa NC-1 em dois diferentes estágios de gestação (70 e 90 dias) tiveram placentite não supurativa como achado mais frequente, sendo a inflamação caracterizada principalmente pela infiltração de células

CD3+, $\gamma\delta$ TCR+ e as células CD4+, enquanto que as células T CD8+ eram menos numerosas, sendo os resultados encontrados, semelhantes a estudos dessa mesma natureza em bovinos quando desafiados da mesma maneira; apesar de búfalas terem apresentado menor gravidade nas inflamações, quando comparados aos resultados observados em vacas (CANTÓN et al., 2013).

Vacas infectadas, possuem maior probabilidade de passar a infecção para suas crias durante a gestação, com valores variando de 66 a 95% (PARÉ et al. 1996; DAVISON et al., 1999; DIJKSTRA et al., 2003), podendo elas permanecer infectadas por toda a vida (TREES et al., 1999), transmitindo assim, a infecção a seus descendentes em várias gestações consecutivas (FIORETTI et al., 2003) ou de forma intermitente (WOUDA et al., 1998).

Em bovinos as taxas de transmissão transplacentária endógena, quanto à probabilidade de vacas infectadas passarem a infecção para suas crias durante a gestação é muito alta, chegando a valores de 66 a 95% (PARÉ et al. 1996; DAVISON et al., 1999; ROMERO; FRANKENA, 2003; DIJKSTRA et al., 2003).

Achados semelhantes são descritos em bubalinos, uma vez que a dinâmica de anticorpos de *N. caninum*, foi acompanhada em 29 búfalas e seus respectivos bezerros por um ano, sendo analisadas para detecção de anticorpos contra *N. caninum*. De um total de 29 bezerros, 23 eram soropositivos com títulos de 1:100 ou mais, aos 1-2 dias da idade. Destes 23 bezerros, 17 permaneceram soropositivos durante o estudo, enquanto seis tornaram-se soronegativos em quatro (dois bezerros), seis (um bezerro), sete (dois bezerros) e oito (um bezerro) meses de idade. Estes achados indicam uma alta taxa de transmissão neonatal de *N. caninum* em búfalos, estimando assim, que a transmissão vertical em búfalos ocorra como em bovinos, sendo a rota mais importante de infecção (RODRIGUES et al., 2005).

Apesar da eficiência na transmissão vertical, fica evidente a partir de modelos matemáticos que a infecção pelo *N. caninum* não pode ser sustentada em rebanhos sem a transmissão horizontal (FRENCH et al., 1999). Evidenciando assim a importância do cão como agente determinante na contaminação do ambiente e consequentemente resultando na infecção de ruminantes de produção, uma vez que cães experimentalmente infectados, após a ingestão de tecidos naturalmente infectados de bovinos (DIJKSTRA et al., 2001a; GONDIM et al., 2002), bubalinos (RODRIGUES et al., 2004) e de veados da cauda branca (GONDIM et al., 2004c), eliminam oocistos em suas fezes.

Já, em cães naturalmente infectados raramente tem sido identificado oocistos nas fezes (BASSO et al., 2001; McGARRY et al., 2003; SCHARES et al., 2005), mas já foi

documentado a eliminação por período prolongado, bem como a repetição na eliminação de oocistos nas fezes (McGARRY et al., 2003).

Desta maneira, vale enfatizar que canídeos de uma forma geral são os únicos hospedeiros definitivos conhecidos até o momento, sendo eles os responsáveis pela disseminação do parasito no ambiente externo, eliminando oocistos não esporulados no ambiente (McALLISTER et al., 1998; GONDIM et al., 2004a; et al., 2010; DUBEY et al., 2011; McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999).

A presença de cães em uma fazenda tem se mostrado um fator de risco para infecção do gado bovino (PARÉ et al., 1998; BARTELS et al., 1999; WOUDA et al., 1999a, MAINAR-JAIME et al.1999), e a introdução de um novo cão em uma exploração bovina com neosporose endêmica parece ser um fator de risco para transmissão horizontal no rebanho (DIJKSTRA et al. 2002), representando também um risco para a criação de bubalinos, uma vez que cães podem se infectar ao ingerir tecidos de búfalas naturalmente infectadas, vindo assim a eliminar oocistos (RODRIGUES et al., 2004).

Cães de fazenda também podem se infectar após alimentar-se de placentas de vacas naturalmente infectadas (DIJKSTRA et al., 2001a) ou através da ingestão de carcaças (TREES; WILLIAMS, 2000), carne crua, ou mal cozida (BASSO et al., 2001), sendo a ingestão de fetos abortados uma fonte menos provável de infecção (BERGERON et al., 2001), devendo assim manter os cães longe das instalações a fim de diminuir a possibilidade de contaminação do ambiente, e consequentemente contaminação do rebanho (DIJKSTRA et al., 2002).

Animais silvestres têm sido considerados de extrema importância na epidemiologia de muitas coccidioses, pois alguns deles estão intimamente relacionados com os animais domésticos, compartilhando das mesmas espécies de parasitos, bem como diferentes cepas (FAYER, 1980), como já evidenciado com o cachorro do mato por Pereira e Lopes (1987, 1990) ao eliminar oocistos de *H. heydorni* semelhantemente ao que ocorre em cães.

Acompanhando essa mesma linha de raciocínio, o ciclo silvestre pode exercer uma dinâmica epidemiológica interessante, pois cães e possivelmente outros canídeos selvagens podem desempenhar um papel importante no ciclo de transmissão, tanto pelo hábito de caça de alguns canídeos, bem como pelo acesso a animais caçados que muitas vezes acabam sendo eviscerados a campo, deixando assim as vísceras disponíveis, permitindo o acesso e o consumo destes tecidos no ambiente (GONDIM et al., 2004c).

Animais mais velhos possuem um risco maior de se tornarem infectadas (DYER et al., 2000; RINALDI et al., 2005). A grande maioria dos estudos epidemiológicos relacionados à

neosporose concentra-se em cães e bovinos; e nos mesmos fatores associados a faixa etária são atribuídos como fator de risco ou proteção, dentre eles cabe destacar que em bovinos o risco de se tornar soropositivo pode aumentar em função do incremento da idade, ou do número de gestações tanto avaliando rebanhos leiteiros ou de corte, sugerindo assim que a presença da transmissão horizontal seja uma rota de grande importância em determinados rebanhos (JENSEN et al., 1999; DYER et al. 2000; RINALDI et al., 2005; SANDERSON et al., 2000).

No caso de transmissão vertical, animais soropositivos estão distribuídos igualmente entre os diferentes grupos de idade, e bezerros soropositivos possuem vacas soropositivas. Mas quando a transmissão horizontal está presente ocorre aglomeração de soropositivos em uma determinada categoria, juntamente com a falta de associação entre o status sorológico da vaca e bezerro (DIJKSTRA et al., 2001b). Este tipo de associação em relação a idade, foi feito também em rebanhos bubalinos, encontrando maior soropositividade em animais com faixa etária de quatro anos, ou mais (FUJII et al., 2001; CAMPERO et al., 2007; SENGUPTA et al., 2013), aumentando a possibilidade de risco em adquirir a infecção no ambiente, através da transmissão horizontal (MOORE et al., 2009), tendo maiores chances de adquirir a infecção com o aumento da idade (GUARINO et al., 2000).

Existem indicações em muitos países que a soroprevalência entre os bovinos difere conforme o tipo de raça (BARTELS et al., 2006; MUNHOZ et al., 2006); fato também evidenciado em bubalinos (SOUZA et al., 2001), porém o sistema de produção nestas comparações deve ser também levado em consideração por exercer maior pressão de produção sobre os animais, levando-os a um maior estresse (MELO et al., 2001) implicando em maiores chances de recrudescimento da infecção pelo rompimento dos cistos do parasita nos animais positivos como especulado por Wouda et al. (1999b) e Atkinson et al. (2000).

O fator clima em dois estudos na Europa avaliando os riscos de soropositividade individual e no rebanho revelaram que a temperatura média na primavera foi determinante como fator de risco para maior proporção de soropositividade (SCHARES et al., 2004; RINALDI et al., 2005), e em bubalinos do distrito de Lahore no Paquistão as taxas mais elevadas de soroprevalência, foram registradas no verão e outono (NASIR et al., 2011). Sendo tal observação justificada pela ação do clima na esporulação e sobrevivência dos oocistos no ambiente (DUBEY et al., 2007), da mesma forma que regiões mais úmidas estão mais propensas a animais soropositivos (ANDREOTTI et al., 2004).

Vários são os estudos realizados através de técnicas sorológicas, porém grande variação dos resultados é evidenciada, possivelmente pela adoção de diferentes pontos de

corte nas estudos de bovinos (BJORKMAN; UGGLA, 1999) e de bubalinos (GONDIM et al., 2007) e por diferenças regionais, o que dificulta uma comparação direta dos resultados encontrados (DUBEY et al., 2007; GONDIM et al., 2007). Tais diferenças quando encontradas só podem ser levadas em consideração quando há uma padronização das análises e dos desenhos experimentais (BARTELS et al. 2006), portanto cautela deve ser tomada ao transferir resultados de análise de fator de risco em um determinado sistema de gestão ou região para outra (DUBEY et al., 2007).

O conhecimento dos fatores de risco que favoreçam os rebanhos adquirir a infecção por *N. caninum* e sua associação com o aborto, se faz importante para o desenvolvimento e implementação de medidas de controle da neosporose. Grande parte dos conhecimentos quanto ao risco de infecção ou dos fatores de proteção se baseia nos estudos retrospectivos, caso-controle e experimentais. Sendo assim a identificação repetida de um fator de risco ou de proteção nos diversos estudos realizados evidencia que determinada característica encontrada torna-se de fato um fator de risco ou de proteção para disseminação ou controle da infecção (DUBEY et al., 2007).

2.7. Neosporose e o aborto

Neospora caninum em bovinos, é considerado como a principal causa de aborto promovido por protozoários na espécie, e o aborto promovido por este agente etiológico segue três padrões distintos, sendo eles: 1. Abortos esporádicos: caso a taxa anual de abortos seja menor que 3% nos animais de risco; 2. Aborto endêmicos: quando a taxa de aborto for maior que 3% nos animais riscos sem um óbvio pico de abortos, ou mantendo-se maior que 5% ao ano, sem que haja um pico de abortamento no ano (DAVISON et al., 1999); e 3. Aborto epidêmico: que apesar de menos comum, é considerado o mais devastador no sentido econômico, por representar alta proporção de abortos em um curto período de tempo (THURMOND et al, 1997). Contudo, nada até o presente momento, reforça o fato da neosporose em bubalinos ser responsável por perdas econômicas significantes em rebanhos no mundo, ou mesmo, a possibilidade do agente etiológico em questão, ser de fato responsável por abortos como o abordado na literatura específica da ação de *N. caninum* em bovinos.

O que se sabe até o presente momento é que búfalas quando desafiadas com 10^8 taquizoítos da cepa NC-1 em dois diferentes períodos de gestação (70 e 90 dias) tiveram

placentite não supurativa como achado mais frequente, sendo a inflamação caracterizada principalmente pela infiltração de células CD3+, $\gamma\delta$ TCR+ e células CD4+, enquanto que as células T CD8+ eram menos numerosas. Esta situação, quando comparada com os relatos em bovinos em período de gestação na mesma idade, os infiltrados observados em búfalas prenhes apresentaram respostas imunes celulares com menor gravidade, indicando com isso, uma evolução clínica mais branda em búfalas, indicando ser uma maior resistência dessa espécie a infecção por *N. caninum* (CANTÓN et al., 2013).

Diferentemente desta enfermidade, pode-se inferir que a coccidiose, possui uma maior relevância clínica e econômica em bubalinos no mundo, quando comparada à neosporose, conforme evidenciado no item abaixo.

2.8. Eimeriose em Búfalos

Causada por espécies do gênero *Eimeria* Schneider, 1875 (Apicomplexa: Eimeriidae), tais parasitos possuem distribuição cosmopolita, estando presente os estádios intracelulares no epitélio intestinal de diversos vertebrados (SOULSBY, 1987), sendo considerado como os maiores responsáveis por perdas econômicas em bubalinos mantidos em condições insalubres (GRIFFITHS, 1977).

Eimeriose em ruminantes pode estar associada a alta mortalidade e morbidade, especialmente nos bezerros (GRIFFITHS, 1977; SANYAL; RUPRAH, 1984), sendo que a susceptibilidade dos hospedeiros, pode variar em função da idade, predisposição genética, da imunidade inata ou adquirida, nível de estresse dos animais (manipulação excessiva do rebanho, pressão por produção leiteira, falta de alimentação), da localização do parasita no epitélio intestinal, bem como em função do número e localização dos estágios endógenos do parasito. Aliado a estes fatores, encontra-se o clima, que pode ser favorável ao desenvolvimento e manutenção do mesmo no ambiente (HAYAT et al., 1994).

Várias espécies do gênero *Eimeria* foram identificadas em búfalos. A maioria delas infecta também bovinos, mas duas delas são específicas aos bubalinos (GRIFFITHS, 1977). As espécies *E. alabamensis*, *E. ankarensis*, *E. auburnensis*, *E. azerbaijanica*, *E. bareillyi*, *E. bovis*, *E. brasiliensis*, *E. bukidnonensis*, *E. canadensis*, *E. cylindrica*, *E. ellipsoidalis*, *E. gokaki*, *E. ovoidales*, *E. subspherica*, *E. thianethi*, *E. wyomingensis*, e *E. zuernii* foram descritas em bubalinos. Com exceção de *E. bareillyi* e *E. azerbaijanica*, todas as outras

espécies são comuns a ambas espécies de ruminantes (GRIFFITHS, 1977; FAGIOLO et al., 2005).

No Brasil, existem muitos relatos de coccidiose bovina, mas poucos são os relatos de coccídios documentados em búfalos, contudo, sabe-se que parasitas do gênero *Eimeria*, são os agentes etiológicos responsáveis por doenças mais comuns e importantes, responsáveis por afetar o crescimento e desenvolvimento de rebanhos bubalinos, tendo alta prevalência e sendo altamente patogênico (DE NORONHA et al., 2009).

Fato observado por De Meireles et al. (2012) no estado do Rio de Janeiro, Brasil, verificando a morte de bezerros búfalos com 50 dias de idade infectados naturalmente com *E. bareillyi*, com estes animais apresentando diarreia breve, anorexia, prostração, grau de desidratação, olhos fundos, pelos eriçados e sem brilho, sem apresentar cólica ou tosse, vindo a óbito num prazo de quatro a cinco dias. No exame de fezes, foi possível observar inúmeros oocistos e nos cortes histológicos da mucosa do íleo no respectivo animal a presença de formas evolutivas semelhante aos achados de Pande et al. (1971), Bastianetto et al. (2008) e Dubey et al. (2008) caracterizando assim a espécie, como altamente patogênica para bubalinos, evidenciando uma perda de 33% dos bezerros búfalos na propriedade avaliada, por esta coccidiose em sua forma mais aguda. Em infecções experimentais de bezerros de búfalo com *Eimeria zuernii*, Sanyal e Ruprah (1984) relataram diarreia, anorexia, fraqueza, e morte 25 dias após a infecção.

De forma geral, a coccidiose em bezerros de búfalo é muitas vezes aguda, com diarreia sanguinolenta fina, com presença de falsas membranas sobre o revestimento do intestino. Resultados satisfatórios de tratamento com sulfas têm sido relatados. Outros relatos, no entanto, afirmam que os resultados não são tão satisfatórios quando comparados em bezerros bovinos, não existindo relatos disponíveis para o tratamento com os novos medicamentos que têm sido utilizados com sucesso em rebanhos bovinos (GRIFFITHS, 1977).

2.9. Dignóstico sorológico de *N. caninum* em bovinos e bubalinos

Para diagnosticar a infecção por *N. caninum*, a detecção de anticorpos no soro provou ser a melhor opção tanto na avaliação individual, bem como na avaliação de um rebanho, sendo uma excelente ferramenta para monitorar o aborto associado a esse coccídio. Uma vez que seja identificados anticorpos contra *N. caninum* nos animais suspeitos, há indícios da

exposição dos desses ao parasito, e assim há possibilidade de programar medidas básicas de controle que se fazem necessárias dentro de um determinado rebanho (DUBEY et al., 1988; ORTEGA-MORA et al., 2006).

A técnica de imunofluorescência indireta (RIFI) foi a primeira prova imunológica usada para detecção de anticorpos contra *N. caninum* e tem sido considerada como uma prova de referência frente as outras técnicas existentes (DUBEY et al., 1988), mas existe uma variedade de ensaios disponíveis para detecção sorológica de anticorpos além da RIFI, tais como o ensaios imunoenzimáticos (ELISA), immunoblotting (IB) e testes de aglutinação direta (NAT) que foram desenvolvidos ao longo dos anos (ATKINSON et al. 2000; BJÖRKMAN; UGGLA, 1999; JENKINS et al., 2002; DUBEY; SCHARES, 2006, WAPENAAR et al, 2007; DUBEY; SCHARES 2011), sendo considerados ferramentas essenciais para a determinação da infecção e importante no apoio ao exame clínico, e indispensável em estudos epidemiológicos (BJÖRKMAN; UGGLA, 1999; DUBEY et al., 2006).

O teste ELISA que apesar de não ser considerado o teste ouro, é normalmente usado para análises em nível de rebanho. Além disso, existem também vários testes comerciais disponíveis que podem ser realizados utilizando soro, plasma ou amostras de leite para identificar rebanhos infectados. *Kits* ELISA de avidéz também são utilizados, sendo úteis para diferenciar infecções agudas e latentes (BJÖRKMAN; UGGLA., 1999; SCHARES et al., 2002).

Uma grande vantagem que os métodos sorológicos podem oferecer em relação aos métodos de detecção direta ou indireta em tecidos da uma vaca gestante e no feto é a possibilidade de ser utilizado para analisar os animais *in vivo* e assim oferecer informações sobre o caminho e o estágio da infecção. A presença de anticorpos específicos de *N. caninum* nos fluidos fetais ou em soros de vacas pode não ser só útil no diagnóstico da infecção, mas pode também evidenciar uma infecção congênita, deixando claro o possível papel que o animal pode estar desempenhando no ciclo de vida ou na epidemiologia de *N. caninum* nos rebanhos estudados (JENKINS et al., 2002).

A diversidade de estudos realizados através de técnicas sorológicas evidencia uma grande divergência nos resultados encontrados, possivelmente pela adoção de diferentes pontos de corte, nos diferentes estudos, bem como, em diferentes técnicas sorológicas empregadas (BJORKMAN; UGGLA, 1999). Além disso, pode-se destacar as diferenças regionais, que podem oferecer ao parasito maior adaptação ou não ao ambiente, interferindo assim diretamente ou não nos resultados, o que dificulta uma comparação direta entre os

resultados encontrados nos diferentes estudos (DUBEY et al., 2007), sendo estas diferenças também observadas nos estudos epidemiológicos de bubalinos em função da técnica de diagnóstico empregada na detecção de anticorpos, assim como nas diferenças de habitat onde os animais são mantidos (GONDIM et al., 2007).

Uma vez que a infecção ou aborto por *N. caninum* seja identificado em algum animal do rebanho através de provas sorológicas, recomenda-se que a soroprevalência dentro do rebanho seja estimado e que os casos de abortamento nos rebanhos sejam analisados (DUBEY et al., 2007). Realizar a triagem sorológica por completo em um rebanho ao menos uma vez, tem sido descrito como um método rápido e válido de analisar a infecção por *N. caninum* avaliando como a enfermidade se comporta no rebanho, fornecendo assim informações quanto a via de transmissão predominante (vertical ou horizontal), e assim visualizar a distribuição da infecção frente às diferentes faixas etárias, e até permitindo identificar se existe diferença quanto a positividade em função da raça (DIJKSTRA et al, 2003; LÓPEZ-GATIUS et al, 2004; DE MAGALHÃES et al., 2012).

Para o diagnóstico de um feto abortado, a detecção histológica das lesões ou o uso da reação em cadeia de polimerase (PCR) para detecção da presença do parasito no cérebro, bem como coração e fígado, são as melhores escolhas para a avaliação. (ORTEGA-MORA et al., 2006), porém a sorologia também pode ser uma excelente ferramenta de auxílio diagnóstico em feto abortado (fluidos fetais). Contudo para realizar a sorologia em feto abortado, deve-se adotar ponto de corte nos valores de 1:16 (ALVAREZ-GARCIA et al., 2003) ou 1:25 (WOUDA et al., 1997), todavia a sensibilidade da sorologia fetal pode ser baixa, devido a baixos títulos de anticorpos presentes nos fluidos ou pela degradação post-mortem das imunoglobulinas (ALVAREZ-GARCIA et al., 2007).

2.10. Prevenção e controle

Em fazendas não infectadas, prevenir a introdução do parasita através de medidas de controle e profilaxia é o foco principal, uma vez que não existe tratamento ou vacina eficaz contra a neosporose em ruminantes (DUBEY; SCHARES, 2011). A recomendação tal qual como acontece em bovinos (DIJKSTRA et al. 2002) é que canídeos, não devam ter acesso as instalações, bem como a água e comida dos bubalinos.

Outra medida de controle, é evitar que cães nas propriedades bem como canídeos silvestres, tenham acesso a placentas, carcaças, descargas uterinas, bem como realizar a alimentação dos mesmos com carne crua ou mal cozida (TREES; WILLIAMS, 2000; BASSO et al., 2001; DIJKSTRA et al., 2001b; ALMERÍA; LOPES-GATIUS, 2013).

O melhor método para se garantir a ausência do parasita em uma propriedade, seria manter o rebanho fechado, mas pela impossibilidade comercial de realizar tal procedimento, o ideal seria que os animais só fossem obtidos somente a partir de rebanhos que fossem testados e reconhecidos como negativos, de preferência com mais de uma prova do teste para evitar falsos- negativos (HADDAD et al., 2005), uma vez que a transmissão transplacentária em rebanhos bubalinos, tal qual acontece em bovinos tem se demonstrado eficiente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de coletas das amostras

O estudo foi realizado, mediante o uso de uma soroteca pertencente ao Laboratório de Coccídios e Coccidioses (LCC), que deu origem a parte de uma tese no ano de 2011 intitulada: Estudo Epidemiológico de *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em Búfalos (*Bubalus bubalis*) do Estado do Rio de Janeiro, que para o desenvolvimento do presente estudo, foi posteriormente encaminhada a CEUA/IV/UFRRJ onde recebeu o número 007-2014 (Anexo 1). As amostras da soroteca foram procedentes de animais oriundos do Estado do Rio Janeiro. O critério de seleção para a escolha das propriedades foi de a mesma possuir bubalinos, compondo o número final de 16 propriedades que permitiram a realização do estudo, do total das 64 propriedades disponíveis no estado segundo o IBGE (2006).

3.2. Animais

Os bubalinos pertencentes às propriedades visitadas foram categorizados em três estratos: animais de até dois anos; animais com idade de dois a quatro anos; e animais com idade superior a cinco anos. Embora, o abortamento ou distúrbios reprodutivos possam ser uma consequência da neosporose (DUBEY, 1999a,b), estes critérios não foram utilizados na seleção. A escolha dos animais foi realizada por conveniência, por questões operacionais, sendo utilizados os animais que durante a visita se encontravam na sala de ordenha/espera ou próximo das instalações das propriedades.

3.3. Entrevistas

Durante a visita e antes do momento da coleta, os proprietários, funcionários ou Médicos Veterinários responsáveis pela propriedade tomaram ciência do propósito da visita e após autorização foi aplicada uma entrevista estruturada (Anexo 2), com intuito de avaliar o perfil de produção e manejo da propriedade, obter o registro dos animais, para assim poder buscar verificar os prováveis fatores de risco associados à infecção.

3.4. Coleta e obtenção das amostras

O sangue foi obtido por punção das veias jugular ou mamária, utilizando sistema Vacutainer® com vidro siliconizado, sem anticoagulante, com capacidade de 10 mL. As amostras foram acondicionadas em recipiente isotérmico, com gelo reciclável até seu processamento.

3.5. Análise laboratorial

O processamento das amostras e a análise dos dados obtidos foram realizados no LCC, Anexo 1 do IV (Antigo PSA), Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, UFRRJ, *Campus* Seropédica, BR 465 Km 07, 23890-000 Seropédica, RJ.

Após a retração do coágulo, o sangue foi centrifugado a 350 x g por 10 minutos em uma centrífuga refrigerada, modelo BPR 6000 (DAMON/IEC Division, Massachusetts, EUA) para a separação do soro, este foi acondicionado em criotubos de 2 mL, em duplicata, identificados e mantidos sob a temperatura de -20 °C até o momento da realização da sorologia.

3.5.1. Obtenção das lâminas com antígeno de *Neospora caninum*

O material a ser utilizado como antígeno foi obtido junto ao IMUNODOT Laboratório localizado na cidade de Jaboticabal, SP.

Taquizoítos da cepa NC-1 foram mantidos em monocamadas de células VERO cultivadas em meio RPMI com L-glutamina contendo 5% de soro equino e antibióticos (penicilina e estreptomicina), de acordo com os métodos descritos por Yamane et al. (1997).

3.5.2. Preparo das lâminas para reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Taquizoítos da cepa NC-1, foram usados para sensibilizar lâminas de vidro com teflon, contendo 12 poços de 4mm de diâmetro cada. Em cada poço adicionou-se 10µL de uma solução de PBS, pH 7,2 contendo de 500 a 1000 taquizoítos/µL, contados em câmara de Neubauer.

As lâminas foram secas em estufa a 37°C por uma hora, posteriormente fixadas em formol a 10% por 10 minutos, novamente levadas à estufa até secar em seguida envolvidas com papel de folha simples e folha de alumínio, e em seguida mantidas em freezer a -40°C.

3.5.3. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos contra *N. caninum*

As lâminas sensibilizadas foram retiradas do freezer e lavadas em (PBS) por 5 minutos, deixando-as secar em estufa por 5 minutos.

A RIFI foi realizada de acordo com Yamane et al. (1997). O ponto de corte utilizado foi de 1:200 (GONDIM et al., 2007), onde cada soro foi diluído em PBS pH 7,2. Em cada poço adicionou-se 10µL de soro diluído. Os controles, negativo e positivo, empregados na sorologia dos búfalos consistiam inicialmente de soro bovino gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado do Departamento de Patologia, FCAV-

UNESP/Jaboticabal. Em seguida, mediante os primeiros resultados positivos e negativos, os próprios soros de animais naturalmente infectados passaram a servir como controle.

O material foi incubado a 37°C por 30 minutos, submetendo-os depois a duas lavagens, com PBS por 5 minutos sob leve agitação. Após secagem, foi adicionado 10µL de conjugado anti-IgG bovino (Sigma®-Aldrich F4387 Inc., EUA) para bovinos e diluídos conforme especificação do fabricante, adicionando-se 0,5% de azul de Evans a solução. A lâmina foi incubada em câmara úmida e escura a 37°C por 30 minutos e lavada posteriormente como descrito anteriormente, porém com a cuba coberta ou envolta com papel alumínio para evitar propagação da luz. Retirou-se as lâminas do PBS, secou-se a temperatura ambiente ou em estufa por 5 minutos e em seguida realizou-se a montagem da lâmina com lamínula e glicerina tamponada (90% de glicerol e 10% PBS).

A leitura foi realizada em microscópio (Carl Zeiss RFA) com sistema de epifluorescência e aumento de 400X, considerando-se as reações positivas quando a fluorescência periférica total for observada em mais de 50% dos taquizoítos. Reações parciais ou apicais foram interpretadas como negativas.

3.6. Análise estatística e sistema de unidades

Os dados foram tabulados no pacote estatístico EPI INFO 3.5.1 (DEAN; ARNER 2008) e analisados utilizando o teste estatístico do qui-quadrado com correção de Yates ou teste exato de Fisher quando recomendado (SAMPAIO, 1998). Foi calculado as Chances de ocorrer (*odds ratio*) da análise bivariada com medidas de associação e intervalo de confiança de 95%. O pacote estatístico RStudio v.0.97 para Windows foi utilizado para realizar matriz de correlação de Spearman, a fim de testar a multicolinearidade entre as variáveis independentes ($\rho > 0,80$).

Ao final realizou-se uma análise multivariada de regressão logística não condicional, sendo o modelo inicial constituído pelas análises bivariadas com p inferior a 20% e plausibilidade biológica, levando em consideração também o poder estatístico, bem como as interações encontradas através da comparação dos coeficientes estimados e eliminação de variáveis com muitas perdas para composição do modelo inicial (KATZ, 1999). O modelo final, foi construído pela retirada das variáveis (modelo *backward*) de acordo com os valores de p ajustado pelo teste de Hosmer & Lemshow, devendo cada variável ter nível de

significância de 5% para permanecer no modelo final. A utilização dos símbolos para o sistema de unidades está de acordo com o Sistema Internacional de Unidades (INMETRO, 2003).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Prevalência de *Neospora caninum* e distribuição por propriedade e faixa etária

No presente estudo, foram testados 289 soros, onde destes 29,76% (86/289) foram positivos para anticorpos contra-*N. caninum*, com 87,5% (14/16) das propriedades apresentando ao menos um animal positivo (Tabela 1), o que evidencia uma ampla exposição do parasito nos rebanhos analisados.

Tabela 1. Frequência de bubalinos soropositivos para *Neospora caninum*, distribuídos por propriedades presentes nas mesorregiões do Estado do Rio Janeiro

Propriedade	Número de Bubalinos examinados	Positivos (%)
1	30	6 (20)
2	18	7 (38,89)
3	11	7 (63,64)
4	4	0 (0)
5	14	4 (28,57)
6	4	2 (50,0)
7	19	5 (26,32)
8	19	12 (63,16)
9	2	1 (50)
10	14	2 (14,29)
11	24	0 (0)
12	28	1 (3,57)
13	9	4 (44,44)
14	24	10 (41,67)
15	65	21 (32,31)
16	4	4 (100)
Total	289	86 (29,76)

Como não foi possível ter acesso dos registros de todos os bubalinos analisados, apenas 270 animais compuseram o banco de dados, distribuídos em 15 propriedades,

apresentando desta maneira 27,41% (74/270) de positividade, sendo 178 com idade de até 2 anos, 55 com idade de 2 a 4 anos, e 37 com idade superior a cinco anos (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição de positividade nos bubalinos em função da faixa etária

Faixa etária	Total de (%)		
	animais	positivos	negativos
≤2 anos	178 (65,93)	44 (24,72)	134 (75,28)
2 a ≤4 anos	55 (20,37)	13 (23,64)	42 (76,36)
>5 anos	37 (13,70)	17 (45,95)	20 (54,05)
Total	270 (100)	74 (27,41)	196 (72,59)

p= 0,0243

Os resultados de prevalência no presente estudo, são próximos aos observados por Guarino et al. (2000) na Itália, e por Gondim et al. (2007) no nordeste brasileiro utilizando-se também da RIFI como ferramenta de diagnóstico, conforme exemplificado na (Tabela 3), encontrando uma soropositividade de 34,6% (477/1377) e 35,9% (42/117) respectivamente. Resultados próximos a estes também foram relatados por Negrão et al. (2009) na zona oeste de São Paulo, Brasil com 38,1% (154/404) de soropositividade, contudo o ponto de corte adotado pelos autores para o teste foi de 1:100.

Resultados superiores foram relatados no Brasil por Fujii et al. (2001) em São Paulo com 64% de 222 búfalos analisados pela RIFI sendo soropositivos, entretanto o ponto de corte adotado para diluição foi de 1:25, fator que promove assim mais sensibilidade do teste com menor especificidade, justificando assim a alta prevalência encontrada, por outro lado caso fosse adotado o ponto de corte 1:200 nesse mesmo estudo a frequência seria de 7,2%.

As prevalências de anticorpos anti-*N. caninum* encontradas alguns estudos do Brasil e no mundo variam de 1,5% a 70,9% (DUBEY et al. 1998; HUONG et al. 1998; FUJII et al. 2001; SOUZA et al., 2001; GENNARI et al., 2005; VOGEL et al., 2006; CAMPERO et al., 2007; CRUDELI et al., 2007; HAJIKOLAEI et al., 2007; MEENAKSHI et al., 2007; NEGRÃO et al., 2009; VIANA et al., 2009; SILVA et al., 2010; NASIR et al., 2011; SENGUPTA et al., 2013). Embora o processo de amostragem e o tamanho de amostra devam ser considerados, tal diferença pode ser atribuída principalmente às diferentes técnicas adotadas, devendo-se também levar em consideração as diferenças de habitat das regiões estudadas. Tais fatos apresentados justificam assim as diferenças nos resultados nos estudos apresentados, o que dificulta assim a comparação direta dos resultados (Quadros 2 e 3).

Dos 178 animais com idade até dois anos, 48 tinham idade inferior a oito meses, sendo destes, 17 positivos para anticorpos contra-*N. caninum*. Contudo, não foi possível fazer pareamento vaca/bezerro para assim fazer uma inferência quanto a possibilidade de origem da infecção, uma vez que anticorpos adquiridos via colostro em bezerros de búfalos podem persistir em alguns animais por até sete meses, como demonstrado por Rodrigues et al. (2005).

Apesar de altas prevalências já relatadas nessa espécie, até o momento não existe a confirmação de que *N. caninum* é um agente abortivo em búfalas, apesar de existir um relato na Itália da observação de cisto semelhante a *N. caninum* em um feto bubalino abortado, contudo, não houve confirmação por meio de exame imunohistológico ou teste molecular (GUARINO et al. 2000).

A frequência de ocorrência de anticorpos *N. caninum* torna-se maior em função do aumento da idade dos bubalinos (GUARINO et al., 2000; FUJII et al., 2001; CAMPERO et al., 2007; SENGUPTA et al., 2013), e no presente estudo uma associação significativa entre idade e soroprevalência de *N. caninum* foi observada, com animais com idade superior a cinco anos apresentando 2,62 mais chances de exposição ao agente (Tabela 3). Na Itália, Guarino et al. (2000) verificaram que a prevalência de *N. caninum* aumentou com a idade dos búfalos, indicando assim a exposição a oocistos no ambiente.

Tabela 3. Associação da idade em búfalos sororreagentes para *Neospora caninum* nos rebanhos distribuídos por propriedades presentes nas mesorregiões do Estado do Rio Janeiro

Características	Animais		Valor de <i>p</i>	OR ^b	IC 95% ^c
	Sorologia ^a	Valores			
>5 anos	Positiva:	17 (6) ^d	0,0095	2,6246	1,2875 - 5,3503
	Negativa:	20 (7)			
<5 anos	Positiva:	57 (21)			
	Negativa:	176 (65)			
Total		270 (100)			

^a RIFI; ^b Razão de Chances; ^c Usando aproximação de Woolf; ^d Valores relativos em percentagem

4.2. Análise multivariada

Para análise multivariada, o modelo inicial foi construído utilizando as variáveis: Bubalinos convivem com outros animais, tem criação de bovinos, objetivo da produção, sistema de criação, tem gato na propriedade e faixa etária dos bubalinos.

O modelo final revelou a existência de uma associação entre o resultado sorológico e a variável faixa etária e a presença de gatos como fator de risco. (Tabela 4).

Tabela 4. Modelo final da análise multivariada, para determinação dos fatores de risco e de proteção, associados a infecção por *Neospora caninum*, nas mesorregiões que compõem o estado do Rio de Janeiro

Variáveis	Odds ratio	CI	95%	p
Tem criação de bovinos?	1,8158	3,5216	0,9363	0,0775
Tem gato na propriedade?	<u>6,0519</u>	<u>17,1290</u>	<u>2,1382</u>	<u>0,0007</u>
Faixa etária (≤ 2 anos / 2-4 anos)	1,0324	2,1710	0,4909	0,9331
Faixa etária (> 5 anos / 2-4 anos)	<u>2,7158</u>	<u>6,9330</u>	<u>1,0638</u>	<u>0,0367</u>

Escore p: 0,0000
Likelihood p:0,0000

4.2.1. Propriedades rurais e presença de outros animais

Ampla é a variedade de animais silvestres e domésticos que tiveram exposição a *N. caninum*, contudo isolamento viável só foi possível em alguns hospedeiros tais como o bovino, ovino, búfalo, cão, cavalo, bisão e veado de cauda branca (DUBEY; SCHARES, 2011).

Vários são os relatos de isolamento de cepas de *N. caninum* em bovinos em países como a Austrália, Estados Unidos da América (EUA), Itália, Japão, Portugal, Reino Unido, Suécia (DUBEY, 2003a), e Brasil (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2004). Já em búfalos, o primeiro isolado foi feito em animais naturalmente infectados e foi realizado por Rodrigues et al. (2004) no Brasil.

Uma vez que bovinos, podem ser infectados com isolados de *N. caninum* de bubalinos, possivelmente bubalinos podem ter participação na dinâmica da infecção na região de estudo, uma vez que cães ao terem acesso a tecidos de bubalinos infectados podem excretar oocistos em suas fezes (RODRIGUES et al., 2004), podendo assim infectar tanto bubalinos quanto bovinos. O que fica claro ao observar o resultado final do modelo de regressão, evidenciando que propriedades onde existe a criação de bovino, bubalinos apresentam 1,58 mais chances de serem soropositivos.

Apesar de no modelo final, o fato de propriedades criadoras de bubalinos, apresentarem criação de bovinos não ter uma significância de 5%, tal resultado encontrado sugere que mais trabalhos epidemiológicos nesta espécie sejam realizados, buscando-se elucidar o real papel da interrelação entre as duas espécies, uma vez que é muito comum bubalinos serem criados com bovinos aqui no Brasil.

4.2.1.1. Presença de gatos nas propriedades

No presente estudo, a presença de cães aparentemente não influencia na soropositividade nos rebanhos bubalinos, não tendo a variável presença de cão ou canídeos silvestres nas propriedades visitadas significância estatística ($p > 5\%$), mas ao constatar a presença de gatos nas propriedades como fator de risco, estando ela no estudo diretamente associada à soropositividade dos rebanhos alguns aspectos devem ser mencionados: 1º Apesar de em alguns estudos felídeos terem sorologia positiva, como demonstrado por Almería et al. (2013) em sua revisão, até o momento não há indícios que felinos eliminem oocistos após a ingestão de tecidos contendo cistos, e muito provavelmente felídeos de uma forma em geral atuam somente como hospedeiros intermediários (McALLISTER et al., 1998), sendo apontado em como fator de proteção, assumindo assim que a presença dos gatos, poderia ser um indicador da ausência de cães, o que resultaria em uma redução do risco de transmissão horizontal pela simples explicação da presença de gatos, poder estar associada a ausência de cães (HOBSON et al., 2005). 2º Por outro lado, é muito comum verificar a presença de gatos convivendo tranquilamente na presença de cães nas propriedades rurais brasileiras, sendo muito comum também verificar a presença dos mesmos nas instalações e até mesmo dentro dos cochos de alimentação, ou mesmo deitado sobre os alimentos dos bovinos (Figura 1).

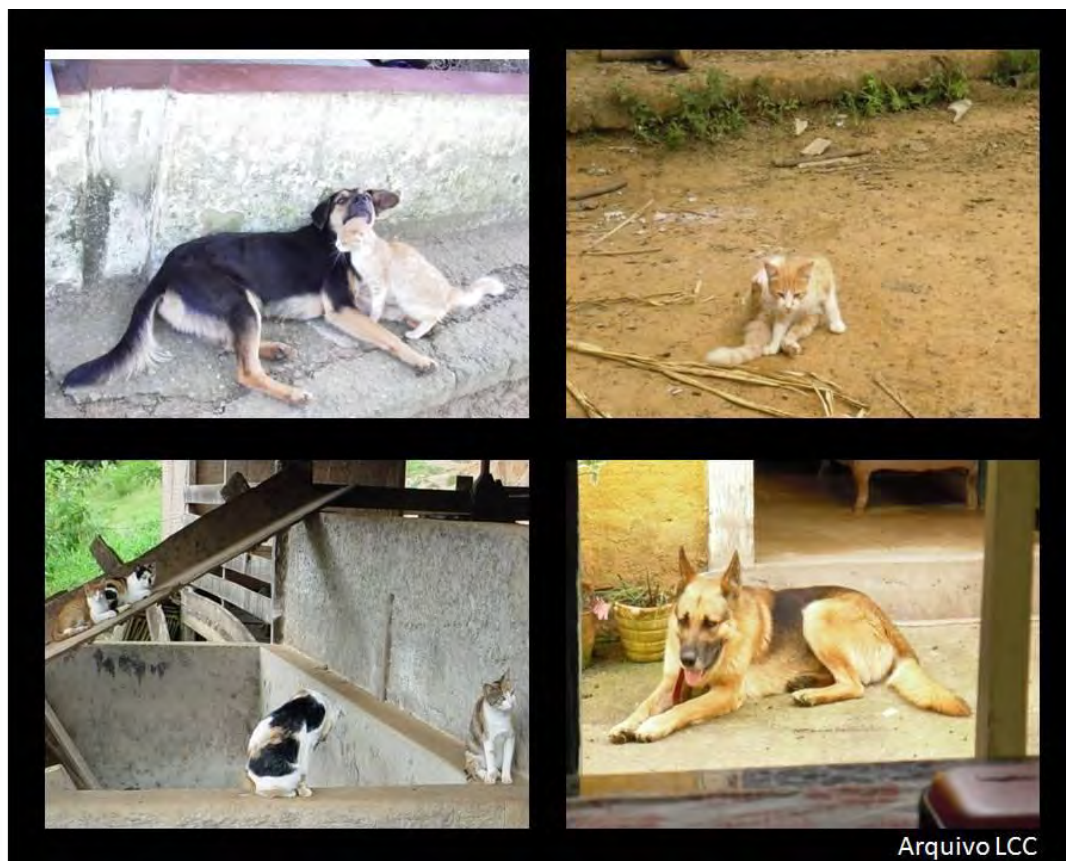


Figura 2. Verificação da presença e estreita relação de cães e gatos nas propriedades da região estudada.

Essa estreita relação de diversos animais no mesmo ambiente possibilita rotas alternativas de transmissão como evidenciado por Frenkel; Parker (1996) e Rocha et al. (2012) ao atribuir ao cão uma rota alternativa para a transmissão da toxoplasmose através da xenosmofilia. Apesar de gatos não terem o hábito de xenosmofilia, é bastante corriqueiro vê-los muitas vezes deitados no chão, bem como rolando no solo o que de certo modo não impediria que os mesmos carregassem oocistos nos seus pêlos depositando-os nos alimentos e cochos dos bubalinos, o que explicaria assim a presença de gatos como fator de risco.

4.2.2. Fatores associados à idade

Semelhantemente ao que acontece em bovinos, bubalinos tendem a ter maior soropositividade em detrimento do incremento da idade, e alguns estudos revelaram maior soropositividade em animais com faixa etária de quatro anos, ou mais (FUJII et al., 2001;

CAMPERO et al., 2007; SENGUPTA et al., 2013) tais resultados corroboram com os encontrados no presente estudo, demonstrado pelo resultado final do modelo da análise de multivariada, revelando que bubalinos com idade superior a cinco anos, quando comparados com animais com idade de 2-4 anos, possuem 2,7 mais chances de serem soropositivos; o que favorece a possibilidade de risco em adquirir a infecção no ambiente, através da transmissão horizontal (MOORE et al., 2009), tendo maiores chances de adquirir a infecção com o aumento da idade, sendo assim desafiados por mais tempo (GUARINO et al., 2000).

Como não foi possível fazer pareamento vaca/bezerro, fica difícil analisar qual a principal rota de infecção nos rebanhos analisados, contudo cabe salientar que apesar de não existir estudos quanto como se dá a transmissão horizontal na espécie em questão, os resultados encontrados no presente estudo, bem como os resultados encontrados por Fujii et al. (2001), Campero et al. (2007) e Sengupta et al. (2013) revelam que tal como acontece em bovinos, esta seja uma via importante de infecção.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Determinar a confirmação de aborto por um determinado agente, requer uma análise profunda, não se referindo apenas ao simples fato de encontrar o agente no feto, bem como encontrar altos títulos na vaca, até por que o cenário da pecuária brasileira é muito complexo, onde muitas vezes um “pé” ou a falta de alimento pode acabar sendo o responsável por um abortamento, o que revela o caráter multifatorial do aborto em ruminantes de produção.

Bubalinos são considerados animais rústicos, e esta rusticidade é revelada frente aos desafios que são submetidos nas diversas áreas de criações, existindo poucas propriedades no país com característica exclusivamente dedicadas à bubalinocultura. Via de regra, estes animais são submetidos a pastos muitas vezes degradados ou mal manejados, e mesmo assim, a causuística de abortamentos não tem sido um problema, chegando-se a especular, que bubalinos sejam resistentes em relação a *N. caninum*.

No Brasil bem como no mundo, não se tem relato de *N. caninum* promovendo abortamento em búfalas e pouco se sabe sobre a susceptibilidade desses animais ao mesmo. Neste estudo não se identificou propriedade que apresentasse problemas de abortamento, o que demonstra apesar da alta distribuição do parasito nos rebanhos analisados um convívio em equilíbrio, fato que não descarta a necessidade de maiores estudos e maiores investigações frente a ação do agente em questão em rebanhos bubalinos nacionais e no mundo.

6. CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados obtidos pôde-se concluir que:

6.1. Há uma exposição dos bubalinos a *N. caninum* com ampla distribuição nas propriedades inseridas no estado do Rio de Janeiro, Brasil;

6.2. Mediante os resultados encontrados, pensa-se que a transmissão horizontal nas propriedades analisadas seja a principal rota de transmissão de *N. caninum* em búfalos na região estudada e,

6.2. Apesar da presença de cães no presente estudo não apresentarem significância estatística, medidas de controle se fazem necessárias quanto à presença desses animais, bem como de gatos nas instalações e principalmente nas proximidades dos alimentos. Uma vez que, a estreita relação entre as duas espécies, pode ser responsável pela dispersão de oocistos de *N. caninum* no ambiente da região estudada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMERÍA, S. *Neospora caninum* and wildlife, *ISRN Parasitology*, v. 2013, p. 1-23, 2013.

ALMERÍA, S.; LÓPEZ-GATIUS, F. Bovine neosporosis: clinical and practical aspects. *Research in Veterinary Science*, v. 95, n. 2, p.303-309, 2013.

ALVAREZ-GARCIA, G.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; COSTAS, E.; REBORDOSA, X.; ORTEGA-MORA, L. M. Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. *Veterinary Research*, v. 34, n.3, p.341–352, 2003.

ALVAREZ-GARCIA, G.; ORTEGA-MORA, L.M.; DIJKSTRA, Th.; WOUDA, W. In: Ortega-Mora LM, Gottstein B, Conraths FJ, Buxton D, editors. In: *Protozoal Abortion in Farm Ruminants: Guidelines for Diagnosis and Control*. Wallingford, England: CAB International, p. 46-53. 2007.

ANDREOTTI, R.; PINCKNEY, R. D.; PIRES, P.P; SILVA, E. A. E. Evidence of *Neospora caninum* in beef cattle and dogs in the state of Mato Grosso do Sul, center-western region, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13, n. 3, p. 129-131, 2004.

ATKINSON, R. A.; COOK, R. W.; REDDACLIFF, L. A.; ROTHWELL, J.; BROADY, K. W.; HARPER, P. A. W.; ELLIS, J. T. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in a dairy cattle. *Australian Veterinary Journal*, v. 78, n. 4, p. 262-266, 2000.

BARRATT, J. L. N., HARKNESS, J., MARRIOTT, D., ELLIS, J. T., STARK, D. Importance of nonenteric protozoan infections in immunocompromised people. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 23, n. 4, p. 795-836, 2010.

BARTELS, C. J. M.; RUIZ-SANTA-QUITERA, J. A.; ARNAIZ-SECO, I.; BJÖRKMAN, C.; FRÖSSLING, J.; VON BLUMRÖDER, D.; CONRATHS, F. J.; SCHARES, G.; VAN MAANEN, C.; WOUDA, W.; ORTEGA-MORA, L. M.. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. *Veterinary Parasitology*, v.137, n. 1-2, p. 17-27, 2006.

BARTELS, C. J.; WOUDA, W.; SCHUKKEN, Y. H. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995-1997). *Theriogenology*, v. 52, n. 2, p. 247–257, 1999.

BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M. C.; HILL, D. E.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K. DUBEY, J. P. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *Journal of Parasitology*, v. 87, n. 3, p. 612-618, 2001.

BASTIANETTO, E.; FREITAS, C. M. V.; BELLO, A. C. P. P.; CUNHA, A.P.; DALLA ROSA, R. C.; LEITE, R.C. Primeiro diagnóstico de *Eimeria bareillyi* (Apicomplexa: Eimeridae) nas fezes de bezerros bubalinos (*Bubalus bubalis*) naturalmente infectados no Estado de Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, supl. 1, p.234-238, 2008.

BERGERON, N.; FECTEAU, G.; VILLENEUVE, A.; GIRARD, C.; PARÉ, J. Failure of dogs to shed oocysts after being fed bovine fetuses naturally infected by *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, v. 97, n. 2, p. 145-152, 2001.

BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Zentralblatt für Parasitenkunde*, v. 70, n. 2, p. 271-274, 1984.

BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 10, p. 1497-1507, 1999.

BUXTON, D.; McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends in Parasitology*, v. 18, n. 12, p. 546-552, 2002.

CAMPERO, C.M.; PÉREZ, A.; MOORE, D.P.; CRUDELI, G.; BENITEZ, D.; DRAGHI, M.G.; CANO, D.; KONRAD, J.L.; ODEÓN, A.C. Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) on four ranches in Corrientes province, Argentina. *Veterinary Parasitology*, v. 150, n. 1-2, p.155-158, 2007.

CANTÓN, G.; KONRAD, J.; CASPE, G.; MOORE, P.; CAMPERO, C.; CHIANINI, F. Cellular immune response in water buffalo placentas after Inoculation with *Neospora caninum* during early gestation. *Journal of Comparative Pathology*, v. 148, n. 1, p. 81, 2013.

CAVALIER-SMITH, T. Kingdom Protozoa and Its 18 Phyla. *Microbiology Review*, v. 57, n. 3, p. 953-994, 1993.

COCKRILL, W. R. *The water buffalo*. Roma: FAO, 1977. 299 p.

CRUDELI, G.; CAMPERO, C. M.; MOORE, D. P.; BENITEZ, D.; DRAGHI, G.; POLICH, D.; KONRAD, J.; CANO, D.; LEUNDA, M. R.; ARZENO, M.; ODEÓN, A. High prevalence of *Neospora caninum* antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in ranches of Corrientes, Chaco and Formosa provinces, Argentina. *Italian Journal of Animal Science*, v. 6, n. 2, p. 945-947, 2007.

CURRENT, W. L.; UPTON, S. J.; LONG, P. L. Chapter 1: Taxonomy and life cycles. In: LONG, P. L. *Coccidiosis of man and domestic animals*. 1^a Ed. Boca Raton: CRC Press, 1990, p. 2-16.

DAVISON, H. C.; FRENCH, N. P.; TREES, A. J. Herd-specific and age-specific seroprevalence of *Neospora caninum* in 14 British dairy herds. *Veterinary Record*, v. 144, n. 20, p. 547-550, 1999.

DE MAGALHÃES, V. C. S.; COSTA, S. C. L.; DE OLIVEIRA, U. V.; DE ALMEIDA, C. P.; MUNHOZ, A. D. Avaliação de um único exame sorológico na triagem de bovinos mestiços expostos à *Neospora caninum*. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 34, n. 3, p. 247-250, 2012.

DE MAREZ, T.; LIDDELL, S.; DUBEY, J. P. JENKINS, M. C.; GASBARRE, L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: Humoral and celular immune responses. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 10, p. 1647 -1657, 1999.

DE MEIRELES, G.S.; MELLO, N. M. P.; GALVAO, G. da S.; ALMEIDA, C.R.R.; FLAUSINO, W.; LOPES, C. W. G. Surto de coccidiose em bezerros búfalos (*Bubalus bubalis*) por *Eimeria bareillyi* GIL et al., 1963 (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) - Relato de casos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 34, p. 116-120, 2012.

DE NORONHA, A. C.; STARKE-BUZETTI, W.A.; DUSZYNSKI, D.W. *Eimeria* spp. in brazilian water buffalo. *The journal of parasitology*, v.95, n.1, p. 231–234, 2009.

DEAN, A.G.; ARNER, T. Epi Info: Epidemiology of program office. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/epiinfo/index.html> >. Acesso em: 20 Ago. 2008.

DIJKSTRA, Th.; EYSKER, M.; SCHARES, G.; CONRATHS, F. J.; WOUDA, W.; BARKEMA, H. W. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *International Journal for Parasitology*, v. 31, n. 8, p. 747 – 752. 2001a.

DIJKSTRA, Th; BARKEMA, H. W.; EYSKER, M.; BEIBOER, M. L.; WOUDA, W. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. *Veterinary Parasitology*, v. 100, n. 3-4, p. 161-169, 2003.

DIJKSTRA, Th; BARKEMA, H. W.; EYSKER, M.; WOUDA, W. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *International Journal for Parasitology*, v. 31, n. 2, p. 209-215, 2001b.

DIJKSTRA, Th; BARKEMA, H. W.; HESSELINK, J. W.; WOUDA, W. Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. *Veterinary Parasitology*, v. 105, n. 2, p. 89-98, 2002.

DUBEY J. P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. Pathogenesis of Bovine Neosporosis. *Journal of Comparative Pathology*, v. 134, n. 4, p. 267 - 289, 2006

DUBEY, J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, v. 39, n. 8, p. 877–882, 2009.

DUBEY, J. P. Neosporosis in cattle. *The Journal of Parasitology*, 89 (Suppl.), S42–S56. 2003a.

DUBEY, J. P. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 214, n. 8, p. 1160-1163, 1999b.

DUBEY, J. P. Recent advances in Neospora and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, v. 84, n. 3/4, p. 349-367, 1999a.

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

DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERKÅS, I.; BJÖRKMAN, C.; BLAGBURN, B. L.; BOWMAN, D. D.; BUXTON, D.; ELLIS, J. T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D. E.; HOWE, D. K.; JENKINS, M. C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A. E.; MATTSSON, J. G.; McALLISTER, M. M.; MODRÝ, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L. D.; SPEER, C. A.; TREES, A. J.; UGGLA, A.; UPTON, S. J.; WILLIAMS, D. J. L.; LINDSAY, D. S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *International Journal for Parasitology*, v. 32, n. 8, p.929–946, 2002.

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A. TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988.

DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; RAJENDRAN, C.; MISKA, K.; FERREIRA, L. R.; MARTINS, J.; KWOK, O. C. H.; CHOUDHARY, S. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, v. 181, n. 2-4, p. 282-287, 2011.

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

DUBEY, J. P.; ROMAND, S.; HILALI, M.; KWOK, O. C. H.; THULLIEZ, P. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Egypt. *International Journal for Parasitology*, v. 28, n. 3, p. 527-529, 1998.

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

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

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 20, n. 2, p. 323–367, 2007.

DUBEY, J. P.; SREEKUMAR, C.; KNICKMAN, E.; MISKA, K. B.; VIANNA, M.C.B.; KWOK, O.C.H.; HILL, D. E.; JENKINS, M.C., LINDSAY, D.S., GREENE, C.E. Biologic, morphologic, and molecular characterization of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. *International Journal for Parasitology*, v. 34, n. 10, p. 1157–1167, 2004.

DUBEY, J. P.; WOUDA, W. ; MUSKENS, J. Fatal intestinal coccidiosis in a three-week-old buffalo calf (*Bubalus bubalis*). *Journal of Parasitology*, v.94, n.6, p. 1289-1294, 2008.

DYER, R. M.; JENKINS, M. C.; KWOK, O. C.; DOUGLAS, L. W.; DUBEY, J. P. Serological survey of *Neospora caninum* infection in a closed dairy cattle herd in Maryland: risk of serologic reactivity by production groups. *Veterinary Parasitology*, v. 90, n. 3, p. 171-181, 2000.

ENTRICAN, G. Immune regulation during pregnancy and host pathogen interactions in infectious abortion. *Journal of Comparative Pathology*, v. 126, n. 2-3, p. 79-94, 2002.

FAGIOLO, A.; RONCORONI, C.; LAI, O.; BORGHESE, A. Buffaloes Pathologies In: BORGHESE. *Buffalo Production and Reserach*. Roma: FAO, 2005., p.249-297.

FAYER, R. Epidemiology of protozoan infection: The Coccidia. *Veterinary Parasitology*, v.6, n. 1-3, p. 75-103, 1980.

FIORETTI, D. P.; PASQUAI, P.; DIAFERIA, M.; MANGILI, V.; ROSIGNOLI, L. *Neospora caninum* infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. *Journal of Veterinary Medicine B*, v. 50, n. 8, p. 399–404, 2003.

FRENCH, N. P.; CLANCY, D.; DAVISON, H. C.; TREES, A. J. Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: Transmission and options for control. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 10, p. 1691-1704, 1999.

FRENKEL, J.K.; PARKER, B.B. An apparent role of dogs in the transmission of *Toxoplasma gondii*. The probable importance of xenosmophilia. *Annals New York Academy of Science*, v. 791, p. 402- 407, 1996.

FUJII, T. U.; KASAI, N.; NISHI, S. M.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Seroprevalence of *Neospora caninum* in female water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the southeastern region of Brazil, *Veterinary Parasitology*, v. 99, n. 4, p.331-334, 2001.

GENNARI, S. M. *Neospora caninum* no Brasil: situação atual da pesquisa. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13, n. 1, p. 23-28, 2004.

GENNARI, S. M.; RODRIGUES, A. A. R.; VIANA, R. B.; CARDOSO, E. C. Occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the Northern region of Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.134, n. p.169-171, 2005.

GONDIM, L. F. P.; GAO, L.; McALLISTER, M. M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. *Journal of Parasitology*, v. 88, n.6, p.1159-1163, 2002.

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

GONDIM, L. F. P.; McALLISTER, M. M.; ANDERSON-SPRECHER, R. C.; BJORKMAN, C.; LOCK, T. F.; FIRKINS, L. D.; GAO, L.; FISCHER, W. R. Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. *Journal of Parasitology*, v. 90, n. 6, p. 1394-1400, 2004b.

GONDIM, L. F. P.; McALLISTER, M. M.; MATEUS-PINILLA, N. E.; PITT, W. L.; MECH, L. D.; NELSON, M. E. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. *Journal of Parasitology*, v. 90, n. 6, p. 1361–1365, 2004c.

GONDIM, L. F. P.; PINHEIRO, A. M.; ALMEIDA, M. A. O. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em búfalos (*Bubalus bubalis*) criados no estado da Bahia. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.8, n.2, p. 92-96, 2007.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 13, n. 1, p. 133-150, 2013.

GRIFFITHS, R.B. Parasites and parasitic diseases. In: COCKRILL, W. R. *The water buffalo*. Roma: FAO, 1977. p. 79-96.

GUARINO, A; FUSCO, G.; SAVINI, G.; DI FRANCESCO, G.; CRINGOLI, G. Neosporosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. *Veterinary Parasitology*, v. 91, n. 1-2, p. 15-21, 2000.

HADDAD, J.P.A.; DOHOO, I.R.; VANLEEWEN, J.A. A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle - a Canadian perspective. *The Canadian Veterinary Journal*, v.46, n.3, p. 230-243, 2005.

HAJIKOLAEI, M. R. H.; GORANINEJAD, S.; HAMIDINEJAT, H.; GHORBANPOUR, M.; PARYAB, R, Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the south-western region of Iran. *Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy*, v. 51, n. 2, p. 233-235, 2007.

HAYAT, C. S., RUKNUDIN,A.; HAYAT, B., AKHTAR,M. Prevalence of coccidiosis in cattle and buffaloes with emphasis on age, breed, sex, season and management. *Pakistan Veterinary Journal*, v. 14, p. 214–217, 1994.

HEMPHILL, A.; FUCHS, N.; SONDA, S.; HEHL, A. The antigenic composition of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 8, p.1175-1188, 1999.

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIS, B. Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitology Research*, v. 82, n. 6, p. 497-504, 1996.

HOBSON, J. C., T. F. DUFFIELD, D. KELTON, K. LISSEMORE, S. K. HIETALA, K. E. LESLIE, B. MCEWEN, AND A. S. PEREGRINE. Risk factors associated with *Neospora caninum* abortion in Ontario Holstein dairy herds. *Veterinary Parasitology*, v.127, n.3-4, p.177–188, 2005.

HOUNG, L. T. T.; LJUNGSTROM, B. L.; UGGLA, A.; BJORKMAN, C. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes in southern Vietnam. *Veterinary Parasitology*, v.75, n. 1, p. 53-57, 1998.

IBGE. Censo Agropecuário Instituto brasileiro de geografia e estatística, 2006. Disponível em:<<http://www.ibge.com.br/estadosat/temas.php?sigla=rj&tema=censoagro>>.Acesso em: 30 mar. 2010.

INMETRO, *Sistema Internacional de Unidades*, 8ª Ed. Rio de Janeiro: Inmetro, 2003, 115 p.

JARDINE, J. E. The ultrastructure of bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. *Veterinary Parasitology*, v. 62, n. 3-4, p. 231-240, 1996.

JENKINS, M.; BASZLER, T.; BJORKMAN, C.; SCHARES, G.; WILLIAMS, D. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *International Journal for parasitology*, v. 32, n. 5, p. 631-636, 2002.

JENSEN, A. M.; BJORKMAN, C.; KJELDEN, A. M.; WEDDERKOPP, A.; WILLADSEN, C.; UGGLA, A.; LIND, P. Association of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 40, n. 3-4, p. 151-163, 1999.

KATZ, M.H. *Multivariable Analysis: A Practical Guide for Clinicians*. Cambridge University Press, Cambridge, 1999. 192 pp.

KING, J. S.; SLAPETA, J.; JENKINS, D. J.; AL-QASSAB, S. E.; ELLIS, J. T.; WINDSOR, P. A. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, v. 40, n. 8, p. 945-950, 2010.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, v. 82, n. 4, p. 327-333, 1999.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V. T.; RICHARTZ, R. R. T. B.; GASINO-JOINEAU, M. E.; VINNE, R.; PINCKNEY, R. D. Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.13, n.3, p.103-109, 2004.

LOPES, C. W. G.; FLAUSINO, W. *Hammondia heydorni* (Apicomplexa: Sarcocystidae) Infection in dogs in Brazil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 4, n.2, p. 31-32, 1981.

LÓPEZ-GATIUS, F.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; MURUGAVEL, K.; PABÓN, M.; FERRER, D.; ALMERÍA, S. Neospora-associated abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in north-east Spain. *Journal of Veterinary Medicine B*, v. 51, n.7, p. 348-352, 2004.

MACALDOWIE, C.; MALEY, S. W.; WRIGHT, S.; BARTLEY, P.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D.; INNES, E. A. Placental pathology associated with foetal death in cattle experimentally infected with *Neospora caninum* by two different challenge routes in early pregnancy. *Journal of Comparative Pathology*, v. 131, n. 2-3, p. 142–156, 2004.

MAINAR-JAIME, R. C., THURMOND, M. C., BERZAL-HERRANZ, B.; HIETALA, S. K. Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. *Veterinary Record*, v. 145, n. 3, p.72–75, 1999.

MALEY, S. W.; BUXTON, D.; ERA, A. G.; WRIGHT, S. E.; SCHOCK, A.; BARTLEY, P. M.; ESTEBAN-REDONDO, I.; SWALES, C.; HAMILTON, C. M.; SALES, J.; INNES, E. A. Pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: Inoculation at mid-gestation. *Journal of Comparative Pathology*, v.129, n.2-3, p.186-195, 2003.

MASON, I. L. Species, types and breeds. In: COCKRILL, W. R. *The water buffalo*. Roma: FAO, 1977. p. 1-22.

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

McGARRY, J. W., STOCKTON, C. M., WILLIAMS, D. J. L.; TREES, A. J. Protracted shedding of oocysts of *Neospora caninum* by a naturally infected foxhound. *Journal of Parasitology*, v. 89, n. 3, p. 628–630, 2003.

MEENAKSHI, K. S. S.; BALL, M. S.; KUMAR, H.; SHARMA, S.; SIDHU, P. K.; SREEKUMAR, C.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle and water buffaloes in India. *Journal of Parasitology*, v. 93, n. 6, p. 1374-1377, 2007.

MELO, C. B.; LEITE, R. C.; SOUZA, G. N.; LEITE, R. C. Frequência de infecção por *Neospora caninum* em dois diferentes sistemas de produção de leite e fatores predisponentes à infecção em Bovinos Minas Gerais. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 10, n. 2, p. 67-74, 2001.

MOORE, D. P.; PÉREZ A.; AGLIANO, S.; BRACE, M.; CANTÓN, G.; CANO, D.; LEUNDA, M. R.; ODEÓN, A. C.; ODRIOZOLA, E.; CAMPERO, C. M. Risk factors associated with *Neospora caninum* infections in cattle in Argentina. *Veterinary Parasitology*, v. 161, n. 1-2, p. 122-125, 2009.

MUNHOZ, A. D.; FLAUSINO, W.; SILVA, R. T. DA; ALMEIDA, C. R. R. DE; LOPES, C. W. G. Distribuição de anticorpos contra *Neospora caninum* em vacas leiteiras dos municípios de Resende e Rio Claro, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 15, n. 3, p. 101-104, 2006.

NASIR, A.; ASHRAF, M.; KHAN, M. S.; YAQUB, T.; JAVEED, A.; AVAIS, M.; AKHTAR, F. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy buffaloes in Lahore District, Pakistan. *The Journal of Parasitology*, v. 97, n.3, p. 541-543, 2011.

NEGRÃO , C.B.; AGUIAR, D.M; ORLANDELLI, R.C.; SARTOR, I.F. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em fêmeas bubalinas da região oeste do estado de São Paulo. *Arquivo Instituto Biológico*, v.76, n.4, p.685-688, 2009.

ORTEGA-MORA, L. M.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; GÓMEZ-BAUTISTA, M. Diagnosis of bovine neosporosis: Recent advances and perspectives. *Acta Parasitologica*, v. 51, n.1, p. 1-14, 2006.

O'TOOLE, D.; JEFFREY, M. Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. *Veterinary Record*, v. 121, n. 24, p.563-566, 1987.

PANDE, B.P.; BHATIA, B.B.; CHAUHAN, P.P.S. Sexual stages and associated lesion in *Eimeria bareillyi* of buffalo calves. *Indian Journal of Animal Sciences*, v.41, p.151-154, 1971.

PARÉ, J.; FECTEAU, G.; FORTIN, M.; MARSOLAIS, G. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 213, n.11, p. 1595-1598, 1998.

PARÉ, J.; THURMOND, M. C.; HIETALLA, S. K. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhoo mortality. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 60, n. 2, p. 133-139, 1996.

PARISH, S. M.; MAAG-MILLER, L.; BESSER, T. E.; WEIDNER, J. P.; McELWAIN, T.; KNOWLES, D. P.; LEATHERS, C. W. Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 191, n. 12, p. 1599-1600, 1987.

PEREIRA, M. J. S.; LOPES, C. W. G. Further studies on the experimental transmission of *Hammondia heydorni* (Tadros & Laarman, 1976) Dubey, 1977. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, v. 13, n. 1, p. 11-16, 1990.

PEREIRA, M. J. S.; LOPES, C. W. G. Infection of a crab eating fox (*Cerdocyon thous*) by *Hammondia heydorni* (Apicomplexa: Sarcocystidae) from goat. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, v. 10, n.1-2, p. 83-86, 1987.

PETERS, M.; LUÈTKEFELS, E. HECKEROTH, A.R.; SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *International Journal for Parasitology*, v.31, n.10, p.1144-1148, 2001.

REICHEL, M. P.; AYANEGUI-ALCÉRRECA, M. A.; GONDIM, L. F. P.; ELLIS, J. T. What is the global economic impact os *Neospora caninum* in cattle – The billion dollar question. *International Journal for Parasitology*, v. 43, n. 2, p. 133-142, 2013.

RINALDI, L.; FUSCO, G.; MUSELLA, V.; VENEZIANO, V.; GUARINO, A.; TADDEI, R.; CRINGOLI, G. *Neospora caninum* in pastured cattle: determination of climatic, environmental, farm management and individual animal risk factors using remote sensing and geographical information systems. *Veterinary Parasitology*, v. 128, n. 3-4, p. 219-230, 2005.

ROCHA, E. M. da; NUNES, A. A.; FLAUSINO, W.; ROCHA, M. N. M. da; SOUZA, W. J. S. de; LOPES, C. W. G. Cats and dogs as risk factors for pregnant women on *Toxoplasma gondii* infection at the region of araguarina in the state of Tocantins, Brazil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 34, n. 2, p. 79-82, 2012.

RODRIGUES, A. A. R.; GENNARI, S. M.; AGUIAR, D. M.; SREEKUMAR, C.; HILL, D. E. MISKA, K. B.; VIANNA, M.C.B.; DUBEY, J. P. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.124, n. 3-4, p.139-150, 2004.

RODRIGUES, A. A. R.; GENNARI, S. M.; PAULA, V. S. O.; AGUIAR, D. M.; FUJII, T. U.; STARKE-BUZETI, W.; MACHADO, R. Z.; DUBEY, J. P. Serological responses to *Neospora caninum* in experimentally and naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Veterinary Parasitology*, v. 129, n. 1-2, p. 21-24, 2005.

ROMERO, J.J.; FRANKENA, K. The effect of the dam–calf relationship on serostatus to *Neospora caninum* on 20 Costa Rican dairy farms. *Veterinary Parasitology*, v.114, n.3, p.159-171, 2003.

SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.

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

SANYAL, P. K.; RUPRAH, N. S. Endogenous stages and pathology in *Eimeria zurnii* coccidiosis in buffalo calves. *Sri Lanka Veterinary Journal*, v. 32, p.22–25, 1984.

SCHARES, G., PANTCHEV, N., BARUTZKI, D., HEYDORN, A.O., BAUER, C. AND CONRATHS, F.J. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. *International Journal for Parasitology*, v. 35, n. 14, p. 1525-1537, 2005.

SCHARES, G.; A.; BÄRWALD, A.; STAUBACH, C.; ZILLER, M.; KLÖSS; D.; SCHRODER, R.; LABOHM, R.; DRÄGER, K.; FASEN, W.; HESS, R. G.; CONRATHS, F.J. Potential risk factors for bovine *Neospora caninum* infection in Germany are not under the control of the farmers. *Parasitology*, v. 129, n. 3, p. 301–309, 2004.

SCHARES, G.; BARWALD, A.; STAUBACH, C.; SONDGEM, P.; RAUSER, M.; PETERS, M.; WURM, R.; SELHORST, T.; CONRATHS, F. J. p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum* –associated bovine abortion. *Veterinary Parasitology*, v. 106, n. 4, p. 293-305, 2002.

SENGUPTA, P. P.; BALUMAHENDIRAN, M.; RAGHAVENDRA, A. G.; HONNAPPA, T. G.; GAJENDRAGAD, M. R.; PRABHUDAS, K. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dairy cattle and water buffaloes and associated abortions in plateau of Southern Peninsular India. *Tropical Animal Health and Production*, v. 45, n. 1, p. 205-210, 2013.

SILVA, S. P.; MOTA, R. A.; FARIA, E.B.; FERNANDES, E. F. T. S.; NETO, O. L. S.; ALBUQUERQUE, P. P. F.; DIAS, H. L. T. Anticorpos IgG anti-*Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em búfalas (*Bubalus bubalis*) criadas no estado do Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 30, n. 5, p. 443-446, 2010.

SILVA, S. P.; MOTA, R.A.; FARIA, E.B.; CASSEB, A. R.; CASSEB, L. M. N.; DIAS, H. L. T. Comparação das técnicas de ELISA indireto e Imunofluorescência indireta na detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em búfalas (*Bubalus bubalis*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 4, p. 431-434, 2013.

SOULSBY, E. J. L. *Parasitologia y enfermedades parasitarias em los animales domésticos*. 7a ed. Interamericana, Cidade de México, 1987. 823p.

SOUZA, L. M.; NASCIMENTO, A. A.; FURUTA, P. I.; BASSO, L. M. S.; SILVEIRA, D. M.; COSTA, A. J. Detecção de anticorpos contra *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em soros de bubalinos (*Bubalus bubalis*) no Estado de São Paulo, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 22, n.1, p. 39-48, 2001.

THILSTED, J. P.; DUBEY, J. P. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v. 1, n. 3, p. 205-209, 1989.

THURMOND, M. C.; HIETALLA, S. K.; BLANCHARD, P. C. Herd-based diagnosis of *Neospora caninum*-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 9, n. 1, p. 44-49, 1997.

TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends in Parasitology*, v.2 1, n. 12, p. 558–561, 2005.

TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. Neosporosis in United Kingdom. In: HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B. A European Perspective on *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, v. 30, n. 8, p. 891-893, 2000.

TRESS, A. J.; DAVISON, H. C.; INNES, E. A.; WASTLING, J. M. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 8, p. 1195-1200, 1999.

TRESS, J. A.; McALLISTER, M. M.; GUY, C. S.; McGARRY, J. W.; SMITH, R. F.; WILLIAMS, D. J. L. *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. *Veterinary Parasitology*, v. 109, n. 1-2, p. 147-154, 2002.

VIANA, R.B.; DEL FAVA, C.; MOURA, A.C.B.; CARDOSO, E.C.; ARAÚJO, C.V.; MONTEIRO, B.M.; PITUCO, E.M.; VASCONCELLOS, S.A. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum*, *Brucella* sp. e *Leptospira* spp. em búfalos (*Bubalus bubalis*) criados na Amazônia. *Arquivo Instituto Biológico*, v. 76, n. 3, p. 453-457, 2009.

VOGEL, F. S. F.; ARENHART. S.; BAUERMAN, F.V. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e bubalinos no Estado do Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*, v.36, n.6, p.1948-1951, 2006.

WAPENAAR, W.; BARKEMA, H. W.; SCHARES, G.; ROUVINEN-WATT, K.; ZEIJLEMAKER, L.; POORTER, B.; O'HANDLEY, R. M.; KWOK, O. C.; DUBEY, J. P. Evaluation of four serological techniques to determine the seroprevalence of *Neospora caninum* in foxes (*Vulpes vulpes*) and coyotes (*Canis latrans*) on Prince Edward Island, Canada. *Veterinary Parasitology*, v. 145, n. 1-2, p. 51-58, 2007.

WOUDA, W.; BARTELS, C. J. M.; DE MOEN, A. R. Characteristics of *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995-1997). *Theriogenology*, v. 52, n. 2, p. 233-245, 1999b.

WOUDA, W.; DIJKSTRA, T.; KRAMER, A. M. H.; MAANEN, C.; VAN BRINKHOF, J. M. A. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 10, p. 1677-1682, 1999a.

WOUDA, W.; DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. *Journal of Parasitology*, v.83, n.3, p. 545-547, 1997.

WOUDA, W.; MOEN, A. R.; SCHUKKEN, Y. H. Abortion risk in progeny of cows that experienced a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology*, v. 49, n. 7, p. 1311-1316, 1998.

YAMANE, I.; KOKUHO, T.; SHIMURA, K.; ETO, M.; SHIBAHARA, T.; HARITANI, M.; OUCHI, Y.; SVERLOW, K.; CONRAD, P. A. In vitro isolation and characterization of a bovine *Neospora* species in Japan. *Research in Veterinary Science*, v. 63, n. 1. p. 77-80, 1997.

8. ANEXOS

Anexo 1.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
BR 465, Km 7 – Centro – Seropédica – Rio de Janeiro – CEP: 23.890-000
Telefone: (21) 2682-3051 – E-mail: ceua.iv.ufrj@gmail.com

Seropédica 04 de abril de 2014

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que foi aprovado o protocolo de número 007/2014 intitulado **“FATORES ASSOCIADOS À PRESENÇA DE *Neospora caninum* (APICOMPLEXA: TOXOPLASMATINAE) EM *Bubalus bubalis* NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL** “ encaminhado pelo Professor (a) do Departamento de Parasitologia Animal, Carlos Wilson Gomes Lopes. Informamos que foi aprovado em reunião ordinária da CEUA-IV realizada no dia 04 de abril de 2014, após avaliação do plenário da referida Comissão.

Handwritten signature of Fabio Barbour Scott in blue ink.

Fabio Barbour Scott
Coordenador CEUA-IV

Handwritten signature of Jonimar Pereira Paiva in blue ink.

Jonimar Pereira Paiva
Vice-Coodenador CEUA-IV

Anexo 2.

QUESTIONÁRIO

IDENTIFICAÇÃO

Nome do proprietário:

Nome da propriedade:

Município:

Distrito:

Localidade

Acesso:

Endereço para correspondência:

Cidade:

CEP:

Tel:

email:

DADOS GERAIS

Nº total de búfalos _____

Objetivo da produção ()carne ()leite ()mista

Sistema de criação: ()extensivo ()semi-intensivo ()intensive

Convive com outros animais ()sim ()não

Quais? ()equino ()bovino ()canino ()feline ()aves ()outros _____

Presença de animais silvestres ao redor da propriedade? ()sim ()não

Quais? ()capivara ()gambá ()Anta ()pequenos roedores

()outros _____

Presença de ectoparasitas () sim () não

Quais? () carrapatos () piolhos ()outro _____

Grau de infestação () baixa () moderada () alta

Usa produto ectoparasiticida: () sim () não Qual? _____

Frequência de aplicação _____

Usa anti-helmintico: () sim () não Qual? _____

Frequência da vermifugação _____

Usa outro(s) medicamento(s): () sim () não Qual? _____

Idade ao desmame

Tipo de vegetação: _____

O(s) pasto(s) é (são) próximos de alguma mata () sim () não ()alguns

Observações

IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL

Nome da propriedade:

Nome do animal:

Sexo:

Idade:

Raça:

Origem do animal

Grau de infestação parasitária:

Observações:

Anexo 3. Resultados de todas as variáveis testadas, citadas ou não citadas no corpo da tese frente a positividade ou negatividade dos bubalinos a anticorpos anti-*N.Caninum*, pela RIFI.

Variáveis	OR	Valor de p¹
Objetivo da produção		0,1752
Sistema de criação		0,0173
Convive com outros animais	3,21	0,0140
Convive com equino	0,82	0,7740
Convive com bovino	2,43	0,0057
Convive com canino	1,29	0,4012
Convive com felino	6,74	0,0001
Convive com aves	1,35	0,3308
Presença de animais silvestres ao redor da propriedade?		Indeterminado**
Tem capivara ao redor da propriedade?	1,43	0,4358
Tem gambá ao redor da propriedade?	1,45	0,3969
Tem anta ou paca ao redor da propriedade?	0,63	0,2847
Tem pequenos roedores ao redor da propriedade?	1,58	0,3921
Tem capivara ao redor da propriedade?	1,43	0,4358
Tem canino silvestre ao redor da propriedade		0,0004*
Tem felino silvestre ao redor da propriedade	0,36	0,0117
Idade ao desmame		0,0026
O(s) pasto(s) é (são) próximos de alguma mata		Indeterminado**
Sexo do animal	1,06	0,8890
Idade do animal		
Raça do animal		0,4103
Origem do animal	0,51	0,2585

¹ Qui-quadrado com nível de significância de 95%

* Todos os animais associados a essa variável não foram sororreagentes

** Todos os animais, apresentavam esta variável

Anexo 4. Valores de “p” observados nas variáveis relacionadas a epidemiologia da neosporose bubalina nas mesorregiões que compõem o estado do Rio de Janeiro, Brasil, com plausibilidade biológica.

Variáveis (p<0,05)	OR	Valor de p
Faixa etária		0,027
Propriedade tem criação de bovinos?	2,43	0,005
Propriedade tem outros animais no mesmo ambiente?	3,21	0,014
Qual o sistema de criação?		0,017
Tem gato na propriedade?	6,74	0,000

Variáveis (0,05<p<0,20)	OR	Valor de p
Qual o objetivo da produção?		0,1752
Tem criação de equino	1,53	0,1777

Variáveis (>0,20)	Valor de p
Tem criação de galinhas?	0,330
Propriedade tem criação de equinos?	0,774
Qual a origem do animal	0,258
Raça dos bubalinos	0,410
Sexo dos bubalinos	0,932
Propriedade tem anta ou paca?	0,285
Tem cão na propriedade?	0,401
Tem capivara na propriedade?	0,435
Tem gambá na propriedade?	0,396
Propriedade tem pequeno roedor?	0,392

ANEXO 5. GALVÃO, G. da S.; GONDIM, L. F. P.; PEREIRA, M. J. S.; DE OLIVEIRA, U. V.; MUNHOZ, A. D. Soropositividade para *Neospora caninum* e associação ao abortamento e natimortos em rebanhos leiteiros do sudeste da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 33, n. 4, p. 234-237, 2011.

SOROPOSITIVIDADE PARA *Neospora caninum* E ASSOCIAÇÃO AO ABORTAMENTO E NATIMORTOS EM REBANHOS LEITEIROS DO SUDESTE DA BAHIA, BRASIL*

Neospora caninum SEROPOSITIVITY AND ASSOCIATION WITH ABORTIONS AND STILLBIRTHS IN DAIRY CATTLE FROM SOUTHEASTERN BAHIA, BRAZIL

Gideão da Silva Galvão¹, Luís Fernando Pita Gondim², Maria Júlia Salim Pereira³, Uillians Volkart de Oliveira⁴ e Alexandre Dias Munhoz⁵

ABSTRACT. Galvão, G.da S., Gondim, L.F.P., Pereira, M.J.S., de Oliveira, U.V. & Munhoz, A.D. [*Neospora caninum* seropositivity and association with abortions and stillbirths in dairy cattle from Southeastern Bahia, Brazil]. Soropositividade para *Neospora caninum* e associação ao abortamento e natimortos em rebanhos leiteiros do sudeste da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 33(4):234-237, 2011. Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna, Km 16, Salobrinho, Ilhéus, 45662000, BA, Brasil. E-mail: munhoz@uesc.br

This study aimed to determine the presence of antibodies against *Neospora caninum* and the association between seropositivity and cases of abortion and stillborn in dairy cattle belonging to the Southeast of Bahia, Brazil. Serum samples were collected from 755 cattle with ages equal or superior to five months. Serology was performed by an indirect immunofluorescence test with a cutoff of 1:200. The Fisher exact test was used with a significance level of 5% to determine the association between seropositivity and cases of abortion and stillborn calves. The frequency of seropositive animals in herds was 13% (98/755), with titles ranging from 1:200 to 1:3200. Antibodies against *N. caninum* were detected in 18 (94.7%) of 19 farms, with positivity ranging from 1.1 to 63.6%. The history of abortion ($p=0.005$) and stillbirth ($p=0.012$) were significantly associated with seropositivity, being respectively, 3.76 and 7.44 times more frequent in seropositive cows. The results show the exposure of cattle to *N. caninum* in the studied microrregion and indicate that neosporosis should be included in the differential diagnosis of bovine abortion in the region.

KEY WORDS. Cattle, neosporosis, prevalence.

RESUMO. Este estudo teve como objetivo verificar a presença de anticorpos contra *Neospora caninum* e a associação entre a soropositividade e os casos de abortamentos e de bezerros natimortos em rebanhos leiteiros pertencentes à região Sudeste da Bahia, Brasil. Amostras de soro de 755 bovinos

*Recebido em 02 de março de 2011.

Aceito para publicação em 30 de junho de 2011.

¹Médico-veterinário. *M.Ci.Ani.*, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR-465 km-07, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: galvaovet@gmail.com - bolsista CAPES

²Médico-veterinário. *PhiD*, Departamento de Patologia e Clínicas, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Av. Ademar de Barros, 500, Ondina, Salvador, BA 40170-110, Brasil. E-mail: pita@ufba.br

³Médica-veterinária. *Dr.Ci.Ani.*, Departamento de Parasitologia Animal, IV, UFRRJ, BR-465 km-07, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: m.salim@ufrj.br

⁴Médico-veterinário. Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-000. - bolsista CNPq. E-mail: uvolkart@hotmail.com

⁵Médico-veterinário. *Dr.CsVs*, Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, UESC, Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-000. E-mail: munhoz@uesc.br

com idades a partir de cinco meses foram submetidas à técnica de reação de imunofluorescência indireta com ponto de corte de 1:200. O teste exato de Fisher foi utilizado com nível de significância de 5%. A frequência de animais soropositivos nos rebanhos foi de 13% (98/755), com títulos variando de 1:200 a 1:3200. Anticorpos contra-*N. caninum* foram detectados em 18 (94,7%) das 19 propriedades, com positividade variando de 1,1 a 63,6%. O histórico de abortamento ($p=0,005$) e a ocorrência de natimortos ($p=0,012$) foram significativamente associados à soropositividade, sendo respectivamente, 3,76 e 7,44 vezes mais frequente em vacas soropositivas. Os resultados obtidos evidenciam a exposição de bovinos ao agente na microrregião estudada, devendo-se incluir o parasito no diagnóstico diferencial nos possíveis casos de abortamento bovino na região.

PALAVRAS-CHAVE. Bovinos, neosporose, prevalência.

INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório, que infecta diversos mamíferos e aves (Dubey 2003, Dubey et al. 2007, Costa et al. 2008). Em bovinos Thilsted & Dubey (1989) detectaram *N. caninum* em um rebanho com histórico de aborto persistente no Novo México, EUA e, desde então, o parasito é apontado como uma das principais causas de abortamento bovino em todo o mundo (Dubey 2003).

O abortamento é o único sintoma de neosporose em vacas adultas, ocorrendo com maior frequência entre 5º e 6º mês de gestação. Nestas circunstâncias, o feto pode morrer no útero, ser absorvido, mumificado, autolisado, natimorto; podendo nascer vivo doente ou normal, porém cronicamente infectado (Dubey 2003).

As prevalências de anticorpos anti-*N. caninum* encontradas em propriedades leiteiras em alguns estudos do Brasil e no mundo variam de 2,9 a 89% (Gondim et al. 1999, Dijkstra et al. 2001, Canada et al. 2004, Bartels et al. 2006, Munhoz et al. 2006) e a presença do agente associado a ocorrência de abortamento é descrita por vários autores (Bartels et al. 1999, Wouda et al. 1999, Corbellini et al. 2002).

Bovinos infectam-se por ingestão de oocistos esporulados no ambiente (De Marez et al. 1999) ou por transmissão transplacentária, que se refere a passagem do parasito via placenta de uma vaca com infecção persistente para o feto (Trees & Williams 2005).

Embora a neosporose seja um problema comum em muitos países com produção leiteira intensiva (Dubey 2003), envolvendo animais de origem europeia (Bartels et al. 2006), poucas são as pesquisas em vacas leiteiras mestiças que passam por pouca pressão produtiva, o que motivou a realização deste estudo, cujo objetivo foi verificar a presença de anticorpos contra *N. caninum* em rebanhos leiteiros do Sudeste da Bahia, Brasil e sua associação com casos de abortamentos e natimortos.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado nos municípios de Ilhéus e Itabuna, inseridos na Microrregião Ilhéus-Itabuna (Altitude de 47 m; Latitude Sul 14°70' e Longitude Oeste 39°03'), no Estado da Bahia no período de março de 2008 a outubro de 2009. Foi utilizada uma amostra não probabilística de 755 animais, com idade mínima de cinco meses, provenientes de 19 propriedades leiteiras selecionadas a partir do cadastro da Agência de Defesa Agropecuária do Estado da Bahia (ADAB). Em cada propriedade foram coletadas amostras de pelos menos 20% do rebanho (Wouda et al. 1999). Critérios, como histórico de abortamento ou problemas reprodutivos, não foram utilizados na seleção dos animais.

A coleta de sangue foi realizada por punção das veias jugular ou coccígea, utilizando-se tubo sem anticoagulante. As amostras foram centrifugadas a 350 x g por 10 minutos, para obtenção do soro e, posteriormente realizada a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), segundo Yamane et al. (1997), com ponte de corte de 1:200 (Dubey & Lindsay 1996).

Uma entrevista semi-estruturada foi realizada, com os responsáveis das propriedades, para obtenção de dados sobre a ocorrência de abortos e de natimortos e um banco de dados foi montado no programa EPI INFO 3.5.1 (Dean & Arnet 2008), no qual foi realizado o teste exato de Fisher (Sampaio 1998) com nível de significância estabelecido em 5%, para avaliar a associação da soropositividade com a presença de abortamentos e bezerros natimortos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, dos 755 soros testados, 13% (98/755) foram positivos para anticorpos contra-*N. caninum* (Tabela 1), sendo 67 vacas, cinco novilhas e 26 bezerros. Os títulos variaram de 1:200 a 1:3200 e 94,7% (18/19) das propriedades apresentaram ao

Tabela 1. Frequência de bovinos soropositivos para *Neospora caninum*, distribuídos por propriedades, na microrregião Ilhéus-Itabuna, Estado da Bahia

Fazenda	Número de Bovinos examinados	Positivos	Porcentagem	Total de bovinos por propriedade
1	11	7	63,6	14
2	44	13	29,5	66
3	55	7	12,7	250
4	94	1	1,1	203
5	22	3	13,6	43
6	24	2	8,3	41
7	27	4	14,8	45
8	12	2	16,7	18
9	88	7	8	216
10	73	16	21,9	133
11	35	6	17,1	120
12	47	4	8,5	67
13	14	3	21,4	60
14	29	2	6,9	42
15	129	15	11,6	277
16	12	3	25	33
17	4	1	25	18
18	18	0	0	52
19	17	2	11,8	66
Total	755	98	13	1764

menos um animal positivo, o que evidencia uma ampla exposição do parasito nos rebanhos. Estes resultados são semelhantes aos observados por Gondim et al. (1999), Corbellini et al. (2006) e Munhoz et al. (2006).

Valores mais altos de soropositividade foram relatados na Holanda com 39,4% de reagentes (Dijkstra et al. 2001), Alemanha 49%, Espanha 63%, Holanda 76% (Bartels et al. 2006) e na Califórnia 45% (Anderson et al. 1995). Embora o processo de amostragem e o tamanho de amostra devam ser considerados, tal diferença pode ser atribuída a um maior nível de tecnificação das propriedades que possuem animais de maior produtividade e que sofrem maior pressão produtiva, estando estes propensos ao recrudescimento da infecção e justificando a diferença nos resultados.

Por outro lado, as diferenças nos padrões raciais, no manejo e no sistema de criação, bem como diferenças regionais e climáticas, interferem diretamente na dinâmica da infecção por *N. caninum*, o que dificulta uma comparação direta dos estudos, assim como o uso de diferentes provas sorológicas e pontos de corte distintos (Dubey et al. 2007).

No presente estudo, os dados sobre o histórico de abortos e natimortos foram obtidos de 418 e 408 vacas, respectivamente. O histórico de abortamento foi relatado em 4,78% (20/418) e de natimortos em 1,71% (7/408). Observou-se uma associação significativa entre a exposição ao agente e a presença de abortos ($p=0,005$) e a ocorrência de natimortos ($p=0,012$). O histórico de abortamento foi 3,76 vezes mais frequente em vacas soropositivas em rela-

ção às soronegativas, o que se assemelha aos estudos de Paré et al. (1997) e Wouda et al. (1998). A presença de natimortos relatada foi 7,44 vezes mais frequente em vacas soropositivas (Tabela 2).

Tabela 2. Número de bovinos segundo diagnóstico sorológico para *Neospora caninum* e histórico de aborto nos bovinos na microrregião de Ilhéus e Itabuna, Estado da Bahia.

<i>Neospora caninum</i>	Aborto		Total
	Presença	Ausência	
+	8	55	62
-	12	343	346
Total	20	398	418

$p=0,005$

Tabela 3. Número de bovinos segundo diagnóstico sorológico para *Neospora caninum* e histórico de natimortos nos bovinos na microrregião de Ilhéus e Itabuna, Estado da Bahia.

<i>Neospora caninum</i>	Natimorto		Total
	Presença	Ausência	
+	4	58	62
-	3	343	346
Total	7	401	408

$p=0,012$

Os estudos que evidenciam a associação do agente aos abortamentos bovinos e casos de natimortos, em geral utilizam animais de origem europeia criados em sistema intensivo de produção. Desta forma, embora no presente trabalho também tenham sido identificadas estas associações, o mesmo foi realizado em rebanhos constituídos por animais mestiços e, em sistemas de manejo em que a pressão produtiva e consequentemente o estresse tendem a ser menores; isso pode justificar o baixo número de relatos de abortamentos nestes animais (Tabela 2), e reforça o fato que o abortamento é um fenômeno multifatorial. Torna-se, portanto, necessária a realização de estudos que avaliem a infecção por *N. caninum* em rebanhos mestiços associados aos quadros de abortamento.

Logo, a possibilidade de exposição de bovinos ao protozoário *N. caninum*, a ampla distribuição nos rebanhos estudados e a associação com os casos de abortamentos e natimortalidades remetem a necessidade de inclusão do parasito no diagnóstico diferencial nos casos de abortamento nos rebanhos leiteiros do sudeste da Bahia.

Agradecimentos. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa Nacional de Cooperação Acadêmica - Novas Fronteiras (PROCAD nº 1512/2007 - NF/CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e Universidade Federal da Bahia (UFBA).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson M.L., Palmer C.W., Thurmond M.C., Picanso J.P., Blanchard P.C., Breitmeyer R.E., Layton A.W., McAllister M.M., Daft B.M., Kinde H., Read D.H., Dubey J.P., Conrad P.A. & Barr B.C. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 207:1206-1210, 1995.
- Bartels C.J.M., Wouda W. & Schukken Y.H. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995-1997). *Theriogenology*, 52: 247-257, 1999.
- Bartels C.J.M., Ruiz-Santa-Quiteria J.A., Arnaiz-Seco I., Björkman C., Frössling J., Von Blumröder D., Conraths F.J., Schares G., Van Maanen C., Wouda W. & Ortega-Mora L.M. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. *Vet. Parasitol.*, 137:17-27, 2006.
- Canada N., Carvalheira J., Meireles C.S., Correia da Costa J.M. & Rocha A. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cows and its consequences for reproductive management. *Theriogenology*, 62:1229-1235, 2004.
- Corbellini L.G., Driemeier D., Cruz C.F.E., Gondim L.F.P. & Wald V. Neosporosis as cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Vet. Parasitol.*, 103:195-202, 2002.
- Corbellini L.G., Smith D.R., Pescador C.A., Schmitz M., Correa A., Steffen D.J. & Driemeier D. Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. *Prev. Vet. Med.*, 74:130-141, 2006.
- Costa K.S., Santos S.L., Uzêda R.S., Pinehiro A.M., Almeida M.A.O., Araújo F.R., McAllister M.M. & Gondim L.F.P. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, 38:157-159, 2008.
- Dean A.G. & Arner T. Epi Info: Epidemiology of program office. Disponível em: <http://www.cdc.gov/epiinfo/index.html>. Acesso em: 20 ago. 2008
- De Marez T., Liddell S., Dubey J.P., Jenkins M.C. & Gasbarre L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: Humoral and cellular immune responses. *Int. J. Parasitol.*, 29:1647-1657, 1999.
- Dijkstra Th., Barkema H.W., Eysker M. & Wouda W. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *Int. J. Parasitol.*, 31:209-215, 2001.
- Dubey J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.*, 41:1-16, 2003.
- Dubey J.P. & Lindsay D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.*, 67:1-59, 1996.
- Dubey J.P., Schares G. & Ortega-Mora L.M. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 20:323-367, 2007.
- Gondim L.F.P., Sartor I.F., Hasegawa M. & Yamane I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 86:71-75, 1999.
- Munhoz A.D., Flausino W., Silva R., Almeida C.R.R. & Lopes C.W.G. Distribuição de anticorpos contra *Neospora caninum* em vacas leiteiras dos municípios de Resende e Rio Claro, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 15:101-104, 2006.
- Paré J., Thurmond M.C. & Hietalla S.K. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortions. *J. Parasitol.*, 83:82-87, 1997.
- Sampaio I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte. 1998. 221p.
- Trees A.J. & Williams D.J. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol.*, 21:558-561, 2005.
- Thilsted J.P. & Dubey J.P. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1:205-209, 1989.
- Wouda W., Moen A.R. & Schukken Y.H. Abortion risk in progeny of cows that experienced a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology*, 49:1311-1316, 1998.
- Wouda W., Bartels C.J.M. & Moen A.R. Characteristics of *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995-1997). *Theriogenology*, 52:233-245, 1999.
- Yamane I., Kokuho T., Shimura K., Eto M., Shibahara T. & Haritani M. In vitro isolation and characterization of a bovine *Neospora* species in Japan. *Res. Vet. Sci.*, 63:77-80, 1997.

ANEXO 6. De MEIRELES, G. S.; MELLO, N. M. P.; GALVAO, G. da S.; ALMEIDA, C. R. R.; FLAUSINO, W.; LOPES, C. W. G. Surto de coccidiose em bezerros búfalos (*Bubalus bubalis*) por *Eimeria bareillyi* GIL et al., 1963 (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) - Relato de casos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 34, n.2, p. 116-120, 2012.

**SURTO DE COCCIDIOSE EM BEZERROS BÚFALOS (*Bubalus bubalis*)
POR *Eimeria bareillyi* GIL et al., 1963 (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) -
RELATO DE CASOS***

Gisele Santos de Meireles^{1†}, Natália Mello Pereira da Silva², Gideão da Silva Galvão¹,
Claudio Rogério Rocha Almeida³, Walter Flausino⁴ e Carlos Wilson Gomes Lopes⁵

ABSTRACT. de Meireles G.S., da Silva N.M.P., Galvão G. da S., Almeida C.R.R., Flausino W. & Lopes C.W.G. [**Coccidiosis outbreak in water buffalo calves (*Bubalus bubalis*) due to *Eimeria bareillyi* Gil et al., 1963 (Apicomplexa: Eimeriidae) - Case reports**]. Surto de coccidiose em bezerros búfalos (*Bubalus bubalis*) por *Eimeria bareillyi* Gil et al., 1963 (Apicomplexa: Eimeriidae) - Relato de casos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 34(2):116-120, 2012. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: gisa_meireles@yahoo.com.br

The buffalo breeding has great economic potential, but a little importance is giving in some areas of Brazil. There is little information on the impact of coccidiosis in calves. Eimeriosis is considered as more important especially in young calves due to morbidity and mortality. This paper aims to report two outbreaks of *Eimeria bareillyi* on dairy farms, one at the Municipality of Rio Claro and, the second one located at the Municipality of Itaguai, both in the State of Rio de Janeiro, Brazil. In the first dairy farm, the owner pointed out death of 10 animals, aged between 30 and 60 days of life in a period over four months. In the second property, calves aged of two to four weeks old, did not die, but developed symptoms characterized by sudden diarrhea, with rapid recovery without causing anorexia or weight loss. In the first case, one of the 10 died calves was posted. Histologically, lesions in the final portion of the ileum were characterized by loss of mucosal cells, shortening of villi and presence of the parasite forms, characterized by oocysts, macro and microgametocytes. Likewise, in the second property, young calves also developed diarrhea without come to death. Fecal samples from calves of both dairy farms were examined, where a large amount of *E. bareillyi* oocysts were found. Baycox® 5% at a dose of 30mg/kg was used in both properties and coccidiosis was cleared.

KEY WORDS. Coccidiosis outbreak, water buffalo, dairy farm, *Eimeria bareillyi*.

RESUMO. A criação de búfalos tem grande potencial econômico, mas pouca importância é dada em algumas regiões do Brasil. Com isso, há poucas informações sobre o impacto das coccidioses em bezerros búfalos. Eimeriose é considerada a doença

mais importante, especialmente nos animais mais jovens, devido à alta morbidade e mortalidade. Este trabalho tem como objetivo relatar dois surtos de *Eimeria bareillyi* em explorações leiteiras, um no município de Rio Claro e, a segunda localizada no

* Recebido em 1 de maio de 2011.

Aceito para publicação em 28 de fevereiro de 2012.

¹ Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: gisa_meireles@yahoo.com, E-mail: galvaovet@gmail.com - Bolsistas CAPES.

² Curso de Medicina Veterinária, IV, UFRRJ, BR 465, Km 07, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: natmell@hotmail.com - Bolsista IC-CNPq.

³ Médico-veterinário, EMATER-Rio Claro, Avenida Independência, 279, Rio Claro, RJ 27460, Brasil. E-mail: claudiovetrc@yahoo.com.br

⁴ Biólogo, PhD, Departamento de Parasitologia Animal (DPA), IV, UFRRJ, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: flausino@ufrj.br - Bolsista CNPq.

⁵ Médico-veterinário, PhD, LD, DPA, IV, UFRRJ, BR 465, Km 07, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: lopeswgc@ufrj.br - Bolsista CNPq.

município de Itaguaí, ambos no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Na primeira fazenda de gado leiteiro, o proprietário relatou óbito de 10 animais, com idades entre 30 e 60 dias de vida em um período superior a quatro meses. Nos bezerros da segunda propriedade, com idades variando de duas a quatro semanas de idade, não houve óbito, mas desenvolveram sintomas caracterizados por diarreia súbita, porém de recuperação rápida, sem causar anorexia ou perda de peso. No primeiro caso, material de um dos 10 bezerros que morreram foi analisado. Histologicamente, lesões na porção final do íleo foram caracterizadas pela perda de células da mucosa, encurtamento das vilosidades e presença de vários estágios de desenvolvimento do parasita, caracterizado por oocistos, macro, e microgametócitos. Da mesma forma, na segunda propriedade, bezerros também tiveram como sintomas diarreia, porém sem chegar a óbito. As amostras fecais de bezerros de ambas, propriedades citadas, foram examinadas, onde uma grande quantidade de oocistos de *E. bareillyi* foram encontrados. Baycox® a 5% na dosagem de 30 mg/kg foi utilizado em ambas as propriedades e a coccidiose foi debelada.

PALAVRAS-CHAVE. Surto de coccidiose, búfalos, granja leiteira, *Eimeria bareillyi*.

INTRODUÇÃO

A Eimeriose é uma doença causada por protozoário que tem como agentes etiológicos, várias espécies do gênero *Eimeria* Schneider, 1875 (Apicomplexa: Eimeriidae) parasito intracelular obrigatório da mucosa intestinal e transmitida por oocistos que necessitam de umidade e temperatura ideais para seu desenvolvimento, manutenção e esporulação ambientais (Soulsby 1998). Esta parasitose pode cursar com infecção aguda, caracterizada por enterite, variando de diarreia branda a severa com ou sem sangue, inflamação da mucosa intestinal, desidratação, pelos arrepiados e sem brilho, perda de peso, anemia, baixa conversão alimentar, podendo ocorrer, dependendo da severidade da infecção, sintomatologia nervosa (Griffiths 1974).

A susceptibilidade dos animais a eimeriose pode estar relacionada, principalmente a idade, a predisposição genética, resistência imunológica inata ou adquirida, níveis de estresse, manejo, desmama, localização do parasito no epitélio intestinal, número e localização das fases endógenas, assim como fatores climáticos e ambientais (Hayat et al. 1994). Segundo os estudos de Levine (1985), Bovinos e

bubalinos possuem alguns parasitos do gênero *Eimeria* em comum. Dentre as principais espécies, já identificadas acometendo bubalinos foram encontradas: *Eimeria zurnii*, *E. bovis*, *E. cylindrica*, *E. ellipsoidalis*, *E. auburnensis*, *E. subspherica*, *E. bareillyi*, *E. canadensis*, *E. ankarensis* e *E. bukidonensis* (de Noronha Jr & Buzetti 2002). A identificação das espécies tem sido baseada nas características morfológicas dos oocistos esporulados, bem como, na espécie de hospedeiro e localização das suas fases endógenas (Fayer 1980; Ramirez et al. 2009). Das espécies anteriormente citadas *E. ankarensis* e *E. bareillyi*, são tidas como específicas de bubalinos. *Eimeria bareillyi*, destaca-se das demais espécies, que se desenvolvem na mucosa do intestino delgado, por ser eliminada em grande quantidade nas fezes de bezerros búfalos, durante as duas primeiras semanas de vida (Nalbantoglu et al. 2008). Vários relatos de infecção por *E. bareillyi* em búfalos tem sido feitos na Índia, onde foi possível determinar que este parasito é específico do búfalo doméstico (Sanyal et al. 1985). Num inquérito feito em 20 propriedades das províncias de Caserta e Latina, na Itália, dos 162 animais examinados 14% encontravam-se positivos para oocistos desta espécie, sendo relatados pouco ou nenhum sintoma clínico associados à doença (Restani & Tassi 1969).

No Brasil, os relatos de *E. bareillyi* foram feitos em Minas Gerais e o outro no Rio de Janeiro. No primeiro relato, os dados foram obtidos da observação da evolução da eimeriose em bezerros bubalinos naturalmente infectados, sendo esta a primeira espécie identificada, a partir do nascimento até o 23º dia de vida. Permanecendo como única espécie prevalente nas fezes de bezerros do 7º ao 14º dia de vida. Os animais mais intensamente parasitados tiveram sintomatologia clínica caracterizada por apatia, diarreia com muco e sangue. Alguns dos animais estudados vieram a óbito indicando a patogenicidade deste parasito (Bastianetto et al. 2008). No Rio de Janeiro, O caso descrito encontrou três bezerros que albergavam oocistos de *E. bareillyi* nas fezes de um total de 33 bezerros búfalos examinados. Neste caso, os animais encontravam-se aparentemente saudáveis (Ramirez et al. 2009). Em outro estudo na Holanda, realizado com bezerros búfalos naturalmente infectados, também foi possível evidenciar a patogenicidade de *E. bareillyi*, associando-a ao óbito de animais com três semanas de vida (Dubey et al. 2008).

Este trabalho relata dois surtos de coccidiose por *E. bareillyi* em bezerros búfalos em duas granjas leiteiras localizadas nos municípios de Rio Claro e de Itaguaí, ambos no estado do Rio de Janeiro.

HISTÓRICO

Origem dos Animais

Propriedade em Rio Claro: Voltada para produção leiteira, onde a criação de búfalos é consorciada com bovinos e ovinos. O proprietário relatou o óbito de 10 bezerros búfalos, de um total de 30 animais, entre 45 a 50 dias de idade, em um período de quatro meses. O bezerreiro é comum para bovinos e bubalinos. Os bezerros búfalos que vieram a óbito estavam em período de aleitamento. A sintomatologia clínica foi caracterizada por diarreia breve, desidratação, olhos fundos, pelo eriçado e sem brilho, sem cólica ou tosse, anorexia e prostração, vindo a óbito num prazo de 4 a 5 dias. Durante este período, a fim de evitar a morte dos animais, quando estes paravam de mamar, o proprietário relatou que fazia medicação profilática com Tribissen® (trimetopim e sulfadiazina), Terramicina® (oxitetraciclina), Dectomax® (Doramectina) e desinfecção da área

com cal virgem. Um dos bezerros búfalos (Figura 1a), fêmea, com 50 dias de idade, com bom escore corporal, que veio a óbito na propriedade, foi necropsiada. Os órgãos torácicos e abdominais não tiveram alterações macroscópicas aparentes, apesar de se observar certo grau de autólise dado a temperatura ambiental elevada e por ser necropsiado no dia seguinte ao óbito. Havia conteúdo aquoso e leite talhado no rumem e abomaso. O conteúdo intestinal coletado estava esbranquiçado e levemente endurecido. Porém, dado ao quadro clínico caracterizado por diarreia, amostra de fezes e fragmentos de intestino delgado, foram coletados e estes mantidos em formol histológico e encaminhados ao Laboratório de Coccídios e Coccidioses (LCC) - Projeto Sanidade Animal (Embrapa/UFRRJ).

Propriedade em Itaguaí: Nesta propriedade de criação exclusiva de búfalos também voltada para a produção leiteira, amostras de fezes foram coletadas para observação da carga parasitária do rebanho em uma visita de rotina. Nesta visita, o proprietário relatou que um dos bezerros da propriedade apresentou leve grau de desidratação, pelos sem brilho, diarreia aquosa e fétida com curso de duração

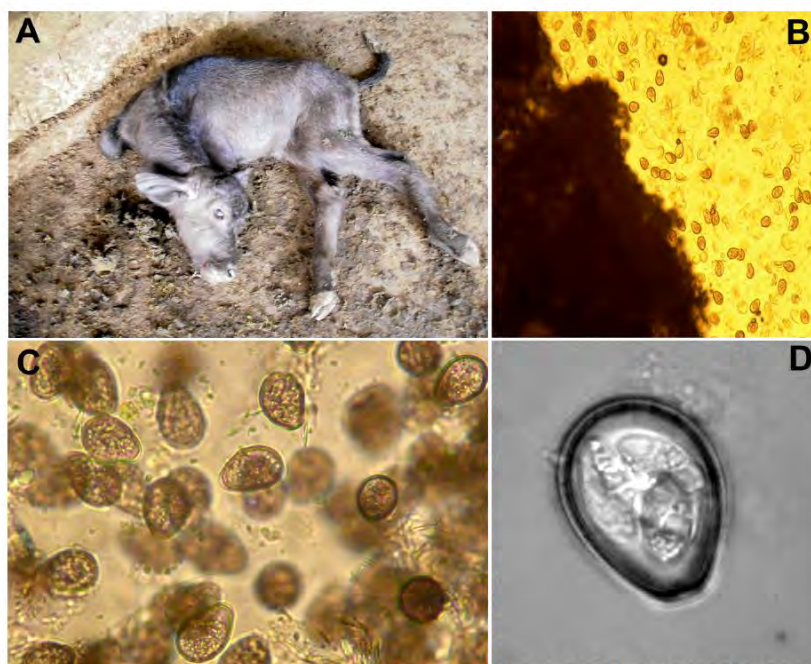


Figura 1. Coccidiose em bezerros búfalos por *Eimeria bareillyi*: a. Bezerro levado a óbito; b. Oocistos em fragmento de mucosa e livres obj. 5X; c. Numerosos oocistos encontrados nas fezes 40X; d. Oocisto esporulado em obj. 100X. Solução saturada de sacarose.

de três dias. Durante esse período como tratamento curativo desse animal o mesmo fez uso de ivermectina, não obtendo êxito com tratamento. Da mesma maneira que no caso anterior, amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal para serem examinadas no LCC.

Exame laboratorial: Ao exame de fezes, um grande número de oocistos foi observado na amostra coletada nas respectivas propriedades. Oocistos foram recuperados usando a técnica de flutuação Sheather com solução saturada de sacarose (S.G. 1.20) e, examinadas com auxílio de um microscópio binocular (Carl Zeiss, RFA) com base em Duszynski & Wilber (1997). Para identificação da espécie como base em seu tipo morfológico, parte dessas amostras foram mantidas em solução de dicromato de potássio a 2,5 % ($K_2Cr_2O_7$) 1:6 (v/v) em placas de Petri a temperatura ambiente para que esporulassem. Para observação da morfologia dos oocistos esporulados utilizou-se as objetivas de 10, 40 e 100X. Para a mensuração, foram selecionados apenas oocistos esporulados e íntegros, para tanto, utilizou-se uma ocular micrométrica K-15X PZO (Polônia) e a objetiva de 40X no mesmo microscópio binocular citado anteriormente. Em cada oocisto esporulado procurou-se observar e mensurar, em μm , as estruturas morfológicas destacadas por Levine (1985) e Ramirez et al. (2009). Na avaliação das amostras procedentes das duas propriedades foi possível observar centenas de oocistos, bem como pedaços de mucosas repletos de oocistos não esporulados (Figura 1b,c). A média de 30 oocistos esporulados foi de 31,05 (28,00 – 34,00) x 25,11 (22,00 – 29,00) μm , além das características morfológicas semelhante às de *E. bareillyi* (Figura 1d).

Para análise histopatológica os fragmentos de intestino delgado coletados na necropsia do animal da granja leiteira de Rio Claro, foram emblocados em parafina, corados em hematoxilina e eosina e montados entre lâmina e lamínula. Pode-se observar que no fragmento de mucosa do íleo diferentes fases de desenvolvimento de um coccídio caracterizadas por pequenos gamontes, macro e microgametócitos e alguns oocistos ainda não esporulados (Figura 2). Além disso, observou-se associado às formas evolutivas deste coccídio, perda de mucosa intestinal, atrofia das vilosidades com infiltração por células mononucleares.

Após a confirmação do diagnóstico como coccidiose, foi indicado aos proprietários de ambas as granjas leiteiras, o tratamento preventivo e cura-

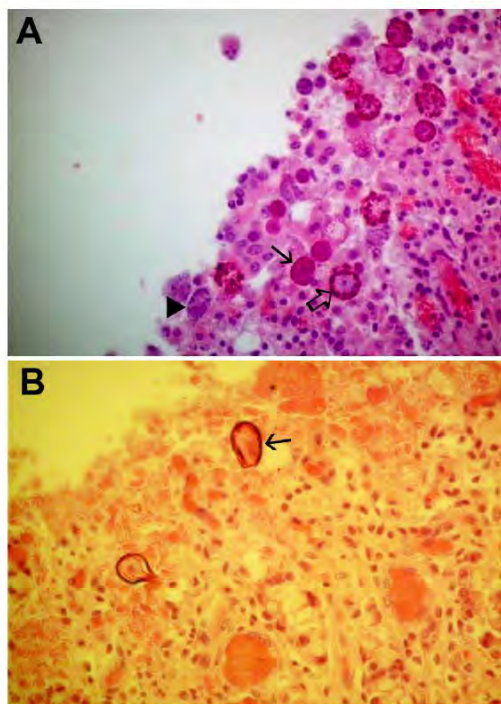


Figura 2. Coccidiose em bezerros búfalos por *Eimeria bareillyi*. a. Presença de gamontes (\rightarrow), macro (\leftrightarrow) e microgametócito (\blacktriangleright); b. Presença de oocistos não esporulados (\rightarrow). H.E. obj. 40X.

tivo dos animais com Baycox® (Toltrazuril a 5% na dosagem de 30 mg/kg). Após o tratamento, os sintomas relacionados à coccidiose desapareceram em ambas as propriedades com a recuperação dos animais e o declínio da infecção.

DISCUSSÃO

Os coccídios após a esporulação foram semelhantes aos de *E. bareillyi* conforme suas características morfológicas semelhantes as descrições de Levine (1985) e Ramirez et al. (2009) e das medidas de seus oocistos e esporocistos (Tabela 1).

A análise dos segmentos histológicos de mucosa do íleo procedentes do animal com 50 dias de idade, assinalou a presença de formas evolutivas semelhantes aos achados de Pande et al. (1971), Bastianetto et al. (2008) e Dubey et al. (2008) caracterizando-o como espécie altamente patogênica para bezerros búfalos. Como evidencia este trabalho, onde foi possível observar uma perda de 33% dos bezerros búfalos, por esta coccidiose em sua forma mais aguda.

Tabela 1. Aspectos comparativos dos oocistos esporulados de *Eimeria bareillyei* procedentes de *Bubalus bubalis*

Número de Amostras	Oocistos (µm)			Esporocistos (µm)		Referências
	Diâmetro		Índice morfológico	Diâmetro		
	Maior	Menor		Maior	Menor	
-	30,8 (26 - 35)	21,6 (19 - 25)	-	18	8	Gill et al. 1963.
-	35 - 24	25 - 15	-	18 - 15	6 - 9	Levine, 1985
-	27,2 (23,2 - 9,5)	19,3 (16,5 - 22)	1,38 (1,26 - 1,57)	-	-	Dubey et al. 2008
48	28 - 30	19 - 21	-	15	7	Bastianetto et al. 2008
65	29,5 (27 - 33)	21,3 (20 - 24)	1,4 (1,2 - 1,6)	16,4 (13 - 19)	7,2 (6 - 8)	Ramirez et al. 2009
Presente trabalho:						
13*	31,05 (28 - 34)	25,11 (22 - 29)	1,24 (1,0 - 1,38)	-	-	Rio Claro, RJ
13**	35,12 (32-41)	25,62 (23-27)	1,37 (1,18-1,50)	16,13 (13-19)	7,95 (7-9)	Itaguaí, RJ

*Oocistos não esporulados.

** Oocistos Esporulados.

Foi sugerido, em ambos os casos, para o tratamento dos animais, o medicamento conhecido por sua marca comercial Baycox® (Toltrazuril a 5%)^a na dosagem de 30 mg/kg por ter sua eficiência comprovada nos estágios intracelulares dos coccídios, produzindo uma diminuição da atividade enzimática mitocondrial com consequente alteração do metabolismo respiratório e dano na síntese dos ácidos nucleicos para a formação das estruturas constituintes dos oocistos (Darius et al. 2004) o que o tornou efetivo para a prevenção e tratamento curativo para búfalos (Ghanem et al. 2008). Sinalizando a eficiência do tratamento precoce de animais infectados; já, refletindo numa queda da taxa de eliminação de oocistos nas fezes, bem como no número de dias de eliminação de oocistos e diminuiu substancialmente a severidade da diarreia nos animais destas duas propriedades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barbosa M.A., Blasi A.C., Oliveira M.R. & Correa F.M.A. Natural parasitism of buffaloes in Botucatu, SP, Brazil. III. Dynamics of gastrointestinal parasitism in cows and their calves. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 87:37-41, 1992.
- Bastianetto E., Freitas C.M.V., Bello A.C.P.P., Cunha A.P., Dalla Rosa R.C. & Leite R.C. Primeiro diagnóstico de *Eimeria bareillyi* (Apicomplexa: Eimeridae) nas fezes de bezerros bubalinos (*Bubalus bubalis*) naturalmente infectados no Estado de Minas Gerais, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 17(supl. 1):234-238, 2008.
- Darius A.K., Mehlhorn H., Heydorn A.O. Effect of toltrazuril and ponazuril on the fine structure and multiplication of tachyzoites of the NC-1 strain of *Neospora caninum* (a synonym of *Hammondia heydorni*) in cell cultures *Parasitol. Res.*, 92:453-458, 2004.
- de Noronha Jr. A.C.F. & Buzetti W.A.S. Eimeriose em búfalos. *Cienc. Agr. Saude*, 2:47-53, 2002.
- Dubey J.P., Wouda W. & Muskens J. Fatal intestinal coccidiosis in a three-week-old buffalo calf (*Bubalus bubalis*). *J. Parasitol.*, 94:1289-1294, 2008.
- Duszynski D.W. & Wilber P.G. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeridae. *J. Parasitol.*, 83:333-336, 1997.
- Gahnem M.M., Radwaan M.E., Moustafa A.M.M. & Ebeid M.H. Comparative therapeutic effect of toltrazuril, sulphadimidine and amprolium on *Eimeria bovis* and *Eimeria zumii* given at different times following infection in buffalo calves (*Bubalus bubalis*). *Prev. Vet. Med.*, 84:161-170, 2008.
- Griffiths R.B. Parasites and Parasitic Disease, p.236-275. In: Cockrill W.R. (Ed.). *The Husbandry and Health of Domestic Buffalo*. FAO, Roma, 1974.
- Hayat C.S., Ruknudin A., Hayat B. & Akhtar M. Prevalence of coccidiosis in cattle and buffaloes with emphasis on age, breed, sex, season and management. *Pakistan Veterinary Journal.*, 14:214-217, 1994.
- Levine N.D. *Veterinary Protozoology*. Iowa State Univ. Press., Ames, 1985. 414p.
- Nalbantoglu S., Sari B., Cicek H. & Karaer Z. Prevalence of Coccidian Species in the water buffalo (*Bubalus bubalis*) in the Province of Afyon, Turkey. *Acta Vet.*, 77:111-116, 2008.
- Pande B.P., Bhatia B.B. & Chauhan P.P.S. Sexual stages and associated lesion in *Eimeria bareillyi* of buffalo calves. *Indian J. Ani. Sci.*, 41:151-154, 1971.
- Ramirez L., Berto B.P., Teixeira Filho W.L., Flausino W., Meireles G.S. de, Rodrigues J. da S. Almeida C.R.R. & Lopes C.W.G. *Eimeria bareillyi* from the domestic water buffalo, *Bubalus bubalis*, in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Bras. Med. Vet.*, 31:261-264, 2009.
- Restani R. & Tassi P. *Eimeria bareillyi* in bufali Italiani. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.*, 23:881-885, 1969.
- Sanyal P.K., Ruprah N.S. & Chhabra M.B. Attempted transmission of three species of *Eimeria* Schneider, 1875 of buffalo-calves to cow-calves. *Indian J. Ani. Sci.*, 55:301-304, 1985a.
- Soulsby E.J.L. *Parasitologia y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. 7ª ed. Interamericana, Cidade de México, 1987. 823p.

*Bayer S.A., São Paulo, SP.

ANEXO 7. OLIVEIRA, U. V.; GALVÃO, G. da S.; PAIXÃO, A. R. R.; ANDRIOLLI, J. L.; MUNHOZ, A. D. Eficácia in vitro da gentamicina sobre bactérias isoladas de vacas com mastite subclínica na microrregião Ilhéus-Itabuna, Bahia. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 34, p. 213-218, 2012.

EFICÁCIA *IN VITRO* DA GENTAMICINA SOBRE BACTÉRIAS ISOLADAS DE VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA NA MICRORREGIÃO ILHÉUS-ITABUNA, BAHIA*

Uillians Volkart de Oliveira¹, Gideão da Silva Galvão², Antônio Roberto da Paixão Ribeiro³, João Luciano Andrioli⁴ e Alexandre Dias Munhoz^{5*}

ABSTRACT. de Oliveira U.V., Galvão G. da S., Ribeiro A.R. da P., Andreoli J.L. & Munhoz A.D. [Efficacy *in vitro* of gentamicin on bacteria isolated from cows with subclinical mastitis in microrregion Ilhéus-Itabuna, Bahia]. Eficácia *in vitro* da gentamicina sobre bactérias isoladas de vacas com mastite subclínica na microrregião Ilhéus-Itabuna, Bahia. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 34(3):213-218, 2012. Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna, Km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662000, Brasil. Email: munhoz@uesc.br

The aimed this study was evaluated *in vitro* the sensivity to antibiotics in bacteria isolated from milk of cows diagnosed with subclinical mastitis, from 10 dairy farms, with access available, located in the microrregion Ilhéus-Itabuna in Bahia. Twenty percent of lactating cows of each property was selected, and the selection criterion utilized was the presence of the cow in the parlor at the time of visit. The test for identification of subclinical mastitis was the *California Mastitis testis* (CMT), in roofs where a positive reaction was detected, proceeded to the sample, with approximately 10 mL of milk in sterile test tube with screw cap, identified and kept in refrigeration until it is processed and later made the isolation and identification of bacteria. The antibiogram was performed by disk diffusion method, and the antibiotics tested with the following concentrations per disk: ampicillin (10µg), clindamycin (2µg), chloranphenicol (30µg), gentamicin (10µg), oxacillin (1µg), penicillin (10µg), tetracycline (30µg) e vancomycin (30µg). The results was analyzed using descriptive analysis to calculate absolute and relative frequencies for the different parameters studied. Of the 187 cows selected and submitted to CMT, 74 was positive, totaling 110 teats reagents. Being identified 45 colonies of *Staphylococcus aureus*, 45 de *Corynebacterium* sp., 37 de *S. coagulase* negative, 16 de *Bacillus* sp., 16 de *Escherichia coli* e 2 de *Klebsiella* sp. Among all tested antibiotics gentamicin was the one with the lowest percentage of resistance in all bacteria isolated in this study, proved to be an alternative to producers in the region of study for the control of bovine mastitis.

KEY WORDS. *Staphylococcus aureus*, antibiogram, bacterian resistance.

RESUMO. Neste estudo foi avaliada a sensibilidade *in vitro* a antibióticos em bactérias isoladas de leite de vacas diagnosticadas com mastite subclínica, provenientes de 10 propriedades leiteiras, com disponibilidade de acesso, localizadas na Microrregião Ilhéus-Itabuna no Estado da Bahia. Seleção

*Recebido em 27 de outubro de 2011.

Aceito para publicação em 28 de fevereiro de 2012.

¹ Médico-veterinário. *M.Ci.Anim.*, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Campus Soane Nazaré de Andrade, Rodovia Ilhéus-Itabuna, Km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-000, Brasil. E-mail: uvolkart@hotmail.com

² Médico-veterinário. *M.Ci.Anim.*, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: galvaovet@gmail.com

³ Médico-veterinário. *M.Ci.Anim.*, Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, UESC, Campus Soane Nazaré de Andrade, Rodovia Ilhéus-Itabuna, Km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-000. *Autor para correspondência. E-mail: paixao@uesc.br

⁴ Biólogo, *Dr. Biotecnol.*, Departamento de Ciências Biológicas, UESC, Campus Soane Nazaré de Andrade, Rodovia Ilhéus-Itabuna, Km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-000. E-mail: joaoluciano2002@yahoo.com

⁵ Médico-veterinário, *Dr.CsVs.*, Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, UESC, Campus Soane Nazaré de Andrade, Rodovia Ilhéus-Itabuna, Km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-000. E-mail: munhoz@uesc.br

nou-se 20% das vacas em lactação de cada propriedade, tendo como critério de seleção a presença das mesmas na sala de ordenha no momento da visita. O teste escolhido para identificação da mastite subclínica foi o *California mastitis testis* (CMT). Nos tetos onde se detectou uma reação positiva ao CMT, procedeu-se a colheita de aproximadamente 10mL de leite em tubo de ensaio estéril com tampa de rosca, identificado e mantido sob refrigeração até o seu processamento, que visava o isolamento e identificação das bactérias. O antibiograma foi realizado pelo método de difusão de disco, sendo testados os antibióticos com as seguintes concentrações: ampicilina (10µg), clindamicina (2µg), cloranfenicol (30µg), gentamicina (10µg), oxacilina (1µg), penicilina (10µg), tetraciclina (30µg) e vancomicina (30µg). Os resultados obtidos foram analisados, utilizando análise descritiva de cálculo de frequências absoluta e relativa para os diferentes parâmetros estudados. De 187 vacas selecionadas e submetidas ao CMT, 74 foram positivas, totalizando 110 tetos reagentes. Identificou-se 45 colônias de *Staphylococcus aureus*, 45 de *Corynebacterium* sp., 37 de *S. coagulase* negativo, 16 de *Bacillus* sp., 16 de *Escherichia coli* e 2 de *Klebsiella* sp. Dentre todos os antibióticos testados a gentamicina foi a que apresentou o menor percentual de resistência em todas as bactérias isoladas, demonstrando ser uma alternativa aos produtores da região de estudo, no controle da mastite bovina.

PALAVRAS-CHAVE. *Staphylococcus aureus*, Antibiograma, Resistência bacteriana.

INTRODUÇÃO

A mastite é a inflamação da glândula mamária, em geral provocada pela presença de bactérias (Langoni et al. 2001, Oliveira et al. 2010), podendo levar a descarte de vacas (Silva et al. 2004), perdas na produção leiteira (Philpot 1984) e consequentemente prejuízos na indústria de produtos lácteos (Oliveira et al. 2000).

O aumento da resistência aos antibióticos em bactérias provenientes de ambientes de produção animal e as possíveis implicações para saúde pública têm levado a uma intensiva fiscalização do uso de antimicrobianos (Lima et al. 2006), sendo de suma importância um melhor conhecimento do perfil de resistência dessas bactérias (Hogan & Smith 2003), uma vez que esta resistência é o principal motivo da ineficiência terapêutica (Langoni et al. 2000a).

Logo, a realização de estudos relacionados com

a etiologia e sensibilidade *in vitro* dos microrganismos frente aos antibióticos fornecem informações que possibilitam aumento da produtividade do rebanho, bem como melhor qualidade do leite produzido (Langoni et al. 2001, Medeiros et al. 2009), pois do contrário caso a pressão de seleção continue e o controle microbiano se torne ineficaz, a propagação da resistência se expandirá, com aumento da população de bactérias que serão totalmente resistentes aos antibióticos atualmente disponíveis (Dalmarco et al. 2006, Medeiros et al. 2009), como o *Staphylococcus aureus* que tornou resistente a metilina (MRSA) (CLSI 2005).

Dentro deste contexto a realização deste estudo teve o objetivo de avaliar a sensibilidade *in vitro* para antibióticos por bactérias isoladas de leite de vacas diagnosticadas com mastite subclínica, na microrregião Ilhéus-Itabuna, estado da Bahia.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo foi realizado, em 10 propriedades leiteiras, com disponibilidade de acesso, da microrregião Ilhéus-Itabuna (Altitude de 47 m; Latitude Sul 14°70' e Longitude Oeste 39°03'), no período de julho de 2008 a julho de 2009. Selecionou-se 20% das vacas em lactação de cada propriedade, tendo como critério de seleção a presença das mesmas na sala de ordenha no momento da visita. Os rebanhos eram compostos por vacas mestiças (zebuínas x européias) com diferentes graus de consaguinidade, em diferentes estágios de lactação.

Coleta das amostras e isolamento bacteriano

Nos tetos onde se detectou uma reação positiva pelo *California mastitis testis* (CMT), procedeu-se a colheita das amostras, com aproximadamente 10mL de leite em tubo de ensaio estéril com tampa de rosca, identificado e mantidos sob refrigeração até o seu processamento. Uma alíquota de 20 µL do leite foi inoculada em Agar sangue ovino 5% desfibrinado, sendo incubado posteriormente em estufa bacteriológica a 37°C, no período de 24 a 48 horas. Procedeu-se o isolamento e identificação das bactérias de acordo com suas características morfotintoriais e bioquímicas propostas por Quinn et al. (2005).

Teste da Susceptibilidade

O antibiograma foi realizado pelo método de difusão de disco de acordo com os padrões esta-

belecionados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2005), sendo testados os antibióticos com as seguintes concentrações por disco: ampicilina (10µg)*, clindamicina (2µg)*, cloranfenicol (30µg)*, gentamicina (10µg)*, oxacilina (1µg)*, penicilina (10µg)*, tetraciclina (30µg)* e vancomicina (30µg)*. Os diâmetros dos halos de inibição de crescimento obtidos foram registrados e interpretados de acordo com os padrões estabelecidos pelo CLSI (2005).

Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados, utilizando análise descritiva de cálculo de frequências absoluta e relativa para os diferentes parâmetros estudados (Sampaio 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 187 vacas selecionadas e submetidas ao CMT, 74 foram positivas, totalizando 110 tetos reagentes. Sendo identificadas 45 colônias de *S. aureus*, 45 de *Corynebacterium* sp., 37 de *S. coagulase* negativo, 16 de *Bacillus* sp., 16 de *Escherichia coli* e 2 de *Klebsiella* sp.

Todas as colônias isoladas apresentaram um alto percentual de resistência aos antibióticos betalactâmicos (tabelas 1, 2 e 3). Além, da possibilidade do seu uso indiscriminado, estes resultados podem

estar associados à presença de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) (CLSI, 2005), tendo o gene *mecA* associado à resistência (Chung et al. 2008), sendo este também o provável responsável pela resistência de *S. coagulase* negativo (Lüthje & Schwarz 2006, Febler et al. 2010). Não obstante uma alta produção de β-lactamase (Oliveira et al. 2000) enzima que pode estar presente tanto em bactérias gram-positivas quanto nas gram-negativas (Sousa Junior et al. 2004), justificaria os resultados encontrados para *Corynebacterium* sp e *E. coli*.

Os estudos de Gentilini et al. (2000), Pengov & Ceru (2003), Turutoglu et al. (2006), Coelho et al. (2009) e Vanderhaeghen et al. (2010) para *S. aureus* e Bueno et al. (2003) e Ebrahimi et al. (2007) para os gram-negativos demonstram que a resistência aos antibióticos beta-lactâmicos é cosmopolita e uma vez que estes estão entre os antibióticos mais utilizados para o tratamento da mastite bovina (Guler et al. 2005) o que remete a necessidade de seu uso e dose adequados, com avaliação *in vitro* prévia para determinação da sensibilidade.

O cloranfenicol mostrou uma eficácia acima de 80% frente a *S. aureus*, *S. coagulase* negativo e *Bacillus* sp. (tabela 1 e 2), no entanto o seu uso não é recomendado em animais cujos produtos sejam destinados ao consumo, devido a sua toxicidade (Ferguson et al. 2005). A vancomicina se mostrou eficaz frente a *E. coli* (tabela 3), enquanto que a

* Sensifar e Multifar-Cefar®.

Tabela 1. Perfil de sensibilidade a antibióticos de microorganismos isolados de vacas com mastite subclínica na microrregião Ilhéus-Itabuna, BA.

Antibióticos	<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Staphylococcus coagulase</i> negativo			
	Número (%)				Número (%)			
	Bactérias	Resistente	Intermediário	Sensível	Bactérias	Resistente	Intermediário	Sensível
Gentamicina	37	0(0)	0(0)	37(100)	45	3(6,66)	2(4,44)	40(88,88)
Vancomicina	37	14(37,83)	0(0)	23(62,16)	45	13(28,88)	0(0)	32(71,11)
Cloranfenicol	37	1(2,70)	5(13,51)	31(83,78)	45	4(8,88)	1(2,22)	40(88,88)
Clindamicina	37	11(29,72)	12(32,43)	14(37,83)	45	15(33,33)	15(33,33)	15(33,33)
Tetraciclina	37	5(13,51)	8(21,62)	24(64,86)	45	4(8,88)	12(26,66)	29(64,44)
Oxacilina	37	29(78,37)	0(0)	8(21,62)	45	37(82,22)	0(0)	8(17,77)
Ampicilina	37	27(72,97)	0(0)	10(27,02)	45	35(77,77)	0(0)	10(22,22)
Penicilina	37	26(70,27)	0(0)	11(29,72)	45	44(97,77)	0(0)	1(2,22)

Tabela 2. Perfil de sensibilidade a antibióticos de microorganismos isolados de vacas com mastite subclínica na microrregião Ilhéus-Itabuna, BA.

Antibióticos	<i>Corynebacterium</i> sp.				<i>Bacillus</i> sp.			
	Número (%)				Número (%)			
	Bactérias	Resistente	Intermediário	Sensível	Bactérias	Resistente	Intermediário	Sensível
Gentamicina	45	0(0,0)	2(4,44)	43(95,55)	16	0(0,0)	1(6,25)	15(93,75)
Vancomicina	45	15(33,33)	0(0,0)	30(66,66)	16	0(0,0)	0(0,0)	16(100,0)
Cloranfenicol	45	17(37,77)	1(2,22)	27(60,0)	16	0(0,0)	2(12,5)	14(87,5)
Clindamicina	45	29(64,44)	0(0,0)	16(35,55)	16	7(43,75)	5(31,25)	4(25,0)
Tetraciclina	45	19(42,22)	5(11,11)	21(46,66)	16	1(6,25)	2(12,5)	13(81,25)
Oxacilina	45	42(93,33)	0(0,0)	3(6,66)	16	11(68,75)	4(25,0)	1(6,25)
Ampicilina	45	32(71,11)	5(11,11)	8(17,77)	16	9(56,25)	5(31,25)	2(12,5)
Penicilina	45	37(82,22)	3(6,66)	5(11,11)	16	9(56,25)	2(12,5)	5(31,25)

Tabela 3. Perfil de sensibilidade a antibióticos de microorganismos isolados de vacas com mastite subclínica na microrregião Ilheus-Itabuna, BA.

Antibióticos	<i>Escherichia coli</i>				<i>Klebsiella sp.</i>			
	Número (%)				Número (%)			
	Bactérias	Resistente	Intermediário	Sensível	Bactérias	Resistente	Intermediário	Sensível
Gentamicina	16	0(0)	1(6,25)	15(93,75)	02	0(0)	0(0)	2(100)
Vancomicina	16	1(6,25)	1(6,25)	14(87,5)	02	1(50,0)	0(0,0)	1(50,0)
Cloranfenicol	16	3(18,75)	5(31,25)	8(50)	02	2(100,0)	0(0,0)	0(0,0)
Clindamicina	16	9(56,25)	1(6,25)	6(37,5)	02	1(50,0)	1(50,0)	0(0,0)
Tetraciclina	16	1(6,25)	3(18,75)	12(75)	02	0(0,0)	0(0,0)	2(100,0)
Oxacilina	16	16(100)	0(0)	0(0)	02	2(100,0)	0(0,0)	0(0,0)
Ampicilina	16	13(81,25)	2(12,5)	1(6,25)	02	0(0,0)	0(0,0)	2(100,0)
Penicilina	16	12(75)	2(12,5)	2(12,5)	02	2(100,0)	0(0,0)	0(0,0)

clindamicina depois dos antibióticos betalactâmicos foi o que obteve a pior eficácia, não tendo dessa forma o seu uso aconselhado para a região.

A tetraciclina obteve baixa porcentagem de bactérias resistentes (tabela 1, 2 e 3), a exceção de *Corynebacterium sp.* (tabela 2) e uma vez que houve resistência em apenas 13,51% das colônias de *S. aureus* isoladas (tabela 1), pode-se sugerir que o uso indiscriminado desse antibiótico na região possa ser baixo, uma vez que Moroni et al. (2006) observaram 58,8% de colônias de *S. aureus* resistentes a tetraciclina, tendo como justificativa o uso acentuado deste antibiótico para combate de enfermidades respiratórias na região.

Dos antibióticos testados, a gentamicina foi o que obteve a menor porcentagem de bactérias resistentes, com resistência observada em apenas 3 (6,67%) de 45 colônias de *S. coagulase negativo* (tabela 1). Esta eficácia corrobora com os estudos realizados por Gentilini et al. (2002), Nunes et al. (2007), Goraninjad et al. (2007) e Nam et al. (2009).

Essa informação é importante para a região no âmbito técnico, principalmente para profissionais que atuam a campo e que não dispõem de estrutura para procedimentos laboratoriais (Cunha et al. 2006). Entretanto, se o seu uso for frequente e de forma inadequada, faz com que as chances de sucesso regridam bastante (Nader Filho et al. 2007), uma vez que o uso indiscriminado destes antibióticos influencia nos mecanismos de resistência das bactérias (Meng et al. 1998, Schroeder et al. 2002) como observado em diversos estudos (Chopra & Roberts 2001, Bueno et al. 2003, Freitas et al. 2005, Turutoglu et al. 2006, Nader Filho et al. 2007).

Logo, ressalta-se a necessidade de realização de exames microbiológicos e de testes de sensibilidade *in vitro* das amostras isoladas dos casos de mastite, antes da prescrição de uma droga antibacteriana (Marinho et al. 2002), pois o seu uso correto minimizará o desenvolvimento de resistência, além do

ganho qualitativo com o controle e monitoramento da mastite bovina, levando-se em consideração a importância do tratamento das mastites como parte de um programa integrado para o seu controle (Langoni et al. 2000b).

CONCLUSÕES

Dentre todos os antibióticos testados a gentamicina foi a que apresentou o menor percentual de resistência em todas as bactérias isoladas neste estudo, demonstrando ser uma alternativa aos produtores da região de estudo, no controle da mastite bovina.

Agradecimentos. À Agência de Defesa Agropecuária do Estado da Bahia (ADAB), ao CNPq, à FAPESB e a UESC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bueno V.F.F., Nicolau E.S., Mesquita A.J., Ribeiro A.R., Silva J.A.B., Costa E.O., Coelho K.O. & Couto D.V. Etiologia e suscetibilidade à antimicrobianos dos agentes da mastite bovina isolados na região de Pirassununga-SP-Brasil. *Rev. Patol. Trop.*, 32:33-44, 2003.
- Chopra I. & Roberts M. Tetracycline Antibiotics: Mode of action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65:232-260, 2001.
- Chung M., Antignac A., Kim C. & Tomasz A. Comparative study of the susceptibilities of major epidemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin and to the new broad-spectrum cephalosporin ceftobiprole. *Antimicrob. Agents Chemoth.*, 52:2709-2717, 2008.
- CLSI. *Normas de desempenho para testes de sensibilidade microbiana*. Clinical and Laboratory Standards Institute. 15º Suplemento informativo, 25:177, 2005.
- Coelho S.M., Reinoso E., Pereira I.A., Soares L.C., Demo M., Bogni C. & Souza M.M.S. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. *Pesq. Vet. Bras.*, 29:369-374, 2009.
- Cunha A.P., Silva L.B.G., Pinheiro Júnior J.W., Silva D.R., Oliveira A.A.F., Silva K.P.C & Mota R.A. Perfil de sen-

- sibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. *Arq. Inst. Biol.*, 73:17-21, 2006.
- Dalmarco E.M., Blatt S.L. & Córdova C.M.M. Identificação laboratorial de B-lactamase de espectro estendido (ES-BLs). *Rev. Bras. Anal. Clin.*, 3:171-177, 2006.
- Ebrahimi A., Kheirabadi K.H.P. & Nikookhah F. Antimicrobial susceptibility of environmental bovine mastitis pathogens in west central Iran. *Pakistan J. Biol. Sci.*, 10:3014-6, 2007.
- Febler A.T., Billerbeck C., Kadlec K. & Schwarz S. Identification and Characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. *J. Antimicrob. Chemoth.*, 65:1576-1582, 2010.
- Ferguson J.B.A., Young P., Kennedy G., Elliott C., Weigel S., Gatermann R., Ashwin H., Stead S. & Sharman M. Detection of chloramphenicol and chloramphenicol glucuronide residues in poultry muscle, honey, prawn and milk using a surface Plasmon resonance biosensor and Qflex® kit chloramphenicol. *Analytic. Chim. Acta*, 529: 109-113, 2005.
- Freitas M.F.L., Júnior P., Stamford T.L.M., Rabelo S.S.A., Silva D.R., Silveira Filho V.M., Santos F.G.B., Sena M.J. & Mota R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. *Arq. Inst. Biol.*, 72:171-177, 2005.
- Gentilini E., Denamiel G., Llorente P., Godaly S., Rebuelto M. & DeGregoriol O. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. *J. Dairy Sci.*, 83:1224-1227, 2000.
- Gentilini E., Denamiel A., Betancor A., Rebuelto M., Rodriguez Fermepin M. & De Torres R.A. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *staphylococci* isolated from bovine mastitis in Argentina. *J. Dairy Sci.*, 85:1913-1917, 2002.
- Gooraninejad S., Ghorbanpoor M. & Salati A.P. Antibiotic susceptibility of *Staphylococci* isolated from bovine sub-clinical mastitis. *Pakistan J. Biol. Sci.*, 10:2781-2783, 2007.
- Guler L., Ok U., Gunduz K., Gulcu Y. & Hadimli H.S. Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. *J. Dairy Sci.*, 88:3149-3154, 2005.
- Hogan J. & Smith K.L. Coliform mastitis. *Vet. Res.*, 34:507-519, 2003.
- Langoni H., Cabral K.G., Domingues P.F., Pulga M.E., Marinho M.M. & Pardo R.B. Utilização da enrofloxacin (Baytril) no tratamento da mastite bovina estafilocócica. *Cienc. Rur.*, 30:167-170, 2000a.
- Langoni H., Araújo W.N., Silva A.V. & Souza L.C. Tratamento da mastite bovina com amoxicilina e enrofloxacin bem como com a sua associação. *Arq. Inst. Biol.*, 67:177-180, 2000b.
- Langoni H., Domingues P.F., Molero Filho J.R. & Baldini S. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite subclínica em búfalos (*Bubalus bubalis*). *Ars Vet.*, 17:213-217, 2001.
- Lima R.M.S., Figueiredo H.C.P., Faria F.C., Picolli R.H., Bueno Filho J.S.S. & Logatos P.V.R. Resistência a antimicrobianos de bactérias oriundas de ambiente de criação e filés de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Cienc. Agro-tecnol.*, 30:126-132, 2006.
- Lüthje P. & Schwarz S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative *Staphylococci* from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. *J. Antimicrob. Chemoth.*, 57:966-969, 2006.
- Marinho M., Baldini S., Silva A.V., Listoni F.J.P. & Langoni H. Ação *In vitro* da enrofloxacin em microrganismos isolados de leite mastítico da região de Botucatu-SP. *Ars Vet.*, 18:120-124, 2002.
- Medeiros E.S., Mota R.A., Santos M.V., Freitas M.F.L., Pinheiro Júnior J.W. & Andrey A.T. Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. *Pesq. Vet. Bras.*, 29:569-574, 2009.
- Meng J., Zhao S., Doyle M.P. & Joseph S.W. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM isolated from animals, food, and humans. *J. Food Protec.*, 61:1511-1514, 1998.
- Moroni P., Pisoni G., Antonini M., Villa R., Boettcher P. & Carli S. Short communication: antimicrobial drug susceptibility of *staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Italy. *J. Dairy Sci.*, 89:2973-2976, 2006.
- Nader Filho A., Ferreira L.A., Amaral L.A., Rossi Junior O.D. & Oliveira R.P. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. *Arq. Inst. Biol.*, 74:1-4, 2007.
- Nam H.M., Lim S.K., Kim J.M., Kang H.M., Moon J.S., Jang G.C., Kim J.M., Joo Y.S. & Jung S.C. Prevalence and antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. *J. Dairy Sci.*, 92:2020-2026, 2009.
- Nunes S.F., Cavaco L.N., Vilela C.L. & Bexiga R. Perfil de susceptibilidade a antibióticos de agentes etiológicos de mastite subclínica bovina em Portugal. *Rev. Port. Cienc. Vet.*, 102:275-280, 2007.
- Oliveira A.P., Watts J.L., Salmon S.A. & Aarestrup F.M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. *J. Dairy Sci.*, 83:855-862, 2000.
- Oliveira U.V., Galvão G.S., Paixão A.R.R. & Munhoz A.D. Ocorrência, etiologia infecciosa e fatores de risco da mastite bovina associados à mastite bovina na microrregião Itabuna-Ilhéus, Bahia. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, 11:630-640, 2010.
- Pengov A. & Ceru S. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and ovine mammary glands. *J. Dairy Sci.*, 86:3157-3163, 2003.
- Philpot W.N. Economics of mastitis control. *Vet. Clin. N. Am.: Large Anim. Pract.*, 6:233-245, 1984.
- Quinn P.J., Markey B.K., Carter M.E., Donnelly W.J. & Leonard F.C. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. 1ª ed., Artmed, São Paulo, 2005. 512p.
- Sampaio I.B.M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. FEPMVZ, Belo Horizonte, 1998. 221p.
- Schroeder C.M., Zhao C., DebRoy C., Torcolini J., Zhao S., White D.G., Wagner D.D., McDermott P.F., Walker R.D. & Mengi J. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from Humans, Cattle, Swine, and Food. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:576-581, 2002.

- Silva L.A.F., Silva E.B., Silva L.M., Trindade B.R., Silva O.C., Romani A.F., Fioravanti M.C.S., Sousa J.N., Franco L.G. & Garcia A.M. Causas de descarte de fêmeas bovinas leiteiras adultas. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, 5:9-17, 2004.
- Sousa Junior M.A., Ferreira E.S. & Conceição G.C. Betalactamases de espectro ampliado (ESBL): um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. *NewsLab*, 63:152-174, 2004.
- Turutoglu H., Ercelik S. & Ozturk D. Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis. *Bul. Vet. Inst. Pulawy*, 50:41-45, 2006.
- Vanderhaeghen W., Cerpentier T., Adriaensen C., Vicca J., Hermans K., Butaye P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian Cows. *Vet. Microbiol.*, 144:166-171, 2010.

ANEXO 8. SICUPIRA, P. M. L.; DE MAGALHÃES, V. C. S.; GALVÃO, G. da S.; PEREIRA, M. J. S.; GONDIM, L. F. P.; MUNHOZ, A. D. Factors associated with infection by *Neospora caninum* in dogs in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 185, n. 2-4, 2012, p. 305–308, 2012.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar



Short communication

Factors associated with infection by *Neospora caninum* in dogs in Brazil

Patrícia Mara Lopes Sicupira^a, Vanessa Carvalho Sampaio de Magalhães^a,
Gideão da Silva Galvão^b, Maria Julia Salim Pereira^c, Luís Fernando Pita Gondim^d,
Alexandre Dias Munhoz^{a,*}

^a Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Campus Soane Nazaré de Andrade Rodovia Ilhéus Itabuna, Km 16, Salobrinho, Ilhéus, Bahia 45662-000, Brazil

^b Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária-IV Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) BR-465 Km 7 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

^c Departamento de Parasitologia Animal, IV, UFRRJ BR-465 Km 7 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

^d Departamento de Patologia e Clínicas, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Av. Ademar de Barros 500, Ondina, Salvador, Bahia 40170-110, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 April 2011

Received in revised form

15 September 2011

Accepted 20 September 2011

Keywords:

Neosporosis

Risk factors

Canines

ABSTRACT

From August 2006 to 2008, 411 dogs in northeastern Brazil were evaluated for seropositivity to *Neospora caninum*. The dogs were clinically examined, and their owners were interviewed about the conditions in which the animals were maintained in order to assess the factors associated with infection by this parasite. A serum sample was taken from each dog for serological examination in an indirect fluorescent antibody test for *N. caninum*. The Yates' Chi-square test or Fisher's exact test was used to select the variables for the multivariate logistic regression model. Seropositivity was detected in 9.26% of dogs. The seropositivity rates of dogs from different environments were 2.6% (4/156) in urban areas, 13.1% (28/214) in peri-urban areas, and 14.6% (6/41) in rural areas. Factors associated with seropositivity for *N. caninum* were the following: contact with other dogs, access to food outside the home and residing in the peri-urban or rural environments ($p < 0.05$). Results of this study confirm that dogs in urban, rural and peri-urban areas of northeastern Brazil are exposed to *N. caninum*. Control measures to prevent infection of dogs in the studied region should be focused primarily on preventing access to potential sources of infection, which include environments with other dogs, bovines, and other small intermediate hosts, such as birds and rodents.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Neospora caninum is an apicomplexan protozoan that belongs to the family Sarcocystidae. This protozoan is structurally very similar to, but antigenically distinct from, *Toxoplasma gondii* (Hemphill et al., 1999), and its definitive hosts are the dog (McAllister et al., 1998), the coyote (Gondim et al., 2004) and the dingo (King et al., 2010).

Dogs of any age can develop clinical signs of neosporosis (Dubey, 2003); yet, in most cases, hosts are asymptomatic (Pasquali et al., 1998). The infection of dogs is observed throughout the world, and ingestion of any of the following is associated with infection: rodents, birds and other animals (Jesus et al., 2006) that can be intermediate hosts of *N. caninum* (Wouda et al., 1999; Costa et al., 2008); improperly cooked meat or homemade food (Cañón-Franco et al., 2003; Ferroglio et al., 2007); and most likely the direct ingestion of oocysts. Additionally, contact between cattle and dogs in rural areas allows for the ingestion of fetal membranes and fluids from infected cattle (Wouda et al., 1999). These factors contribute to horizontal transmission of the

* Corresponding author. Tel.: +55 73 3680 5406; fax: +55 73 3680 5406.
E-mail addresses: munhoz@uesc.br, admruralvet@ig.com.br (A.D. Munhoz).

parasite in dogs, which is the primary route of infection because the rate of vertical transmission is low and insufficient to maintain the infection in the canine population (Barber and Trees, 1998).

The studies conducted to date indicate that factors associated with infection by *N. caninum* vary by region and with the management conditions of the dogs. Thus, this study aimed to evaluate *N. caninum* infection and the factors associated with parasite seropositivity in dogs from different environments in northeastern Brazil.

2. Materials and methods

The present study was conducted from August 2006 to 2008 in the city of Ilhéus (14°47' latitude and 39°02' longitude), Bahia State, in the northeastern region of Brazil. A non-probabilistic sample of 411 dogs from urban, peri-urban and rural (farm dog) areas of the region was analyzed. Animals included in the study were clinically examined after receiving the written consent of their owners, who were interviewed about the conditions of the dogs, with an emphasis on management, feeding habits, contact with other animals, hunting habits, and access to the streets (Table 1).

The sera were tested for antibodies to *N. caninum* by an indirect fluorescent antibody test using the NC-1 parasite strain (Dubey et al., 1988). Commercial FITC-labeled anti-dog IgG (Sigma–Aldrich) was used as a secondary antibody. The serum dilution threshold for positivity was set at 1:50. Negative and positive controls consisted of pre and post-infection sera from a dog that received bovine tissue containing cysts of *N. caninum* (Gondim et al., 2005).

Database and statistics software Epi Info version 3.5.1 (Centers for Disease Control and Prevention) were used to perform the analyses of the association between the explanatory variables and the infection. The bivariate analysis was carried out using the Yates' Chi-square (χ^2) test, or the Fisher's exact test, whenever necessary. Before further analysis, the R Program (The R Project for Statistical Computing, <http://www.r-project.org>) for Windows version 2.10.1 was employed to perform Spearman's correlation matrix in order to verify the multicollinearity among the independent variables ($\rho \geq 0.80$). The variables with $p \leq 0.20$ in the bivariate analysis and $\rho < 0.80$ in the correlation analysis were included in the multivariable analysis by logistic regression. The variable "rural environment" was included in the model due to its biological relevance despite its failure to achieve statistically significant association in the bivariate analysis (Katz, 1999). The variables introduced in the model were selected through the *backward elimination* procedure based on the likelihood-ratio test. The required level of significance for a factor to be considered as associated in the final model was set at $p < 0.05$.

3. Results

Antibodies against *N. caninum* were detected in 38/411 (9.26%, 95% CI: 6.7–12.6) of the dogs. Eight dogs (21.1%, 95% CI: 9.6–37.3) had titers of 50, 12 (31.6%, 95% CI: 17.5–48.7) had titers of 100, and 18 (47.4%, 95% CI: 31–64.2) had titers of 200. The seropositivity rates for dogs from different

environments were 4/156 (2.6%, 95% CI: 0.7–6.4) in urban areas, 28/214 (13.1%, 95% CI: 8.9–18.4) in peri-urban areas, and 6/41 (14.6%, 95% CI: 5.6–29.2) in rural areas. No animals showed clinical symptoms of infection.

Results of the bivariate analysis are shown in Table 1. The variable rural environment ($p = 0.33$) did not meet the inclusion criteria, however, it has been included in the model because it was epidemiologically important. Due to the correlation ($\rho \geq 0.80$) between the variables urban and peri-urban environment, peri-urban was chosen to be part of the analysis because the majority of animals lived in that environment.

In the final model, factors such as contact with other dogs, access to food outside the home, and residence in peri-urban or rural environments remained significantly associated with infection by *N. caninum* (Table 2).

4. Discussion

The absence of clinical signs in the seropositive dogs has been observed in other epidemiological studies (Cañón-Franco et al., 2003; Collantes-Fernández et al., 2008). Barber and Trees (1996) suggest that high antibody titers against *N. caninum* (>800) can be strong evidence of clinical neosporosis; our findings reinforce the observation that high antibody concentrations rarely occur in asymptomatic animals, in which we found maximum titers to be 200. However, Gondim et al. (2005) and Romanelli et al. (2007) have observed dogs with antibody titers higher than 800 without clinical manifestations of the disease, and Basso et al. (2001) have not observed differences in antibody titers between symptomatic and asymptomatic animals. Thus, repeated exposures to the parasite are likely to elevate antibody titers without manifesting in overt disease.

Although contact with cattle was a significant factor in the bivariate analysis and is epidemiologically important (Kramer et al., 2004), it was not included in the model due to the insufficient number of samples in one of the categories (Table 1). Thus, contact of dogs with cattle may be a confounding factor in our model. For dogs residing in urban and peri-urban areas, seropositivity to *N. caninum* was significantly greater for those in contact with cattle (data not shown). In rural environments, however, 39 of 41 dogs had contact with cattle and six of these 39 were seropositive. Neither of the two dogs without contact with cattle was seropositive.

In this study, 29/34 (85.3%, 95% CI: 68.9–95.0) of seropositive dogs from rural and peri-urban environments had contact with other dogs. Thus, due to the dog–bovine–dog cycle of parasite transmission (Dijkstra et al., 2001), dogs from rural areas may have a greater chance of ingestion of oocysts present in the environment, though firm evidence of this route of infection is lacking. Alternatively, dogs from peri-urban areas are often semi-residents, i.e., despite having owners, they have access to the streets and are in contact with stray dogs. These semi-resident dogs are therefore exposed to oocysts dispersed in the environment. Furthermore, because all seropositive dogs from rural and peri-urban environments had contact with cattle, the possibility of having ingested placental

Table 1
Factors assessed using the Chi-square test in order to evaluate association with infection by *Neospora caninum* in dogs from Ilhéus, State of Bahia, Brazil.

Factors	Category	Positive dogs n (%)	Negative dogs n (%)	Odds ratio (95% CI)	p
Access to street	Yes	30 (11.4)	234 (88.6)	2.23 (0.99–5.00)	0.070
	No	8 (5.4)	139 (94.6)	^a	
Hunting habits	Yes	14 (18.7)	61 (81.3)	2.98 (1.46–6.09)	0.004
	No	24 (7.1)	312 (92.9)	*	
Urban environment	Yes	4 (2.6)	152 (97.4)	0.17 (0.05–0.52)	0.0005
	No	34 (13.3)	221 (86.7)	*	
Rural environment	Yes	6 (14.6)	35 (85.4)	1.81 (0.7–4.63)	0.33
	No	32 (8.6)	338 (91.4)	*	
Peri-urban environment	Yes	28 (13.1)	186 (86.9)	2.81 (1.33–5.96)	0.009
	No	10 (5.1)	187 (94.9)	*	
Contact with other dogs	Yes	31 (13.6)	197 (86.4)	3.96 (1.61–10.13)	0.0013
	No	7 (3.8)	176 (96.2)	*	
Ingestion of milk	Yes	21 (14.2)	127 (85.8)	2.39 (1.22–4.70)	0.016
	No	17 (6.5)	246 (93.5)	*	
Access to food outside the home	Yes	24 (13.0)	160 (87.0)	2.28 (1.14–4.55)	0.026
	No	14 (6.2)	213 (93.8)	*	
Age <12 months	Yes	1 (1.9)	51 (98.1)	0.17 (0.023–1.27)	0.070 ^b
	No	37 (10.3)	322 (87.3)	*	
Eats homemade food	Yes	32 (9.4)	308 (90.6)	1.13 (0.45–2.80)	0.98
	No	6 (8.5)	65 (91.5)	*	
Contact with chickens	Yes	4 (10.5)	34 (89.5)	1.17 (0.39–3.50)	0.99
	No	34 (9.1)	339 (90.9)	*	
Defined breed	Yes	4 (7.3)	51 (92.7)	0.74 (0.25–2.18)	0.77
	No	34 (9.6)	322 (90.4)	*	
Sex	Female	10 (7.7)	120 (92.3)	0.75 (0.35–1.60)	0.57
	Male	28 (10.0)	253 (90.0)	*	
Eats bovine meat	Yes	34 (9.9)	308 (90.1)	1.79 (0.62–5.23)	0.39
	No	4 (5.8)	65 (94.2)	*	
The meat provided is cooked	Yes	29 (9.7)	269 (90.3)	0.82 (0.32–2.09)	0.87
	No	6 (11.5)	46 (88.5)	*	
Contact with bovines	Yes	36 (34.0)	70 (66.0)	77.91 (18.32–331.31)	<0.00001
	No	2 (0.7)	303 (99.3)	*	

^a Reference category.^b Fisher's exact test.

membranes, an important source of *N. caninum* infection (Dijkstra et al., 2001) is increased.

Dogs that fed outside of their residences had higher rates of seropositivity, probably due to the possibility of ingesting contaminated food or tissue cysts in rodents, birds and other intermediate hosts of *N. caninum* (Costa et al., 2008). This variable could explain the higher positivity rates observed in dogs from rural and peri-urban areas compared to dogs from urban environments, in accordance with studies by Wouda et al. (1999), Ferroglio et al. (2007), Collantes-Fernández et al. (2008) and Cruz-Vazquez et al., 2008.

Despite evidence of horizontal parasite transmission, no differences among age groups could be statistically confirmed (Table 2). The small sample size of seropositive

animals younger than 12 months is likely to have influenced this result. In the literature, there is no consensus on age as a factor associated with the infection of dogs; some studies show no association with age (Jesus et al., 2006; Romanelli et al., 2007), while others consider age a risk factor (Barber and Trees, 1998; Collantes-Fernández et al., 2008; Cruz-Vazquez et al., 2008). These disparities may be due to the failure of some infected animals to seroconvert or to slow seroconversion that takes several months in some animals (Gondim et al., 2005).

Results of this study confirm that dogs in urban, rural and peri-urban areas of northeastern Brazil are exposed to *N. caninum*. Control measures to prevent infection of dogs in the studied region should be focused primarily on preventing access to potential sources of infection, which

Table 2
Final multivariable logistic regression model for *Neospora caninum* infection in dogs from Ilhéus, State of Bahia, Brazil.

Factors	Odds ratio	95% CI	p
Contact with other dogs (Yes/No)	3.4056	1.4223–8.1545	0.0059
Age < 12 months (Yes/No)	0.1404	0.0185–1.0672	0.0578
Access to food outside the home (Yes/No)	2.1599	1.0507–4.4400	0.0362
Peri-urban environment (Yes/No)	5.7043	1.9301–16.8587	0.0016
Rural environment (Yes/No)	4.6123	1.1887–17.8960	0.0271

Likelihood ratio $p < 0.0001$.

include environments with other dogs, bovines, and other small intermediate hosts, such as birds and rodents.

Acknowledgements

This work has been supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PROCAD/NF-1512/2007).

References

- Barber, J.S., Trees, A.J., 1996. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. *Vet. Rec.* 139, 439–443.
- Barber, J.S., Trees, A.J., 1998. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *Int. J. Parasitol.* 28, 57–64.
- Basso, W., Venturini, L., Venturini, M.C., Moore, P., Rambeau, M., Unzaga, J.M., Campero, C., Bacigalupe, D., Dubey, J.P., 2001. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. *J. Parasitol.* 87, 906–907.
- Cañón-Franco, W.A., Bergamaschi, D.P., Labruna, M.B., Camargo, L.M.A., Souza, S.L.P., Silva, J.C.R., Pinter, A., Dubey, J.P., Gennari, S.M., 2003. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brazil. *Vet. Parasitol.* 115, 71–74.
- Collantes-Fernández, E., Gómez-Bautista, M., Miro, G., Álvarez-García, G., Pereira-Bueno, J., Frisuelos, C., Ortega-Mora, L.M., 2008. Seroprevalence and risk factors associated with *Neospora caninum* infection in different dog populations in Spain. *Vet. Parasitol.* 152, 148–151.
- Costa, K.S., Santos, S.L., Uzêda, R.S., Pinheiro, A.M., Almeida, M.A.O., Araújo, F.R., McAllister, M.M., Gondim, L.F.P., 2008. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 38, 157–159.
- Cruz-Vazquez, C., Medina-Esparza, L., Marentes, A., Morales-Salinas, E., Garcia-Vazquez, Z., 2008. Seroepidemiological study of *Neospora caninum* infection in dogs found in dairy farms and urban areas of Aguascalientes, México. *Vet. Parasitol.* 157, 139–143.
- Dijkstra, T., Eysker, M., Schares, G., Conraths, F.J., Wouda, W., Barkema, H.W., 2001. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int. J. Parasitol.* 31, 747–752.
- Dubey, J.P., Hattel, A.L., Lindsay, D.S., Topper, M.J., 1988. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193, 1259–1263.
- Dubey, J.P., 2003. *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.* 41, 1–16.
- Ferroglio, E., Pasino, M., Ronco, F., Bena, A., Trisciuglio, A., 2007. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in urban and rural dogs in north-west Italy. *Zoonoses Public Health* 54, 135–139.
- Gondim, L.F.P., McAllister, M.M., Pitt, W.C., Zemlicka, D.E., 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 34, 159–161.
- Gondim, L.F.P., McAllister, M.M., Gao, L., 2005. Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. *Vet. Parasitol.* 134, 33–39.
- Hemphill, A., Fuchs, N., Sonda, S., Hehl, A., 1999. The antigenic composition of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 29, 1175–1188.
- Jesus, E.E.V.de., Santos, P.O.M., Barbosa, M.V.F., Pinheiro, A.M., Gondim, L.F.P., Guimarães, J.E., Almeida, M.A.O., 2006. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães nos municípios de Salvador e Lauro de Freitas, Estado da Bahia-Brasil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 43, 5–10.
- Katz, M.H. (Ed.), 1999. *Multivariable Analysis: A Practical Guide for Clinicians*. Cambridge University Press, Cambridge, 192 pp.
- King, J.S., Slapeta, J., Jenkins, D.J., Al-Qassab, S.E., Ellis, J.T., Windsor, P.A., 2010. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 40, 945–950.
- Kramer, L., de Risio, V.M., Tranquillo, V.M., Magnino, S., Genchi, C., 2004. Analysis of risk factors associated with seropositivity to *Neospora caninum* in dogs. *Vet. Rec.* 154, 392–393.
- McAllister, M.M., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Jolley, W.R., Wills, R.A., McGuire, A.M., 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 28, 1473–1478.
- Pasquali, P., Mandara, M.T., Adamo, F., Ricci, G., Polidori, G.A., Dubey, J.P., 1998. Neosporosis in a dog in Italy. *Vet. Parasitol.* 77, 297–299.
- Romanelli, P.R., Freire, R.L., Vidotto, O., Marana, E.R.M., Ogawa, L., De Paula, V.S.O., Garcia, J.L., Navarro, I.T., 2007. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. *Vet. Sci.* 82, 202–207.
- Wouda, W., Dijkstra, T., Kramer, A.M.H., Van Maanen, C., Brinkhof, J.M.A., 1999. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *Int. J. Parasitol.* 29, 1677–1682.

ANEXO 9. OLIVEIRA, U. V.; GALVÃO, G. da S.; SAMPAIO de MAGALHÃES, V. C.; COSTA, S. C. L.; PAIXÃO RIBEIRO, A. R. P. ; ANDRIOLLI, J. L.; MUNHOZ, A. D. Seropositivity for *Neospora caninum* as factor associated with infectious mastitis in crossbred cows in Northeastern Brazil. v.34, n.4. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 2013.

SEROPOSITIVITY FOR *Neospora caninum* AS FACTOR ASSOCIATED WITH INFECTIOUS MASTITIS IN CROSSBRED COWS IN NORTHEASTERN BRAZIL*

Uillians Volkart de Oliveira¹, Gideão da Silva Galvão², Vanessa Carvalho Sampaio de Magalhães¹, Sônia Carmen Lopo Costa¹, João Luciano Andrioli³, Antônio Roberto da Paixão Ribeiro¹ and Alexandre Dias Munhoz¹⁺

ABSTRACT. de Oliveira U.V., Galvão G. da S., de Magalhães V.C.S., Costa S.C.L., Andrioli J.L., Ribeiro A.R. da P. & Munhoz A.D. **Seropositivity for *Neospora caninum* as factor associated with infectious mastitis in crossbred cows in Northeastern Brazil.** [Soropositividade para *Neospora caninum* como fator associado à mastite infecciosa em vacas mestiças no nordeste brasileiro]. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* 34(4):270-274, 2012. Laboratório de Análises Clínicas Veterinária, Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz, Campus Soane Nazaré de Andrade, Rodovia Ilhéus-Itabuna Km 16, Ilhéus, BA 45662-900, Brazil. E-mail: munhoz@uesc.br

The aim of this study was to verify the relation of absence of infectious mastitis in cows exposed to *Neospora caninum*. From 10 dairy farms located in northeastern Brazil 20% of lactating cows were selected, totaling 203 animals. The blood of each cow was obtained for serology; *California Mastitis Test* (CMT) was performed for measurement of somatic cell count. Milk was collected only from teats CMT reagent for bacterial isolation. Serology was performed by indirect immunofluorescent antibody test using cut-off point of 1:200. A structured interview was carried out about animals' management, with variables that could influence mastitis cases, such as: presence of calf during milking, use of milking machine, veterinary care, somatic cell count routinely measured, age of animals, culling of cows in the farms, cleanliness of milker before milking and disinfection of teats before and after milking. Unconditional logistic regression was performed where it was observed that the presence of the calf during milking ($p < 0.0001$) and cows seropositive for *N. caninum* ($p = 0.0311$) were protection associated factors. It was concluded that crossbred cows exposed to *N. caninum* with no history of abortion were less susceptible to mastitis.

KEY WORDS. Cattle, neosporosis, mastitis.

RESUMO. Para verificar a relação da ausência da mastite infecciosa em vacas expostas a *Neospora caninum*, foram selecionadas 20% das vacas em lactação de 10 propriedades leiteiras localizadas no Nordeste do Brasil, totalizando 203 animais. O sangue de cada vaca foi colhido para sorologia; O *California Mastitis testis* (CMT) foi utilizado para

a mensuração da contagem de células somáticas. O leite foi colhido apenas dos tetos reagentes ao CMT, para o isolamento bacteriano. A sorologia foi realizada através da reação de imunofluorescência indireta, utilizando ponto de corte de 1:200. A entrevista estruturada foi realizada sobre o manejo dos animais, com variáveis que poderiam influenciar casos

*Received on December 14, 2011.

Accepted for publication on August 2, 2012.

¹ Médico-veterinário, Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais (DCAA), Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Campus Soane Nazaré de Andrade, Rodovia Ilhéus Itabuna Km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-000, Brasil. * Corresponding author: munhoz@uesc.br

² Médico-veterinário, *M.Ci.Anim.* Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ, 23890-000, Brasil.

³ Biólogo, Departamento de Ciências Biológicas, UESC, Campus Soane Nazaré de Andrade, Rodovia Ilhéus Itabuna Km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-000.

de mastite, tais como: presença de bezerro durante a ordenha, uso de equipamento de ordenha, cuidados veterinários, contagens de células somáticas mensuradas rotineiramente, idade dos animais, abate de vacas em fazendas, higienização do ordenhador antes da ordenha, e desinfecção dos tetos antes e após a ordenha. Regressão logística não condicional foi utilizada, onde foi observado que a presença do bezerro durante a ordenha ($p < 0,0001$) e vacas soropositivas para *N. caninum* ($p = 0,0311$) foram fatores de proteção associados. Conclui-se que vacas mestiças expostas *N. caninum* sem histórico de aborto foram menos suscetíveis a mastite

PALAVRAS-CHAVE. Bovinos, neosporose, mastite.

INTRODUCTION

Neospora caninum is a coccidian parasite with worldwide distribution, accounting for losses in dairy cattle due to induction of abortion (Dubey 1999). Evidence shows that cattle exposed to *N. caninum* can develop some degree of protective immunity against abortion and vertical transmission, suggesting that immunoprophylaxis can be a viable alternative (Dubey et al. 2007).

The subclinical infectious mastitis is that positive to *California Mastitis Test* (CMT), confirmed by microbial growth (Bradley 2002). Infectious mastitis is triggered by invading pathogens and involves leukocyte migration toward the mammary gland (Paape et al. 2003); as infection persists, the number of somatic cells found in milk increases (Leitner et al. 2000, Zhao & Lacasse 2007), indicating inflammation of the gland.

Interactions between *N. caninum* and the host immune system can aid in the protection of the host, the parasite, or both; thus, it is critical to understand the consequences of inducing specific immune responses in the host (Innes et al. 2007). Systemic immunity in cattle is closely associated with the immune response of the udder (Mallard et al. 1998), and seropositive cattle without a history of abortion due to *N. caninum* are more efficient at producing a protective response within the mammary gland (Peregrine et al. 2004). However, few studies on immune response in the udder and *N. caninum* have used animals of purely European origin (*Bos taurus taurus*) (Ould-Amrouche et al. 1999, Peregrine et al. 2004). This study was motivated by the absence of information regarding crossbred cattle for dairy production (European x zebu) and aims to determine the association between exposure to *N. caninum* and infectious mastitis in crossbred cattle.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted in the northeastern region of Brazil (Altitude 47m; 14°70" S and 39°03"W) in 10 dairy farms, from July 2008 to July 2010. Presence of seropositive animals to *N. caninum* (Galvão et al. 2011) and identical production system (semi-extensive system) were the criteria for selection of herds. The herds had an average daily production of 353 kg of milk in the rainy season, and 261.8 kg during the dry season; in addition, the group was composed of crossbred animals (European x zebu) with varied degrees of consanguinity. At least twenty 20% of the lactating cows were selected in each herd, comprising the 203 animals from which blood samples were collected. The selection criterion was to use the cows that were in the milking parlor at the time of the visit. CMT was then performed on the samples collected from all teats. The collected blood was centrifuged at 350g for 10 minutes and, after separation of serum, it was placed in a cryotube, labeled, and kept at -20°C until the conduction of serology. The CMT reagent used was 0.2% bromocresol purple.

Approximately 10mL of milk were collected and put in sterile test tube with screw cap, identified and kept under refrigeration until processing of teats that presented positive reaction by CMT. An aliquot of 20µL of milk was inoculated in 5% defibrinated sheep blood agar and subsequently incubated in a bacteriological incubator at 37°C for 24 to 48 hours. The isolation and identification of bacteria was carried out according to their morphology, staining and biochemical characteristics as proposed by Quinn et al. (2005), characterizing the animal as positive or negative for infectious mastitis.

A structured interview was performed with owners or managers of the farms to obtain information about the management of animals that could influence the cases of mastitis, such as: presence of calf during milking, use of milking machine, veterinary care, somatic cell count (SCC) routinely measured, age of animals, culling of cows in the farms, cleanliness of milker before milking and disinfection of teats before and after milking. The age of the animals was categorized by the determination of the median.

Detection of anti-*N. caninum* antibodies was performed by indirect immunofluorescent antibody test (IFAT) (Yamane et al. 1998), using tachyzoites of the Nc-Bahia strain (Gondim et al. 2001) and a cutoff point of 1:200. Database and statistics soft-

Table 1. Factors assessed in order to verify association with infectious mastitis in cattle from Northeastern Brazil

Factors	Category	Cattle				Odds Ratio (CI 95%)	P*
		Positive		Negative			
		n	%	n	%		
Presence of calf during milking	Yes	43	27.90	111	72.10	0.15 (0.07-0.31)	<0.000001
	No	35	71.40	14	28.60	**	
Seropositive for <i>Neospora caninum</i>	Yes	03	15	17	85	0.25 (0.07-0.89)	0.04
	No	75	40.98	108	59.02	**	
Use of milking machine	Yes	50	45.00	61	55.00	1.87 (1.04-3.34)	0.05
	No	28	30.40	64	69.60	**	
Veterinary care	Yes	28	28.30	71	71.70	0.42 (0.23-0.76)	0.006
	No	50	48.10	54	51.90	**	
Somatic cell count routinely measured	Yes	16	27.58	42	72.41	0.51 (0.26-0.98)	0.06
	No	62	42.80	83	57.20	**	
Cleanliness of milkers before milking	Yes	28	34.60	53	65.40	0.76 (0.42-1.36)	0.44
	No	50	41.00	72	59.00	**	
Disinfection of teats before and after milking	Yes	42	37.90	66	62.10	1.04 (0.59-1.83)	0.99
	No	36	38.90	59	61.10	**	
> 6 years old	Yes	47	41.60	66	58.40	1.35 (0.76-2.41)	0.37
	No	31	34.40	59	65.60	**	

*Using Chi Square test.

** Reference category.

ware Epi Info version 3.5.1 (Centers for Disease Control and Prevention) were used to perform the analysis of the association between the explanatory variables, seropositivity to *N. caninum* and mastitis. The bivariate analysis was made using the χ^2 test, or Fisher exact test, whenever necessary. Before further analysis, Biostat Program for Windows version 5.0 was employed to perform Spearman's correlation matrix, in order to verify the collinearity among the independent variables ($p \geq 0.80$). Variables with $p \leq 0.20$ at the bivariate analysis and $p < 0.80$ at the correlation analysis were included in the multivariable analysis by logistic regression, which was employed to confirm the association between factors and mastitis. The variables introduced in the model were selected through the backward elimination procedure based on the likelihood-ratio test. The required level of significance for a factor to be considered as associated in the final model was set at 5%.

RESULTS AND DISCUSSION

Of the tested animals without infectious mastitis 59.02% (108/183) were seronegative, and 85% (17/20) were seropositive for *N. caninum*, thereby showing a significant association ($p=0.043$) between seropositivity and lack of mastitis (Table 1). All the seropositive cattle had no history of abortion, as reported by producers.

In bivariate analysis, besides of seropositivity to *N. caninum*, the variables: presence of calf during milking, use of milking machine in the property, ve-

terinary care, somatic cell count routinely measured obtained $p < 0.2$ (Table 1), did not show collinearity with each other and thus formed the initial model of logistic regression. The final model showed the presence of the calf during milking and seropositivity for *N. caninum* as a protective factor associated with mastitis (Table 2). As all farms culling old animals, this variable cannot be included in the analysis.

The results of this study corroborate the work of Ould-Amrouche et al. (1999), who noted an association between seropositivity and low SCC count, and Peregrine et al. (2004), who verified that cattle seropositive to *N. caninum* were less likely to show infectious mastitis when compared to seronegative cattle.

An important aspect to consider is that the animals used in this study were crossbred (European x zebu), whereas previous studies have used animals of purely European origin; hence, the mechanisms of resistance to mastitis associated with exposure to *N. caninum* may be similar between *B. t. indicus* and *B. t. taurus*. It is likely that these mechanisms of resistance are related to Th1-type responses observed in cattle that were experimentally infected with

Table 2. Final multivariable logistic regression model for infectious mastitis in cattle from Northeastern Brazil

Factors	Odds Ratio	95% CI	p
Presence of calf during milking (Yes/No)	0.1494	0.0719-0.3104	<0.0001
Seropositive for <i>Neospora caninum</i> (Yes/No)	0.2260	0.0585-0.8738	0.0311

Likelihood <0.0001.

N. caninum (Marks et al. 1998, Lunden et al. 1998, De Marez et al. 1999, Williams et al. 2000, Andrianarivo et al. 2001, Tress et al. 2002). The Th1-type response stimulates production of cytokines, such as interferon gamma (Quiroga et al. 1993), tumor necrosis factor (Rewinski & Yang 1994), granulocyte-macrophage colony stimulating factor (Sordillo et al. 1992, Sordillo & Streicher 2002) and nitric oxide (Goof et al. 1996) these factors are related to the immune defense mechanisms of the host.

Once these cytokines have been employed in the defense of the mammary gland (Daley et al. 1993), it is possible that *N. caninum* seropositive cattle can develop a cross-protective immunity in the udder due to an increase in the Th1 response components, making them more resistant to infections. This hypothesis is consistent with the findings of Hassig & Gottstein (2002) that herds with abortion problems caused by *N. caninum*, and likely an inefficient Th1 response, had high mastitis rates and decreased milk production. Thus, the protective mechanisms of the host, which aid in preventing abortion, can also help to protect the udder. However, further studies are needed to confirm this hypothesis and to determine whether the breed standard can contribute to absence to mastitis.

Although old cows are culled off as prophylactic control, it is believed that culling reaches the same proportion of *N. caninum* seropositive and seronegative animals, as the characteristics of the farms of this study resemble the controls in the study by Hobson et al. (2005), who did not observe a higher culling rate for seropositive animals. Finally, the presence of the calf during milking in *B. t. indicus* had a positive effect, also observed in other studies, either by reducing cases of mastitis (Oliveira et al. 2011), probably by the depletion of the gland, or increase in milk production (Combelle et al. 2003).

CONCLUSION

The exposure to *N. caninum* is a factor associated with absence of infectious mastitis in crossbred cattle in the conditions of this study.

Acknowledgements. This project was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado da Bahia (FAPESB) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We are thankful to Dr. Luis Fernando Pita Gondim of Universidade Federal da Bahia for providing *N. caninum* antigen.

REFERENCES

- Bradley A.J. Bovine mastitis: An evolving disease. *Vet. J.*, 164:116-128, 2002.
- Combelle J.T., Tesorero M. & Gabaldón L. Effect of calf stimulation during milking on milk yield and fat content *Bos indicus* x *Bos taurus* cow. *Livest. Prod. Sci.*, 79:227-232, 2003.
- Daley M.W., Williams T., Coyle T., Furda G., Dougherty R. & Hayes P. Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* infections with recombinant. *Cytokines* 5:276-284, 1993.
- De Marez T., Liddell S., Dubey J.P., Jenkins M.C. & Gasbarre L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *Int. J. Parasitol.*, 29:1647-657, 1999.
- Dubey J.P., Schares G. & Ortega-Mora L.M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 20:323-367, 2007.
- Dubey J.P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 84:349-367, 1999.
- Galvão G.S., Gondim L.F.P., Pereira M.J.S., Oliveira U.V. & Munhoz A.D. Soropositividade para *Neospora caninum* e associação ao abortamento e natimortos em rebanhos leiteiros do sudeste da Bahia, Brasil. *Rev. Bras. Med. Vet.*, 33:234-237, 2011.
- Goff W.L., Johnson W.C., Wyatt C.R. & Cluff C.W. Assessment of bovine mononuclear phagocytes and neutrophils for induced L-arginine-dependent nitric oxide production. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 55:45-62, 1996.
- Gondim L.F.P., Pinheiro A.M., Santos P.O.M., Jesus E.E.V., Ribeiro M.B., Fernandez H.S., Almeida M.A.O., Freire S.M., Meyer R. & McAllister M.M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. *Vet. Parasitol.*, 101:1-7, 2001.
- Hassig M. & Gottstein B. Epidemiological investigations of abortions due to *Neospora caninum* on Swiss dairy farms. *Vet. Rec.*, 150:538-542, 2002.
- Hobson J.C., Duffield T.F., Kelton D., Lissemore S.K., Hietal S.K., Leslie K.E., McEwen B. & Peregrine A.S. Risk factors associated with *Neospora caninum* abortion in Ontario Holstein dairy herds. *Vet. Parasitol.*, 127:177-188, 2005.
- Innes E.A., Bartley P.M., Maley S.W., Wright S.E. & Buxton D. Comparative host-parasite relationships in ovine toxoplasmosis and bovine neosporosis and strategies for vaccination. *Vaccine*, 25:5495-5503, 2007.
- Leitner G., Shoshani E., Krifucks O., Chaffer M. & Saran A. Milk leucocyte population patterns in bovine udder infection of different etiology. *J. Vet. Med., B.* 47:581-589, 2000.
- Lundén A., Marks J., Maley S. & Innes E. Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. *Parasite Immunol.*, 20:519-526, 1998.
- Mallard B.A., Dekkers J.C., Ireland J., Leslie K.E., Sharif S., Lacey Vankampen C., Wagter L. & Wilkie B.N. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *J. Dairy Sci.*, 81:585-595, 1998.
- Marks J., Lundén A., Harkins D. & Innes E. Identification of *Neospora* antigens recognized by CD4⁺ T Cells and im-

- mune sera from experimentally infected cattle. *Parasite Immunol.*, 20:303-309, 1998.
- Oliveira C.M.C., Sousa M.G.S., Silva N.S., Mendonça C.L., Silveira J.S., Oaigen R.P., Andrade S.J.T. & Barbosa J.D. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. *Pesq. Vet. Bras.*, 31:104-110, 2011.
- Ould-Amrouche A., Klein F., Ocsdoit C., Mohammed H.O., Touratier A., Sanaa M. & Mialot J.P. Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Normandy, France. *Vet. Res.*, 30:531-538, 1999.
- Paape M.J., Bannerman D.D., Zhao X. & Lee J.W. The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk. *Vet. Res.*, 34:597-627, 2003.
- Peregrine A.S., Duffield T.F., Wideman G., Kelton D., Hobson J., Cramer G. & Hietala S.K. Udder health in dairy cattle infected with *Neospora caninum*. *Prev. Vet. Med.*, 64:101-112, 2004.
- Quiroga G.H., Nickerson S.C. & Atkinson R.W. Histological response of the heifer mammary gland to intramammary infusion of interleukin-2 or interferon-g. *J. Dairy Sci.*, 76:2913-2924, 1993.
- Rewinski M.J. & Yang T.J. Lactation stage dependent changes in levels of tumour necrosis factor/cachetin in milk. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 31:170-176, 1994.
- Sordillo L.M., Afseth G., Davies G. & Babiuk L.A. Effects of recombinant granulocyte-macrophage colonystimulating factor on bovine peripheral blood and mammary gland neutrophil function in vitro. *Can. J. Vet. Res.*, 56:16-21, 1992.
- Sordillo L.M. & Streicher K.L. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J. Mamm. Biol. Neopl.*, 7:135-146, 2002.
- Thurmond M.C. & Hietala S.K. Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. *Am. J. Vet. Res.*, 57:1559-1562, 1996.
- Trees A.J., McAllister M.M., Guy C.S., McGarry J.W., Smith R.F. & Williams D.J.L. *Neospora caninum*: Oocyst challenge of pregnant cows. *Vet. Parasitol.*, 109:147-154, 2002.
- Williams D.J.L., Guy C.S., McGarry J.W., Guy F., Tasker L., Smith R.F., Maceachern K., Cripps P.J., Kelly D.F. & Trees A.J. *Neospora caninum*- associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology*, 121:347-358, 2000.
- Yamane I., Shibahara T., Kokuho T., Shimura K., Hamaoka T., Haritani M., Conrad P.A., Park C.H., Sawada M. & Umemura T. An improved isolation technique for bovine *Neospora* species. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 10:364-368, 1998.
- Zhao X. & Lacasse P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. *J. Anim. Sci.*, 86:57-65, 2007.

ANEXO 10. LOPES, B. B., BERTO, B. P., LUZ, H. R., GALVÃO G. da S., LOPES, C. W. G. The ruby-crowned tanager *Tachyphonus coronatus* Vieillot (Passeriformes: Thraupidae): a new host for *Isospora navarroi* Berto, Flausino, Luz, Ferreira, Lopes, 2009 (Apicomplexa: Eimeriidae). v.1, n.1. *Coccidia*, 2013.

The ruby-crowned tanager *Tachyphonus coronatus* Vieillot (Passeriformes: Thraupidae): a new host for *Isospora navarroi* Berto, Flausino, Luz, Ferreira, Lopes, 2009 (Apicomplexa: Eimeriidae)

Bruno do Bomfim Lopes | Bruno Pereira Berto | Hermes Ribeiro Luz | Gideão da Silva Galvão | Ildemar Ferreira | Carlos Wilson Gomes Lopes

Submetido em 13.08.2013

Aceito em 21.08.2013

Abstract Lopes BB, Berto BP, Luz HR, Galvão GS, Lopes CWG. 2013. **The ruby-crowned tanager *Tachyphonus coronatus* Vieillot (Passeriformes: Thraupidae): a new host for *Isospora navarroi* Berto, Flausino, Luz, Ferreira, Lopes, 2009 (Apicomplexa: Eimeriidae).** [O tiê-preto *Tachyphonus coronatus* Vieillot (Passeriformes: Thraupidae): Um novo hospedeiro para *Isospora navarroi* Berto, Flausino, Luz, Ferreira, Lopes, 2009 (Apicomplexa: Eimeriidae)] *Coccidia* 1, 2-4. Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brasil. E-mail: bertobp@ufrj.br

This study report ruby-crowned tanagers *Tachyphonus coronatus* Vieillot parasitized by *Isospora navarroi* Berto, Flausino, Luz, Ferreira, Lopes, 2009. This coccidium was originally described parasitizing the Brazilian tanager *Ramphocelus bresilius dorsalis* Sclater and thereafter from the palm tanager *Thraupis palmarum* Wied; however it has never been described in other hosts. Its oocysts are spherical to subspherical, $21.0 \times 20.6 \mu\text{m}$, with a smooth, bilayered wall. Micropyle, oocyst residuum and polar granule were absent. The sporocysts are ellipsoidal, $15.2 \times 9.3 \mu\text{m}$. The Stieda body is flattened and the substieda body is small and delicate. The sporocyst residuum is composed of scattered granules, which sometimes, turns into a ring form. The sporozoites are vermiform, with a robust and elongate posterior refractile body.

Keywords Morphology, sporulated oocysts, Coccidia, Thraupidae, Passeriformes, Marambaia Island.

Resumo Este estudo relata tiês-pretos *Tachyphonus coronatus* Vieillot parasitados por *Isospora navarroi* Berto, Flausino, Luz, Ferreira, Lopes, 2009. Este coccídeo foi originalmente descrita parasitando o tiê-sangue *Ramphocelus bresilius dorsalis* Sclater e, posteriormente, o sanhaço-do-coqueiro *Thraupis palmarum* Wied, no entanto, nunca foi descrito em outros hospedeiros. Seus oocistos são esféricos a sub-esféricos, $21.0 \times 20.6 \mu\text{m}$, com parede dupla e lisa. Micrópila, resíduo e grânulo polar estão ausentes. Os esporocistos são elipsoidais, $15.2 \times 9.3 \mu\text{m}$. O corpo de Stieda é achatado e o corpo substieda é pequeno e delicado. O resíduo do esporocisto é composto de grânulos dispersos, que, algumas vezes, formam um anel. Os esporozoítos são vermiformes, com corpo refrátil posterior robusto

BB Lopes

Biólogo Autônomo associado ao Laboratório de Coccídios e Coccidioses, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).
E-mail: biolopesbb@hotmail.com

BP Berto ✉ | **I Ferreira**

Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, UFRRJ, BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brasil.
E-mail: bertobp@ufrj.br
ferreira@ufrj.br

HR Luz | **GS Galvão**

Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRRJ.
E-mail: hermes@ufrj.br
galvaovet@gmail.com

CWG Lopes

Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, UFRRJ. CNPq fellowship.
E-mail: lopescw@ufrj.br

e alongado.

Palavras-chave Morfologia, oocistos esporulados, Coccidia, Thraupidae, Passeriformes, Ilha da Marambaia.

Introduction

The ruby-crowned tanager *Tachyphonus coronatus* Vieillot is an endemic thraupid bird from South America. It habits in Argentina, Brazil and Paraguay. Its distribution and ecological niches are similar to the others tanagers, as the Brazilian tanager *Ramphocelus bresilius dorsalis* Sclater and the palm tanager *Thraupis palmarum* Wied (Sick 1997, CBRO 2011, IUCN 2013).

Recently, some coccidian parasites were reported from birds on the Marambaia island. From thraupids, six *Isoospora* Schneider, 1881 were recorded: (1) *Isoospora tiesangui* Berto, Flausino, Luz, Ferreira, Lopes, 2008; (2) *Isoospora marambaiensis* Berto, Flausino, Luz, Ferreira, Lopes, 2008; (3) *Isoospora sepetibensis* Berto, Flausino, Luz, Ferreira, Lopes, 2008; (4) *Isoospora cadimi* Berto, Flausino, Luz, Ferreira, Lopes, 2009; (5) *Isoospora navarroi* Berto, Flausino, Luz, Ferreira, Lopes, 2009 and (6) *Isoospora ramphoceli* Berto, Flausino, Luz, Ferreira, Lopes, 2010. All these species were described from the Brazilian tanager *R.b. dorsalis* (Berto et al. 2008, 2009, 2010a); however, *I. tiesangui* was reported from the palm tanager *T. palmarum* and blue dacnis *Dacnis cayana* Linnaeus and *I. navarroi* was reported from the palm tanager *T. palmarum* (Berto et al. 2010b, 2011b).

The aim of this study was to report one more host for *I. tiesangui* in Marambaia Island: the ruby-crowned tanager *T. coronatus*.

Materials and methods

Four ruby-crowned tanagers were captured using nets at Marambaia Island (23°04'S, 43°53'W) in the State of Rio de Janeiro. They were kept in individual cages, and feces were collected immediately after defecation. After identification, the birds were released and the fecal samples were placed in plastic vials containing 2.5% potassium dichromate solution (K₂Cr₂O₇) 1:6 (v/v). Samples were carried to the Laboratório de Coccídios e Coccidioses,

Universidade Federal do Rio de Janeiro. Samples were placed in a thin layer (c.5 mm) of K₂Cr₂O₇ 2.5% solution in Petri plates and incubated at 23-28°C for 10 days or until 70% of the oocysts were sporulated. Oocysts were recovered by flotation in Sheather's sugar solution (S.G. 1.20) and examined microscopically using the technique described by Duszynski & Wilber (1997). Morphological observations and measurements, given in micrometers (µm), were made using a Carl Zeiss binocular microscope with an apochromatic oil immersion objective lens and an ocular micrometer (K-15X PZO, Poland). Line drawings were prepared using a Wild M-20 binocular microscope with a drawing tube. Photomicrographs were taken using a digital camera (Sony CD Mavica MVC-CD250). Size ranges are shown in parenthesis followed by average and shape index (L/W ratio).

Results and discussion

Four ruby-crowned tanagers were examined; being that one was positive for coccidia. Initially, the oocysts were nonsporulated, while 70% sporulated by day three.

The identified oocysts (Fig. 1) were spherical to subspherical, 21.0 (20-22) × 20.6 (20-21) µm, with shape-index of 1.02. Oocyst wall bi-layered and smooth, 1.1µm. Micropyle, oocyst residuum and polar granule are absent. Sporocysts ellipsoidal, 15.2 (15-16) × 9.3 (9-10) µm, with shape-index of with 1.63. Stieda body flattened, 0.5 high × 1.5 wide. Substieda body small and delicate, 1.0 high × 2.5 wide. Parastieda body absent. Sporocyst residuum composed of scattered granules, which sometimes, turns into a ring form. Sporozoites vermiform, with a robust and elongate posterior refractile body.

These oocysts had the same characteristic features of the oocysts of *I. navarroi* described from *R.b. dorsalis* and *T. palmarum* on Marambaia Island. Therefore, in the current study, a new host for *I. navarroi* is recorded, once that feature-similar oocysts were recovered from the ruby-crowned tanager *T. coronatus*.

Acknowledgements

This study was supported by grants from

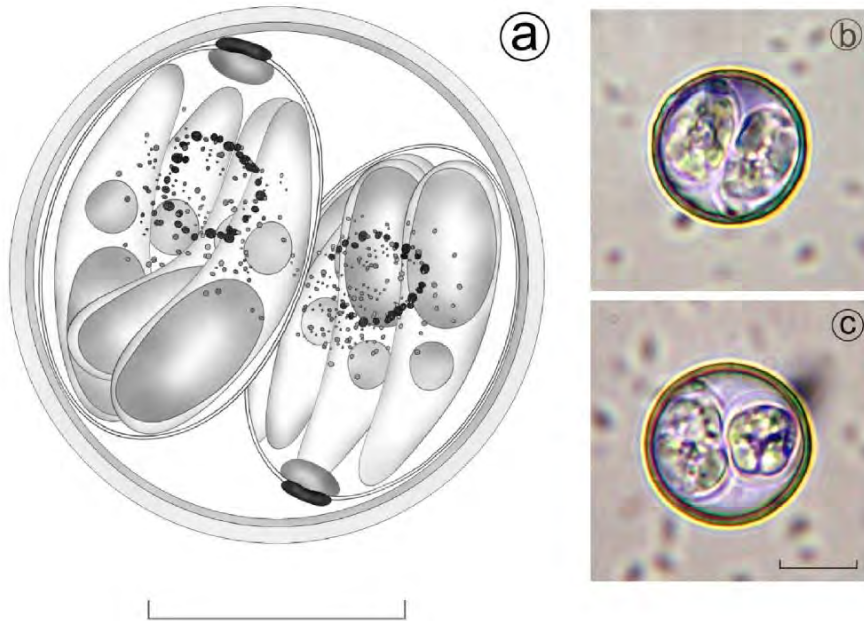


Fig. 1. Sporulated oocysts of *Isospora navarroi* recovered from ruby-crowned tanagers *Tachyphonus coronatus*: Composite line drawing (a) and photomicrographs. Scale-bar: 10 μ m.

the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) to B. P. Berto (E-26/110.987/2013). We also thank the Brazilian Navy, in special to the command of CADIM (Centro de Adestramento da Ilha da Marambaia) that allowed us to access the Marambaia Island, located in Rio de Janeiro State, Brazil, and use some of the facilities of CADIM during the field work.

References

- Berto BP, Flausino W, Luz HR, Ferreira I, Lopes CWG. Three New Coccidian Parasites of Brazilian Tanager (*Ramphocelus bresilius dorsalis*) from South America. *Acta Protozoologica*, 47, 77-81, 2008.
- Berto BP, Flausino W, Luz HR, Ferreira I, Lopes CWG. Two new *Isospora* species from Brazilian tanager (*Ramphocelus bresilius dorsalis*) of South America. *Parasitology Research*, 105, 635-639, 2009.
- Berto BP, Flausino W, Luz HR, Ferreira I, Lopes CWG. *Isospora ramphoceli* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Brazilian tanager (Aves: Passeriformes: Thraupidae) *Ramphocelus bresilius dorsalis* Sclater, 1855. *Zootaxa*, 2650, 57-62, 2010a.
- Berto BP, Luz HR, Ferreira I, Flausino W, Lopes CWG. Two new hosts for *Isospora tiesangui* Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 32, 169-171, 2010b.
- Berto BP, Flausino W, McIntosh D, Lopes CWG. Coccidia of New World passerine-birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). *Systematic Parasitology*, 80, 159-204, 2011a.
- Berto BP, Luz HR, Flausino W, Teixeira-Filho WL, Ferreira I, Lopes CWG. Isosporoid Coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) parasites of tanagers (Passeriformes: Thraupidae) from the Marambaia Island, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*,

- 31, 798-805, 2011b.
- CBRO. Lista das aves do Brasil. Rio de Janeiro: Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos, 2011.
- Duszynski DW, Wilber PG. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeridae. *Journal of Parasitology*, 83, 333-336, 1997.
- IUCN. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. 2013. <http://www.iucnredlist.org> [15-08-2013]
- Sick H. *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.

ANEXO 11. ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO:

GALVÃO, G. da S.; FLAUSINO, W.; LOPES, C.W.G. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em rebanhos de búfalos (*Bubalus bubalis*) no estado do Rio de Janeiro, Brasil. v.35, supl.2, *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 2013.

REVISTA BRASILEIRA DE MEDICINA VETERINÁRIA
ISSN 0100-2430 - Periódico de Informação Técnico Científico
SOCIEDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA DO RIO DE JANEIRO
Avenida Presidente Vargas, 446/1004 – Edifício Delamare – Centro, Rio de Janeiro, 20.085-900, RJ
E-mail: somveri@gmail.com

RBMV 86/2014-Somverj


Em, 29 de abril de 2014

Prezada Dr.
Gideão da Silva Galvão
Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
Instituto de Veterinária, UFRRJ
Campus Seropédica, BR 465 km 7
Seropédica, 23897-970, RJ.
E-mail: galvaovet@gmail.com

Comunico a V.Sa., e aos demais autores que o artigo abaixo relacionado foi aceito para ser publicado na *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. Este periódico está indexado até o presente momento no CABI, AGRICOLA, ISI (Web of knowledge), AGRIS-FAO, sendo considerada como B1 no *Qualis/CAPES*.

Galvão, G. da S., Flausino, W. & Lopes C.W.G. [**Frequency of antibodies anti-*Neospora caninum* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the State of Rio de Janeiro, Brazil**]. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em búfalos (*Bubalus bubalis*) no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35(supl. 2): 00-00, 2013.

Atenciosamente



Carlos Wilson Gomes Lopes PhD, LD
Editor (lopes.rbmrv@gmail.com)

ANEXO 12. LOPES, B. do B.; LUZ, H.B.; GALVÃO, G. da S.; FERREIRA, I.; LOPES, C.W.G. *Isospora pitiguari* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the rufous-browed peppershrike (Aves: Passeriformes: Vireonidae) *Cyclarhis gujanensis* Gmelin, 1789. v. 3760, n. 1, *Zootaxa*, 2014.

<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3760.1.7>
<http://zoobank.org/urn:lsid:zoobank.org:pub:6F77E0AF-158F-4078-8233-118EB0344903>

***Isospora pitiguari* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the rufous-browed peppershrike (Aves: Passeriformes: Vireonidae)
Cyclarhis gujanensis Gmelin, 1789**

BRUNO DO BOMFIM LOPES¹, BRUNO PEREIRA BERTO^{2,5}, HERMES RIBEIRO LUZ³,
GIDEÃO DA SILVA GALVÃO³, ILDEMAR FERREIRA² & CARLOS WILSON GOMES LOPES^{4,5}

¹Programa de Pós-graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brazil

²Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, UFRRJ, BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brazil

³Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRRJ, BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brazil

⁴Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, UFRRJ, BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brazil

⁵Corresponding authors. E-mail: bertobp@ufrj.br; lopeswlg@ufrj.br

Abstract

In the current study, a new coccidian species (Protozoa: Apicomplexa: Eimeriidae), collected from the rufous-browed peppershrike *Cyclarhis gujanensis* Gmelin, 1789, is reported from Brazil. *Isospora pitiguari* n. sp. has oocysts, which are spherical to sub-spherical, 26.8 × 25.7 µm, with smooth, bilayered wall ~1.5 µm thick. Micropyle, oocyst residuum, and polar granule are absent. Sporocysts are rounded to slightly ovoidal, 14.4 × 11.6 µm. Stieda body flattened and substieda body prominent and rounded. Sporocyst residuum is composed of granules of different sizes. Sporozoites are vermiform with one refractile body and a nucleus. This is the first description of an isosporoid coccidium infecting a New World vireo.

Key words: taxonomy, morphology, coccidia, *Isospora*, oocysts, Passeriformes, Vireonidae, Marambaia Island, Rio de Janeiro, Brazil

Introduction

The rufous-browed peppershrike *Cyclarhis gujanensis* Gmelin, 1789 is a New World vireo. It is widespread and often common in woodland, forest edge, and cultivation with some tall trees from Mexico and Trinidad south to Argentina and Uruguay (Sick 1997; CBRO 2011; IUCN, 2013).

Boughton *et al.* (1938) recovered *Isospora*-like oocysts from feces of red-eyed vireos *Vireo olivaceus* Linnaeus, 1766. These oocysts were obtained from captured vireos in zoos, but no species were described or named. After this report, coccidia have never been reported from vireos. However, according Cicero & Johnson (2001) and CBRO (2011), this family is phylogenetically closely related to the Corvidae and Meliphagidae, into Parvorder Corvida, from which four distinct isosporoid species have been described to date (Berto *et al.*, 2011).

The current study describes the first coccidian species infecting the rufous-browed peppershrike *C. gujanensis*, a New World vireo, on Marambaia Island, Rio de Janeiro State, Brazil.

Material and methods

One rufous-browed peppershrike was captured using nets in Marambaia Island (23°04'S, 43°53'W). The bird was kept for 10–20 min in an individual cage and feces collected immediately after defecation. After identification of the bird species, the bird was released and the fecal samples were placed in plastic vials containing 2.5% potassium dichromate solution (K₂Cr₂O₇) 1:6 (v/v). Samples were sent to the Laboratório de Coccídios e Coccidioses,

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Samples were placed in a thin layer (~5 mm) of $K_2Cr_2O_7$ 2.5% solution in Petri plates and incubated at 23–28°C for 10 days or until ~70% of the oocysts were sporulated. Oocysts were recovered by flotation in Sheather's sugar solution (Specific gravity: 1.20) and examined microscopically using the technique described by Duszynski & Wilber (1997). Morphological observations and measurements, given in micrometers (μm), were made using a Carl Zeiss binocular microscope with an apochromatic oil immersion objective lens and an ocular micrometer (K-15X PZO, Poland). Line drawings were prepared using a Wild M-20 binocular microscope with a drawing tube. Micrographs were taken using a digital camera (Sony model CD Mavica MVC-CD250). Size ranges are shown in parenthesis after average and shape index (L/W ratio). *Abbreviations*: total number of measurements [n], micropyle [M], oocyst residuum [OR], polar granule [PG], Stieda body [SB], substieda body [SSB], parastieda body [PSB], sporocyst residuum [SR], sporozoite [SZ], refractile body [SRB], nucleus [N].

Results

The captured rufous-browed peppershrike was a healthy male and shed oocysts of one species. Initially, the oocysts were non-sporulated, but 70% were sporulated by day four.

Isospora pitiguari n. sp.

Type host: Rufous-browed peppershrike *Cyclarhis gujanensis* Gmelin, 1789 (Aves: Passeriformes: Vireonidae).

Type locality. Marambaia Island (23°04'S, 43°53'W), Rio de Janeiro, Brazil.

Site of infection. Not investigated.

Type-material. One-half of the oocysts were kept in 10% aqueous buffered formalin (v/v) and the other half were stored in 70% ethanol according Duszynski & Gardner (1991). Both samples were deposited in the Parasitology Collection, in the Department of Animal Parasitology, at UFRRJ, located in Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil. Phototypes and line drawings were deposited as well. The repository number is P-46/2013.

Etymology. The specific epithet is derived from the common local name for the host, which is 'pitiguari'.

Description (Figs 1a–c; 2a–c). Oocyst shape (n = 11) spherical to sub-spherical; oocyst wall bilayered; wall thickness 1.5 (1.3–1.6); outer wall smooth, $c. 2/3$ of total thickness; $L \times W = 26.8 \times 25.7$ (23–28 \times 23–28), L/W ratio = 1.0 (1.0–1.1); M, PG and OR: absent. Sporocyst shape (n = 11) rounded to slightly ovoidal; $L \times W = 14.4 \times 11.6$ (13–15 \times 10–13); L/W ratio = 1.2 (1.2–1.3); SB present, flattened, 0.5 high \times 2.5 wide; SSB present, prominent, rounded, 2.0 high \times 3.0 wide; PSB absent; SR present, composed of granules of different sizes; SZ vermiform with 1 posterior SRB and centrally located N.

Remarks. *Isospora pitiguari* differs from other *Isospora* species from the passerines of same Parvorder (Table 1). In *I. pitiguari* lack PG, which is present in *Isospora brachyrhynchi* Webster & Cawthorn, 1985, *Isospora cyanocoracis* Upton, Current & Clubb, 1985, *Isospora calocitta* Upton, Wright & Langen, 1995 and *Isospora samoensis* Adamczyk, McQuiston & LaPointe, 2004. Besides, these four species have elongated/ ovoidal sporocysts, whereas in *I. pitiguari* the sporocysts are sub-spherical (Berto *et al.* 2011).

Discussion

Despite of the large range of *C. gujanensis* in the New World, this bird is rarely observed or captured at Marambaia Island. In 15 years of work by one of us (IF) in Marambaia Island, this is the first capture of this bird on the island. Therefore, only one fecal sample could be collected. Also for this reason, very few oocysts could be observed because only 50% of the single sample was processed, with the rest deposited in 10% aqueous buffered formalin and 70% ethanol. The 11 oocysts observed were carefully identified and measured to ensure the reliability of the description.

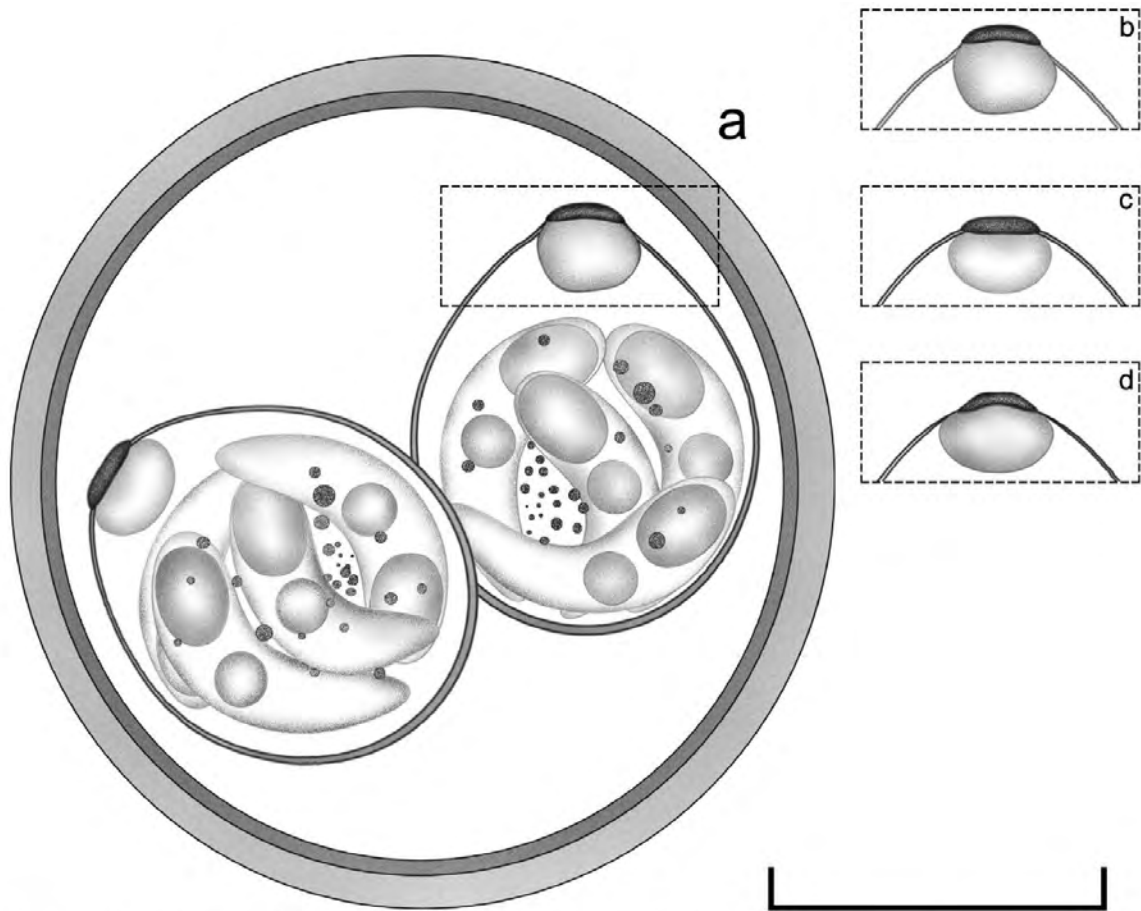


FIGURE 1. Line drawings of *Isospora pitiguari* n. sp., a new coccidium species recovered from the rufous-browed peppershrike *Cyclarhis gujanensis*. (a) sporulated oocyst with its respective variations of (b–d) Stieda and substieda bodies. Scale–bar: 10µm.

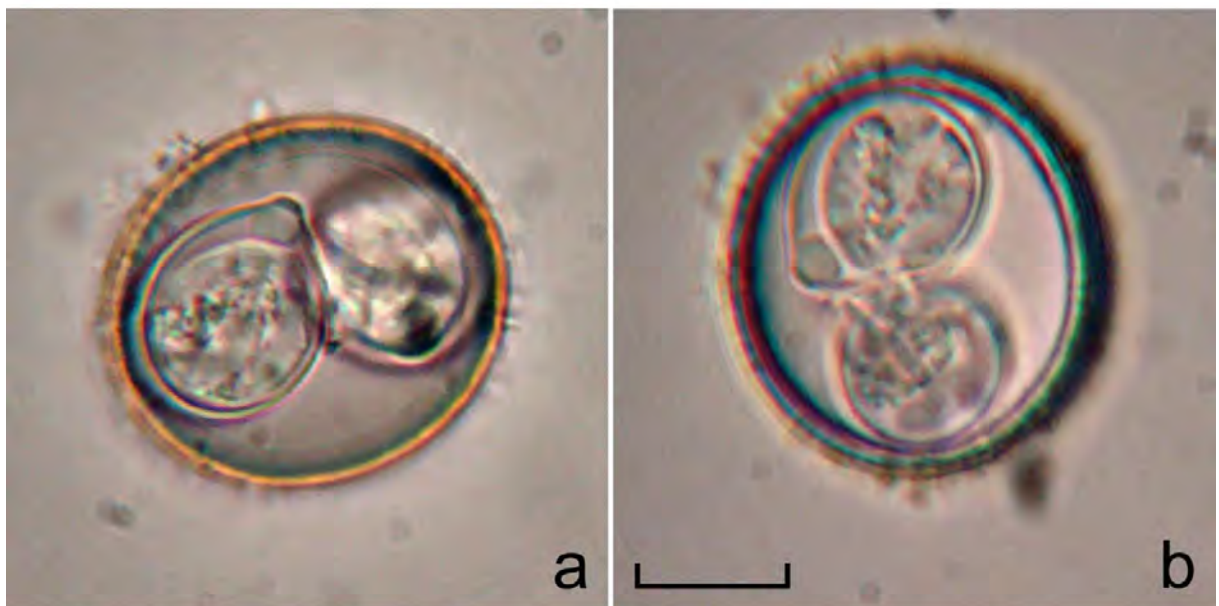


FIGURE 2. Photographs (a–b) of sporulated oocysts of *Isospora pitiguari* n. sp., a new coccidium species recovered from the rufous-browed peppershrike *Cyclarhis gujanensis*. Scale-bar: 10µm.

TABLE 1. Comparative morphology of *Isospora pitiguari* n. sp. and *Isospora* spp. recorded from Parvorder Corvida in New World.

Coccidia	Host	Reference	Oöcysts				
			Shape	Measurements (µm)	Shape index	Wall (µm)	Polar granule
<i>I. brachyrhynchi</i>	<i>Corvus brachyrhynchos</i> Brehm, 1822 (Corvidae)	Wobester & Cawthorn (1985)	sub-spherical	20.4 × 18.9 (15–25 × 14–23)	1.1 (1.0–1.3)	c.1.0	present
<i>I. cyanocoracis</i>	<i>Cyanocorax chrysops</i> Vieillot, 1818 (Corvidae)	Upton <i>et al.</i> (1985)	sub-spherical	28.7 × 26.8 (25–30 × 24–29)	1.1 (1.0–1.1)	bi-layered, c.2.0	present, 1 or 2
<i>I. calocitta</i>	<i>Calocitta formosa</i> Swainson, 1827 (Corvidae)	Upton <i>et al.</i> (1995)	sub-spherical	28.8 × 27.7 (26–31 × 25–29)	1.0 (1.0–1.1)	bi-layered, c.2.0	present, 1 to 3
<i>I. samoensis</i>	<i>Foulehaio carunculatus</i> Gmelin, 1788 (Meliphagidae)	Adamczyk <i>et al.</i> (2004)	ovoid	28.9 × 26.1 (25–32 × 23–30)	1.1 (1.0–1.3)	bi-layered	present, 1 or 2
<i>I. pitiguari</i>	<i>Cyclarhis gujanensis</i> Gmelin, 1789 (Vireonidae)	Current study	sub-spherical	26.8 × 25.7 (23–28 × 23–28)	1.0 (1.0–1.1)	bi-layered, c.1.5	absent

continued.

Coccidia	Host	Reference	Sporocysts				
			Shape	Measurements (µm)	Stieda body	Substieda body	Residuum
<i>I. brachyrhynchi</i>	<i>Corvus brachyrhynchos</i> Brehm, 1822 (Corvidae)	Wobester & Cawthorn (1985)	elongate	16.2 × 10.6 (14–20 × 8–13)	present	–	diffuse
<i>I. cyanocoracis</i>	<i>Cyanocorax chrysops</i> Vieillot, 1818 (Corvidae)	Upton <i>et al.</i> (1985)	ovoid	19.3 × 11.4 (17–21 × 10–12)	prominent	homogeneous	compact
<i>I. calocitta</i>	<i>Calocitta formosa</i> Swainson, 1827 (Corvidae)	Upton <i>et al.</i> (1995)	ovoid	20.1 × 12.6 (19–22 × 11–14)	present	present	diffuse
<i>I. samoensis</i>	<i>Foulehaio carunculatus</i> Gmelin, 1788 (Meliphagidae)	Adamczyk <i>et al.</i> (2004)	ovoid	17.1 × 10.9 (16–18 × 10–11)	large	retangular	compact
<i>I. pitiguari</i>	<i>Cyclarhis gujanensis</i> Gmelin, 1789 (Vireonidae)	Current study	rounded to slightly ovoidal	14.4 × 11.6 (13–15 × 10–13)	flattened	rounded	diffuse

The collecting of symbiotype hosts is important for future studies. However, in Brazil, the native birds are protected by law and supervised by IBAMA (the Brazilian Institute of the Environment and Natural Renewable Resources). Thus, it was not possible for us to archive the symbiotype host.

According to Duszynski & Wilber (1997) and Berto *et al.* (2011), a new coccidian species from passerines should be morphologically compared with other congeneric coccidian species that share similar features and belong to the same host family. Therefore, despite of the unlikely transmission of coccidia between passerines of different families, due to the lack of descriptions of coccidian parasites from New World vireos, *I. pitiguari* was compared with the coccidia from birds of the families Corvidae and Meliphagidae, which are closely related to the Vireonidae.

Based on Table 1, it can be concluded that *I. pitiguari* is easily differentiated using the morphology and morphometry of the oocysts from *Isospora* species from New World passerines of same Parvorder. In addition, it is

possible that *I. pitiguari* is isolated on Marambaia Island along with its host *C. gujanensis* because the transmission between non-sympatric birds that inhabit distant continents, or islands is unlikely, as occurs with coccidia reported in Hawaii and American Samoa (Berto & Lopes, 2013). However, the Marambaia Island has a sand zone of around 40 km in extension (Marambaia Coastal Restinga), which is connected to the continent.

Finally, *I. pitiguari* is considered to be new to science, being the first description in a New World vireo.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) to B. P. Berto (E-26/110.987/2013). We also thank the Brazilian Navy, especially to the command of CADIM (Centro de Adestramento da Ilha da Marambaia) that allowed us to access the Marambaia Island, located in Rio de Janeiro State, Brazil, and use some of the facilities of CADIM during the field work.

References

- Adameczyk, K.J., McQuiston, T.E. & LaPointe, D. (2004) A new coccidian parasite, *Isospora samoensis*, from the wattled honeyeater (*Foulehaio carunculata*) from American Samoa. *Acta Protozoologica*, 43, 179–181.
- Berto, B.P., Flausino, W., McIntosh, D., Teixeira-Filho, W.L. & Lopes, C.W.G. (2011) Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). *Systematic Parasitology*, 80, 159–204.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11230-011-9317-8>
- Berto, B.P. & Lopes, C.W.G. (2013) Distribution and Dispersion of Coccidia in Wild Passerines of the Americas. In: Ruiz, L. & Iglesias, L. (Eds.), *Birds: Evolution and Behavior, Breeding Strategies, Migration and Spread of Disease*. Nova Science Publishers, New York, pp. 47–66.
- Boughton, D.C., Boughton, R.B. & Volk, J. (1938) Avian hosts of the genus *Isospora* (Coccidiidae). *Ohio Journal of Science*, 38, 149–163.
- CBRO (2011) *Lista das aves do Brasil*. Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos, Rio de Janeiro, 38 pp.
- Cicero, C. & Johnson, N. K. (2001) Higher-level phylogeny of New World vireos (Aves: Vireonidae) based on sequences of multiple mitochondrial DNA genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20, 27–40.
<http://dx.doi.org/10.1006/mpev.2001.0944>
- Duszynski, D.W. & Gardner, S.L. (1991) Fixing coccidian oocysts is not an adequate solution to the problem of pre-serving protozoan type material. *Journal of Parasitology*, 77, 52–57.
- Duszynski, D. & Wilber, P. (1997) A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *Journal of parasitology*, 83, 333–336.
- IUCN (2013) International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. Available from: <http://www.iucnredlist.org> (accessed 19 July 2013)
- Sick, H. (1997) *Ornitologia Brasileira*. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 862 pp.
- Upton, S.J., Current, W. & Clubb, S. (1985) Two new species of *Isospora* (Apicomplexa: Eimeriidae) from passeriform birds of South America. *Systematic Parasitology*, 7, 227–229.
<http://dx.doi.org/10.1007/bf00011453>
- Upton, S.J., Langen, T.A. & Wright, T.F. (1995) A new species of *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the white-throated magpie jay *Calocitta formosa* (Passeriformes: Corvidae) from Costa Rica. *Systematic Parasitology*, 31, 195–199.
<http://dx.doi.org/10.1007/bf00009117>
- Wobester, G.A. & Cawthorn, R.J. (1985) Exogenous and endogenous stages of *Isospora brachyrhynchi* sp. n. (Protozoa: Eimeriidae) from the American crow *Corvus brachyrhynchos* Brehm. *Canadian Journal of Zoology*, 63, 2639–2645.
<http://dx.doi.org/10.1139/z85-394>

ANEXO 13. LOPES, B. DO B.; BERTO, B. P.; LUZ, H. R.; GALVÃO, G. da S.; FERREIRA, I.; LOPES, C. W. G. *Isospora massardi* sp. nov. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the white-necked thrush *Turdus albicollis* (Passeriformes: Turdidae) from Brazil. v. 59, n.2, *Acta Parasitologica*, 2014.

Isospora massardi sp. nov. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the white-necked thrush *Turdus albicollis* (Passeriformes: Turdidae) from Brazil

Bruno do Bomfim Lopes¹, Bruno P. Berto^{2*}, Hermes Ribeiro Luz³, Gideão da Silva Galvão³,
Ildemar Ferreira² and Carlos Wilson G. Lopes^{4*}

¹Programa de Pós-graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brazil; ²Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, UFRRJ, BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brazil; ³Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRRJ, BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brazil; ⁴Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, UFRRJ, BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brazil

Abstract

A new coccidian species (Protozoa: Apicomplexa: Eimeriidae) are reported from the white-necked thrush *Turdus albicollis* Vieillot, 1818, a very common species in South America. *Isospora massardi* sp. nov. oocysts are subspherical, $18.6 \times 17.7 \mu\text{m}$, with smooth, bilayered wall, $\sim 0.9 \mu\text{m}$. Micropyle, oocyst residuum are absent, but two polar granules are frequently present. Sporocysts are ovoidal, $14.8 \times 9.3 \mu\text{m}$. Stieda body is knob-like to rounded and substieda body is rounded. Sporocyst residuum is composed of scattered spherules of different sizes. Sporozoites are vermiform with posterior and anterior refractile bodies and a nucleus. This is the sixth description of an isosporoid coccidium infecting a New World turdid bird.

Keywords

Taxonomy, morphology, coccidia, *Isospora*, oocysts, Passeriformes, Turdidae, Marambaia Island, Rio de Janeiro, Brazil

Introduction

The white-necked thrush *Turdus albicollis* Vieillot, 1818 is a turdid bird from South America. It has a wide distribution in Argentina, Bolivia, Brazil, Colombia, Ecuador, French Guiana, Guyana, Paraguay, Peru, Suriname, Trinidad and Tobago, Uruguay and Venezuela. It is found in the undergrowth and near the ground in humid forest and seems to be quite a shy bird. It feeds on or near the ground on invertebrates, and will follow army ant swarms. It also takes some fruit and berries (Sick 1997, CBRO 2011, IUCN 2013). The current study describes a new coccidian species infecting white-necked thrushes *T. albicollis* on Marambaia Island, Rio de Janeiro State, Brazil.

Materials and Methods

Twenty white-necked thrushes were captured using nets in Marambaia Island (23°04'S, 43°53'W). They were kept for 10–20 minutes in individual cages, and feces were collected

immediately after defecation. After identification of the bird species, they were released and the fecal samples were placed in plastic vials containing 2.5% potassium dichromate solution ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 1:6 (v/v). Samples were carried to the Laboratório de Coccídios e Coccidioses located at the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Samples were placed in a thin layer (c. 5 mm) of 2.5% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ solution in Petri plates and incubated at 23–28°C for 10 days or until 70% of the oocysts were sporulated. Oocysts were recovered by flotation in Sheather's sugar solution (S.G. 1.20) and examined microscopically using the technique described by Duszynski and Wilber (1997). Morphological observations, line drawings, photomicrographs and measurements, given in micrometers, were made using a Olympus BX binocular microscope coupled to a digital camera Eurocam 5.0. Size ranges are in parentheses following the means. *Abbreviations*: total number of measurements [N], micropyle [M], oocyst residuum [OR], polar granule [PG], Stieda body [SB], substieda body [SSB], parastieda body [PSB], sporocyst residuum [SR], sporozoite [SZ], refractile body [SRB], length [L] and width [W].

*Corresponding author: bertobp@ufrj.br/lopescw@ufrj.br

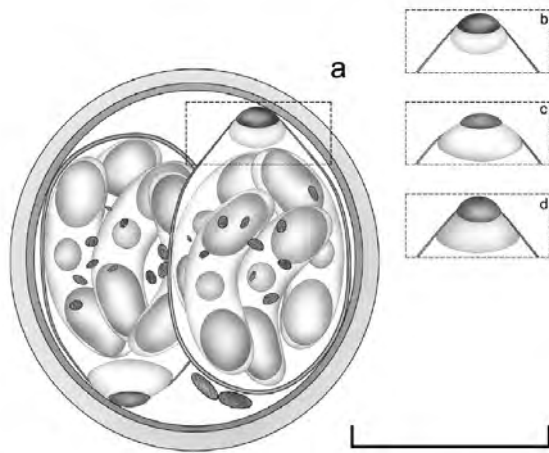


Fig. 1. Line drawings of *Isospora massardi*, a new coccidian species recovered from the white-necked thrush *Turdus albicollis*. **a.** Sporulated oocyst with its respective variations of (**b-d**) Stieda and substieda bodies detached. Scale-bar = 10 µm

Results

Twenty white-necked thrushes were examined; four of them shed oocysts in the feces. Initially, the oocysts were non-sporulated, but 70% sporulated by day four.

***Isospora massardi* sp. nov.** (Figs 1a-d, 2a-c)

Description of sporulated oocyst: Oocyst shape (N = 15): subspherical; number of walls: 2; wall thickness: 0.9 (0.8–1.0); outer wall smooth, about 2/3 of total thickness; L × W: 18.6 × 17.7 (15–21 × 14–19), with L/W ratio: 1.05 (1.0–1.1); M and OR: absent; PG: present, frequently as two ellipsoidal granules, ~ 1.5 × 0.5.

Description of sporocyst and sporozoites: Sporocyst shape (N = 15): ovoidal; L × W: 14.8 × 9.3 (13–16 × 8–11); L/W

ratio: 1.6 (1.4–1.8); SB: present, knob-like to rounded, ~ 1.0 × 2.0; SSB: present, rounded, ~ 1.5 × 3.5; PSB: absent; SR: present, and composed of scattered spherules of different sizes; SZ: vermiform with posterior and anterior SRB and a nucleus.

Type-host: The white-necked thrush *Turdus albicollis* Vieillot, 1818 (Passeriformes: Turdidae).

Type-locality: Marambaia Island (23°04'S, 43°53' W), Rio de Janeiro, Brazil.

Material deposited: Oocysts stored in 10% aqueous buffered formalin (v/v), and deposited in the Parasitology Collection, in the Department of Animal Parasitology, at UFRRJ, located in Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil. Phototypes and line drawings are deposited at the same location. The repository number is P-47/2013.

Site of infection: Unknown. Oocysts collected from fecal samples.

Prevalence: 20% (4 of 20 examined birds).

Etymology: The specific name is derived from the family name of a Brazilian parasitologist Dr. Carlos Luiz Massard, given in his honor for his contribution to the study of protozoa.

Remarks: In the host-family Turdidae, *I. massardi* has oocysts with similar dimensions to the oocysts of *Isospora zorzali* Keeler, Yabsley, Gibbs, McGraw, Hernandez, 2012 and *Isospora tucuruensis* Lainson, Shaw 1989. Keeler *et al.* (2012) described *I. zorzali* with nipple-like SB and no SSB and SRB, while *I. massardi* has SB knob-like to rounded and SSB and SRB present. Lainson and Shaw (1989) describe *I. tucuruensis* and *Isospora albicollis* Lainson et Shaw, 1989 from the same host-species *T. albicollis*: *Isospora albicollis* is easily differentiated by micropyle and larger oocysts; and *I. tucuruensis* has smaller sporocysts and, although the line drawing and photomicrographs of the original description does not confer in some features as SB and oocyst wall, it clearly appears the SBB small and wide and PG single and large, while *I. massardi* has SSB large and rounded and PG as two ellipsoidal granules (Table I).

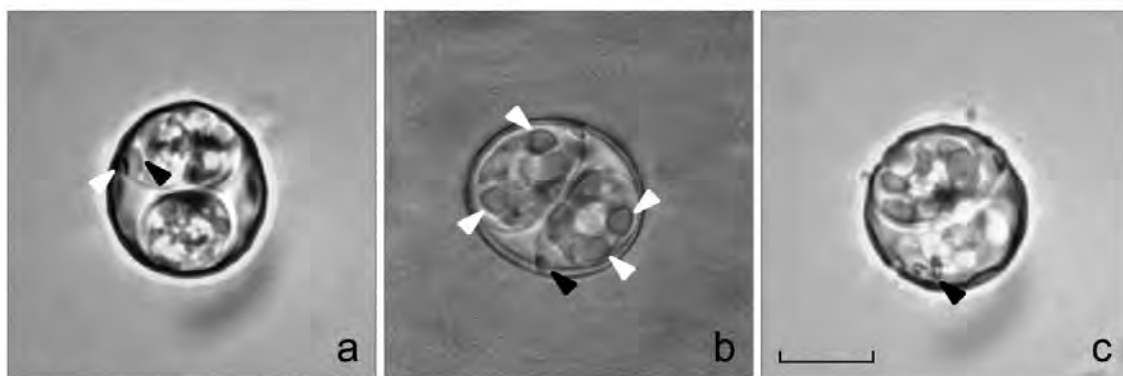


Fig. 2. Photographs of *Isospora massardi* (a-c), a new coccidian species recovered from the white-necked thrush *Turdus albicollis*. **a.** Stieda body knob-like (white arrowhead) and substieda body rounded (black arrowhead). **b.** Stieda body rounded (black arrowhead) and refractile bodies (white arrowhead). **c.** Two ellipsoidal polar granules. Scale-bar = 10 µm

Table 1. Comparative morphology of *Isospora* spp. recorded from New World turcid birds

Coccidia	Hosts	References	Oocysts					Sporocysts					
			Shape	Measurements (µm)	Shape index	Wall	Microspyle	Polar granule	Shape	Measurements (µm)	Stieda body	Substieda body	Residium
<i>Isospora</i> <i>placornis</i> Levine, Van Riper, Van Riper, 1980	<i>Myadestes</i> <i>obscurus</i> Gmelin, 1789	Levine <i>et al.</i> (1980)	ellipsoidal	(25-28 × 18-20)	-	one-layered, c.0.8	absent	present	ovoid	(15-18 × 10-11)	present	present	compact
<i>I. robini</i> McQuiston, Holmes, 1988	<i>Turdus</i> <i>migratorius</i> Linnaeus, 1766	McQuiston and Holmes (1988)	ellipsoidal or ovoid	23 × 20 (20-28 × 16-22)	1.1	one-layered, c.1.0	absent	present	ovoid	13.8 × 9.0 (10-17 × 7-12)	nipple-like	present prominent	compact
<i>I. tacuriensis</i> Lainson, Shaw, 1989	<i>Turdus</i> <i>albicollis</i> Vieillot, 1818	Lainson and Shaw (1989)	sub-spherical	17.3 × 17.1 (15-19 × 14-19)	-	one-layered, c.0.8	absent	present, sin- gle, ~ 3 × 2	ellipsoidal	11.8 × 8.4 (10-13 × 7-10)	nipple-like	present, wide, ~ 0.5 × 1.5	diffuse or compact
<i>I. albicollis</i> Lainson, Shaw, 1989	<i>T. albicollis</i>	Lainson and Shaw (1989)	ovoid	24.5 × 20.3 (22-27 × 19-24)	-	one-layered, c.0.8	present	present, sin- gle, ~ 2.5 × 2	ellipsoidal	16.0 × 11.2 (12-15 × 8-10)	nipple-like to bubble- shaped	present, wide, ~ 1.0 × 4	diffuse or compact
<i>I. zorzali</i> Keeler, Yabsley, Gibbs, McGraw, Hernandez, 2012	<i>Cathartes</i> <i>aurantrostris</i> Hartlaub, 1850; <i>Turdus</i> <i>grayi</i> Bonapart, 1838; <i>Turdus assimi-</i> <i>lis</i> Cabanis, 1850; <i>Turdus</i> <i>plebejus</i> Cabanis, 1861	Keeler <i>et al.</i> (2012)	round to slightly ovoid	19.7 × 18.6 (16-24 × 15-21)	1.1	bi-layered	absent	present, 1 to 2	ovoidal	14.5 × 8.5 (11-18 × 7-11)	nipple-like	absent	diffuse or compact
<i>I. massardi</i> sp. nov.	<i>T. albicollis</i>	current work	subspherical	18.6 × 17.7 (15-21 × 14-19)	1.05 (1.0-1.1)	bi-layered, ~ 0.9	absent	present, 2 ellipsoidal granules, ~ 1.5 × 0.5	ovoidal	14.8 × 9.3 (13-16 × 8-11)	knob-like to rounded, ~ 1 × 2	present, rounded, ~ 1.5 × 3.5	diffuse

Discussion

Few coccidia have been reported in birds of the family Turdidae worldwide; however, those coccidia described in the New World assume greater importance due to the higher probability of transmission between sympatric passerines (Berto and Lopes 2013).

Turdus albicollis has an extremely large range, having populations in various Brazilian biomes, as Atlantic Forest, Pantanal and Amazon, plus a trans-Andean population. Besides *T. albicollis*, 38 *Turdus* spp. are distributed in the Americas and they can potentially disperse this coccidium between thrushes across South, Central and North America. The transmission and consequent dispersion becomes more evident when considering the legal and illegal trade (biopiracy), seizures and releases from rehabilitation centers, because the thrushes in general, including *T. albicollis*, has great interest as pet due to its vocal repertoire (Lopes *et al.* 2013, IUCN 2013).

The coccidium of this current study were compared in detail with coccidian parasites of New World passerine birds that are feature-similar and belong to the same host family (Duszynski and Wilber 1997, Berto *et al.* 2011). Based on Table I, it can be concluded that *I. massardi* is differentiated using the morphology and morphometry of the oocysts from *Isospora* species from New World passerines of same family. Therefore, *I. massardi* is considered as new to science, being the sixth description in the Turdidae.

Acknowledgements. This study was supported by grants from the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) to B.P. Berto (E-26/110.987/2013). We also thank the Brazilian Navy, in special to the command of CADIM (Centro de Adestramento da Ilha da Marambaia) that allowed us to access the Marambaia Island, located in Rio de Janeiro State, Brazil, and use some of the facilities of CADIM during the field work.

Received: August 22, 2013

Revised: March 5, 2014

Accepted for publication: March 11, 2014

References

- Berto B.P., Flausino W., McIntosh D., Teixeira-Filho W.L., Lopes C.W.G. 2011. Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). *Systematic Parasitology*, 80, 159–204. DOI: 10.1007/s11230-011-9317-8.
- Berto B.P., Lopes C.W.G. 2013. Distribution and Dispersion of Coccidia in Wild Passerines of the Americas. In: (Eds. L. Ruiz and L. Iglesias) *Birds: Evolution and Behavior, Breeding Strategies, Migration and Spread of Disease*. Nova Science Publishers, New York, USA, 47–66.
- CBRO. 2011. Lista das aves do Brasil. Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos, Rio de Janeiro, 37 pp.
- Duszynski D., Wilber P. 1997. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *Journal of Parasitology*, 83, 333–336. DOI: 10.2307/3284470.
- IUCN 2013. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. Available from: <http://www.iucnredlist.org> (accessed 6 August 2013).
- Keeler S.P., Yabsley M.J., Gibbs S.E., McGraw S.N., Hernandez S.M. 2012. A new *Isospora* species of passerines in the family Turdidae from Costa Rica. *Journal of Parasitology*, 98, 167–169. DOI: 10.1645/GE-2721.1.
- Lainson R., Shaw J.J. 1989. Two new species of *Eimeria* and three new species of *Isospora* (Apicomplexa, Eimeriidae) from Brazilian mammals and birds. *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle*, 11, 349–365.
- Levine N.D., Van Riper S., Van Riper C. 1980. Five new species of *Isospora* from Hawaiian Birds. *Journal of Protozoology*, 27, 258–259.
- Lopes B.B., Balthazar L.M.C., Coelho C.D., Berto B.P., Neves D.M., Lopes C.W.G. 2013. Trafficking in wild passerines, reintroduction and coccidial transmission: *Isospora trincaferri* Berto, Balthazar, Flausino, Lopes, 2008 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the buff-throated saltator *Saltator maximus* Müller (Passeriformes: Cardinalidae). *Coccidia*, 1, 5–8.
- McQuiston T.E., Holmes B.B. 1988. *Isospora robini* sp. n., a new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from the American robin (*Turdus migratorius*). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 55, 324–325.
- Sick H. 1997. *Ornitologia Brasileira*. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, Brazil, 862 pp.