

Rafael Romero Nicolino

**PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- *Neospora caninum* E
AGLUTININAS ANTI-*LEPTOSPIRA* EM REBANHOS LEITEIROS NA
MICRORREGIÃO DE SETE LAGOAS – MINAS GERAIS, 2009/2010**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Epidemiologia

Orientador: Prof. João Paulo Amaral Haddad

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2011

N644p Nicolino, Rafael Romero, 1984-

Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e aglutininas anti-Leptospira em rebanhos leiteiro na microrregião de Sete Lagoas-Minas Gerais, 2009/2010 / Rafael Romero Nicolino. – 2011.
35 p. : il.

Orientador: João Paulo Amaral Haddad
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Bovino de leite – Doenças – Teses. 2. Leptospirose em animais - Teses. 3. Doenças parasitárias em animais – Teses. 4. Epidemiologia – Teses. I. Haddad, João Paulo Amaral. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.214 089 69

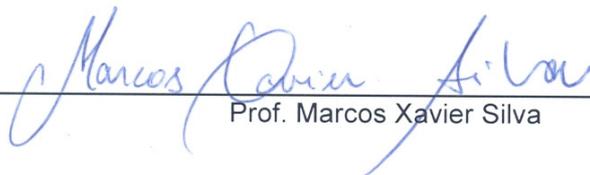
Dissertação defendida e aprovada em 07 de fevereiro de 2011, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. João Paulo Amaral Haddad
Orientador



Dr. Luciano Bastos Lopes



Prof. Marcos Xavier Silva

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha esposa, Natali, por todo o carinho e entusiasmo nesta vinda do Rio de Janeiro para Belo Horizonte. Meus pais por sempre me apoiarem em cada etapa de minha vida, assim como meus irmãos.

A todos os amigos que fiz durante este um ano e meio de mestrado, que me ajudaram a conquistar mais esta etapa.

Em especial ao Professor João Paulo, por estender a mão a um aluno desconhecido por ele durante a seleção do mestrado. Toda essa confiança foi retribuída com muita vontade de trabalho durante este quase 1 ano de coletas na cidade de Sete Lagoas. Esta dissertação é a amostra de toda confiança depositada em mim. Mais que um orientador, hoje tenho um amigo a quem posso recorrer.

Em especial a DEUS, por ter me oferecido todas essas oportunidades.

SUMÁRIO

	RESUMO	8
	ABSTRACT	8
1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1	Leptospirose.....	10
2.2	A Leptospirose no Brasil	11
2.3	Neosporose.....	13
2.4	A Neosporose no Brasil	14
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1	Área de estudo e definição de amostra	17
3.2	Coletas das amostras, aplicação do questionário e marcação geográfica	18
3.3	Diagnóstico Sorológico	19
3.3.1	Leptospirose.....	19
3.3.2	Neosporose.....	19
3.4	Análise estatística	19
4	Resultados e discussão	20
4.1	Microrregião de Sete Lagoas.....	20
4.2	Prevalência animal de aglutininas anti- <i>Leptospira</i>	21
4.3	Prevalência em nível de rebanho para aglutininas anti- <i>Leptospira</i>	24
4.4	Prevalência animal para anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i>	26
4.5	Prevalência de rebanho para anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i>	27
4.6	Resumo dos resultados encontrados	30
5	CONCLUSÕES.....	31
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	31

Lista de Tabelas

Tabela 1	Municípios da Microrregião de Sete Lagoas, utilizados no estudo, com número de rebanhos leiteiros, vacas ordenhadas, produção de leite e produtividade – IBGE 2006.....	17
Tabela 2	Sorovarietades utilizadas no exame de SAM	19
Tabela 3	Prevalência de sorovarietades nas amostras positivas para aglutininas anti-leptospirose em rebanho leiteiro da microrregião de Sete Lagoas – MG, 2010.	23
Tabela 4	Distribuição da titulação das amostras positivas para o exame de SAM para aglutininas anti- <i>Leptospira</i>	24
Tabela 5	Ajuste de número de animais positivos por fazenda, para que esta seja considerada como fazenda positiva para anticorpos anti- <i>N. caninum</i> em rebanhos leiteiros da microrregião de Sete Lagoas, MG – 2010	28
Tabela 6	Resumo das prevalências encontradas para aglutininas anti- <i>Leptospira</i> e para anticorpos anti - <i>N. caninum</i> e bovinos leiteiros na microrregião de Sete Lagoas – MG, 2010	31

Lista de Quadros		
Quadro 1	Resumo de algumas frequências para infecção por <i>Neospora caninum</i> no Brasil	29
Lista de Figuras		
Figura 1	Microrregião de Sete Lagoas e seus municípios.....	18
Figura 2	Municípios participantes do estudo na microrregião de Sete Lagoas, Minas Gerais.....	20
Figura 3	Posição geográfica de cada propriedade coletada.....	21
Figura 4	Prevalência animal de aglutininas anti- <i>Leptospira</i> , em soros bovinos, na microrregião de Sete Lagoas, MG – 2010	22
Figura 5	Prevalência das sorovariedades testadas nos soros bovinos na microrregião de Sete Lagoas, MG- 2010.....	23
Figura 6	Prevalência de rebanho para aglutininas anti- <i>Leptospira</i> em soros bovinos na microrregião de Sete Lagoas.....	25
Figura 7	Posição geográfica das fazendas positivas e negativas para aglutininas anti- <i>Leptospira</i> na microrregião de Sete Lagoas – MG, 2010.....	26
Figura 8	Prevalência de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> em soros de bovinos leiteiros na microrregião de Sete Lagoas, MG, 2009-2010	27
Figura 9	Percentual de número de animais positivos para anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> por propriedade	28
Figura 10	Prevalência de rebanho para anticorpos anti- <i>N. caninum</i> com 3 diferentes pontos de cortes.....	29
Figura 11	Posição geográfica das fazendas negativas para anticorpos anti- <i>N. caninum</i> apontadas no cluster.....	30

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo avaliar a prevalência de aglutininas anti-*Leptospira* e de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas lactantes, situadas em propriedades da microrregião de Sete Lagoas, Minas Gerais no ano de 2010. De dezembro de 2009 a julho de 2010, foram coletadas 2.915 amostras de soros provenientes de 151 propriedades leiteiras localizadas nos municípios de Araçai, Caetanópolis, Cachoeira da Prata, Cordisburgo, Fortuna de Minas, Funilândia, Inhaúma, Jequitibá, Prudente de Moraes, Paraopeba e Sete Lagoas. A técnica de soroaglutinação microscópica foi utilizada para o exame de Leptospirose e um Kit ELISA comercial para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum*. Todos os exames foram realizados no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Foi encontrada uma prevalência de 20,7% (IC95% = 17,1 – 24,3%) nos animais e de 80,8% (IC 95% = 73,8 – 87,7%) em rebanho para aglutininas anti-*Leptospira*. As sorovarietades mais prevalentes foram *hardjo* amostra Hardjoprajitino, 19,4%, *lagoa*, 19,3%, *bolívia* 18,8% e *hardjobovis* 17,4%. As prevalências de anticorpos anti-*Neospora caninum*, foram 21,9% (IC 95% = 18,9 – 24,9%) em nível animal e de 98,5% (IC 95% = 97,0 – 99,9%) em nível de rebanho. As aglutininas anti-*Leptospira* e anticorpos anti-*N. caninum* estão amplamente distribuídos nas propriedades da microrregião de Sete Lagoas, Minas Gerais.

Palavras-chave: Bovino leiteiro, *Leptospira*, *Neospora caninum*, prevalência, Sete Lagoas.

ABSTRACT

This study had as objective to evaluate the prevalence of anti-*Leptospira* agglutinins and anti-*Neospora caninum* antibodies in dairy cows, located in properties in the microregion of Sete Lagoas, Minas Gerais, in the year 2010. From December 2009 to July 2010, we collected 2915 serum samples from 151 dairy farms in the municipalities of Araçai, Caetanópolis, Cachoeira da Prata, Cordisburgo, Fortuna de Minas, Funilândia, Inhaúma, Jequitibá, Prudente de Moraes, Paraopeba and Sete Lagoas. The technique used was the microscopic agglutination test for leptospirosis and a commercial ELISA kit for anti-*Neospora caninum* antibodies detection. All examines were performed at the Department of Preventive Veterinary Medicine, linked to the School of Veterinary Medicine, at the Federal University of Minas Gerais. As a result, 20.7% (CI 95% = 17.1 – 24.3%) at single animal level and 80.8% (CI 95% = 73.8 – 87.7%) in herd level were positive to anti-*Leptospira* agglutinins. The serum varieties most prevalent were *hardjo* Hardjoprajitino, 19.4%, *lagoa*, 19.3%, *bolivia*, 18.8% and *hardjobovis* 17.4%. The prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies were 21.9% (CI 95% = 18.9 – 24.9%) at single animal level and 98.5% (IC 95% = 97.0 – 99.9%) at herd level. The agglutinins anti-*Leptospira* antibodies and anti-*N. caninum* are widely distributed in the properties of the microregion of Sete Lagoas, Minas Gerais.

Keywords: Dairy cow, *Leptospira*, *Neospora caninum*, prevalence, Sete Lagoas.

1 - INTRODUÇÃO

A eficiência reprodutiva é uma das principais contribuições para a viabilidade econômica da cadeia produtiva leiteira (Wolf, 2003). Fatores que afetam a reprodução têm um impacto importante para que propriedades tenham condições de produzir animais saudáveis, utilizando-os, como fonte de renda ou de reposição de animais descartados. A baixa eficiência reprodutiva pode ocorrer por diversas causas, desde simples erros de manejo nutricional ou reprodutivo, até problemas sanitários mais graves.

Um estudo de prevalência é uma estratégia de estudo epidemiológico que se caracteriza pela observação direta de determinada quantidade de indivíduos em uma única oportunidade. A prevalência de anticorpos específicos pode ser muito importante para avaliar a necessidade de promover campanhas ou outras estratégias de imunização em populações.

A importância da pecuária de leite no desempenho econômico e na geração de empregos no país é incontestável. Pode-se citar o aumento da produção brasileira desde 1990 a 2009. Em 1990, o Brasil produziu 14,9 bilhões de litros de leite. Em 1998, produziu 18,7 bilhões de litros de leite e importou 384 mil toneladas de produtos lácteos para atender a toda sua demanda interna. Já em 2004, o país produziu 23,5 bilhões de litros e exportou 22 mil toneladas de produtos lácteos. A produção total de leite no Brasil em 2009 foi de 29.112 bilhões de litros de leite, com mais de 21.900 milhões de animais ordenhados. O valor real bruto da produção de leite em 2005 foi de R\$ 3,8 bilhões, segundo o IBGE. As exportações de lácteos em Minas Gerais também vêm crescendo. Em 2006 houve US\$ 66,4 milhões em exportação, com incremento de 74% em relação ao ano anterior (Anuário Pecuária Leiteira, 2007). O estado de Minas Gerais se destaca como o maior estado produtor de leite do Brasil, com uma produção superior a sete bilhões de litros, representando 26% da produção

brasileira. A microrregião de Sete Lagoas, composta por 20 municípios, é responsável pela produção de mais de 73 milhões de litros de leite e mais de 36 mil vacas ordenhadas, com uma produtividade superior a 2.240 litros de leite por vaca ano, situando-se entre uma das maiores produtividades encontradas no Brasil (Anuário Pecuária Leiteira, 2006).

Del Fava *et al.* (2007) assinalam que as causas infecciosas representam 30% das mortes embrionárias em rebanhos bovinos, destacando-se o papel de doenças virais, como rinotraqueíte bovina (IBR) e diarreia viral bovina (BVD), bacterianas (leptospirose, brucelose, listeriose, campilobacteriose, tricomonose, estafilococose, colibacilose, dentre outras) além da neosporose como protozoose. Em regiões endêmicas, é difícil demonstrar o impacto das infecções nos índices reprodutivos dos rebanhos, pois existe um equilíbrio biológico entre hospedeiro e agente infeccioso, sendo que este equilíbrio pode ser quebrado por diversos outros fatores, ambientais e zootécnicos.

O sucesso no combate às doenças dos animais está estreitamente associado a diferentes fatores, entre os quais se destacam o conhecimento da epidemiologia do agente etiológico, sua distribuição espacial e temporal e sua frequência de ocorrência. A estratégia para tal ação depende do instrumental que se dispõe para a identificação dos indivíduos ou dos rebanhos doentes. No caso de doenças como a leptospirose e a neosporose, a descoberta das fontes de infecção e, conseqüentemente, dos rebanhos doentes resulta numa operação dispendiosa e difícil.

Em todo o Mundo, a *Leptospira* spp. e a *Neospora caninum* são dois agentes associadas com perdas reprodutivas (Moreira *et al.*, 1979; Anderson *et al.*, 2000; Haddad *et al.*, 2005; Grooms, 2006; Dubey *et al.*, 2007) e, devido a algumas similaridades como a importância destas duas enfermidades na baixa eficiência reprodutiva, a alta disseminação e causa de

substantivas perdas econômicas, foi realizado um estudo epidemiológico das duas doenças, concomitantemente, em rebanhos leiteiros em uma microrregião de Minas Gerais.

Este trabalho tem como objetivo, avaliar a prevalência de aglutininas anti-*Leptospira* e de anticorpos anti-*Neospora caninum* em fêmeas lactantes provenientes de rebanhos leiteiros da microrregião de Sete Lagoas, Minas Gerais – 2010.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Leptospirose

A saúde animal é entendida como um conjunto de condições que determinam as características produtivas dos rebanhos inseridos em seu contexto histórico e geográfico. Vários são os problemas de sanidade que interferem na produção e na produtividade da pecuária brasileira, destacando-se o complexo da infecção por *Leptospiras* (Moreira, 1994).

A leptospirose é uma zoonose bacteriana de grande importância econômica para a pecuária leiteira, causando em bovinos abortamentos, natimortalidade, infertilidade e queda da produção leiteira. A doença ocorre em todo o mundo e é causada pela infecção de espiroquetas do gênero *Leptospira* sp.. As leptospirosas patogênicas eram anteriormente classificadas como membros da espécie *Leptospira interrogans*, o gênero foi recentemente reorganizado e as leptospirosas são identificadas em 22 genomoespécies com cerca de mais de 200 sorovariedades de leptospirosas identificadas em todo o mundo com base em antígenos de superfície e testes genômicos destes microrganismos (Levett, 2001; Bolin, 2003).

Sua ocorrência está estreitamente vinculada aos fatores ambientais, sendo particularmente prevalentes em países de clima tropical e subtropical, se agravando em períodos de altos índices pluviométricos, entre novembro e março no Brasil, devido à grande capacidade de sobrevivência das leptospirosas em ambientes úmidos.

Temperatura, pH do solo, presença de animais silvestres, terrenos alagadiços e condição dos animais são outros fatores determinantes no aparecimento da enfermidade (Faine *et al.*, 2000).

Em bovinos a sorovariedade mais comumente relatada como causadora de infecção, em grande parte do mundo, é a *Hardjo*. Dois tipos sorologicamente indistinguíveis, mas geneticamente distintos da sorovariedade *Hardjo* foram identificados: *Leptospira interrogans* sorovar *Hardjo* amostra Hardjoprajitno e *L. borgpetersenii* sorovar *Hardjo* amostra hardjo-bovis (Faine *et al.*, 2000; Bolin, 2003).

A persistência do agente na natureza e o elevado potencial de infecção são assegurados pela diversidade de identidades sorológicas, pela multiplicidade de espécies hospedeiras e pelo relativo grau de sobrevivência das *Leptospiras* patogênicas no ambiente. (Faine *et al.*, 2000)

A transmissão da Leptospirose se dá por contato direto com a urina, sangue ou tecidos de animais infectados e de modo indireto pela água e/ou alimentos contaminados. Animais em lactação podem eliminar *Leptospiras* no leite na fase aguda da doença. As vias de penetração no homem e animais são a pele lesada, mucosas oral, nasal, ocular e genital (Manual de controle da Leptospirose, 1989).

A infecção por *Leptospira* sp. pode se apresentar de forma aguda, subaguda ou assintomática. O quadro agudo manifesta-se com febre que dura de quatro a cinco dias, anorexia, conjuntivite, e diarreia. A leptospirose desaparece com a formação de anticorpos, e as leptospirosas desaparecem completamente da circulação sanguínea devido à imunidade humoral. As leptospirosas remanescentes se abrigam nos túbulos renais, iniciando assim a fase crônica da infecção. Pela leptospirose grandes quantidades do agente são eliminadas no ambiente, especialmente nos primeiros meses da infecção, sendo a tendência a diminuir ou cessar

completamente. A leptospirose causada pelo sorovar Hardjo é mais prolongada que as causadas por outras sorovariedades. A infecção pela sorovariedade Hardjo, sorogrupo *Serjoe*, é caracterizada por duas síndromes, a primeira delas é a “síndrome da queda do leite”, e a outra é caracterizada por abortamentos ou nascimento de bezerros fracos que morrem logo após o nascimento. A sorovariedade *Hardjo* também foi encontrada em trato genital (útero e tubas uterinas) de fêmeas vazias e prenhes. A presença do agente no trato genito urinário sugere a possibilidade de transmissão horizontal sexual da infecção (Faine *et al.*, 2000; Levett *et al.*, 2001).

Nos animais de produção, a leptospirose está principalmente relacionada aos problemas reprodutivos, com queda da produtividade dos rebanhos acometidos, nascimento de animais debilitados, natimortos, além de custos com despesa de assistência veterinária, vacinas e testes diagnósticos (Vasconcellos *et al.*, 1997; Faine *et al.*, 2000; Salles e Lilenbaum, 2006)

A proteção específica dos animais susceptíveis é obtida com o uso de vacinas inativadas que contenham as sorovariedades de *Leptospiras* presentes na região, tendo em vista que a imunidade é tipicamente humoral e diretamente relacionada a sorovariedade (Salles e Lilenbaum, 2006). Devido ao tempo e às despesas envolvidas, a vacinação obviamente é o método de controle de escolha (Manual de Leptospiroses, 1995). Moreira (1979) relatou que a vacinação de vacas gestantes assegura a transferência de imunidade colostrar para as crias que, por sua vez, estarão imunes até os três meses de idade. Faine (1982) sugeriu que a imunização deveria ser feita durante os dois últimos terços da gestação e aconselhou a vacinação um mês antes da parição, principalmente em áreas onde a infecção é endêmica. Novilhas de mães vacinadas tardiamente ganham imunidade por alguns meses, porém devem ser imunizadas com três a cinco meses de idade, visando assegurar maior proteção contra a doença (Faine *et al.*, 2000).

2.2 – A Leptospirose no Brasil

No Brasil, o primeiro isolamento de *Leptospiras* em bovinos foi efetuado por Freitas *et al.* (1957), sendo classificado como a sorovariedade *pomona*. Em 1961, Santa Rosa *et al.*, isolaram uma estirpe do sorovar *Icterohaemorrhagiae*. Moreira (1994), investigando um surto de Leptospirose em bovinos leiteiros no estado de Minas Gerais, isolou duas estirpes de *Leptospiras* cuja identificação final foi para os sorovares *Hardjo* (*Hardjoprajitno*) e *Mini*.

Alguns trabalhos produzidos no Brasil, estudaram vários estados, como o trabalho de Vasconcellos *et al.* (1997) que examinaram 2449 soros bovinos, de aptidão leiteira e de corte, provenientes de 56 propriedades, distribuídas em seis estados brasileiros: Paraná, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul. Foram reagentes 1480 (60,4%) animais para pelo menos uma das 24 sorovariedades testadas de *Leptospiras*. As sorovariedades predominantes foram: *hardjo* (76,7%) e *wolffi* (5,3%).

Outro trabalho que abrangeu vários estados brasileiros foi o de Favero *et al.* (2001) que avaliaram no período de 1984 á 1997, 31.325 soros de bovinos provenientes de 1.920 propriedades distribuídas em 540 municípios de 21 estados do Brasil. Os resultados encontrados no estado de Minas Gerais foram: 98% dos municípios positivos, 87,3% de propriedades positivas e 41,3% (1.855/4.487) de animais reagentes, sendo a sorovariedade *hardjo* a mais prevalente.

Já na região sudeste do Brasil, vários trabalhos demonstraram a presença da infecção da Leptospirose em rebanhos leiteiros, entre os quais podemos destacar:

Moreira *et al.* (1979) examinaram 3.727 bovinos do estado de Minas Gerais em experimento delineado com amostragem aleatória e planejada para determinação da prevalência de aglutininas anti-*Leptospira* e, observaram 27,3% de animais positivos e 80% das propriedades positivas, 12,10% de animais foram positivos para a variante *wolffi*; 11,1% para a variante *hardjo*; 5,8%

para a variante *grippotyphosa*; 5,1% para a variante *icterohaemorrhagiae* e 2,2% para a variante *canicola*.

Araújo *et al.* (2005) analisaram, através do teste de microaglutinação rápida, 39.012 soros sanguíneos de bovinos provenientes de 398 (47%) municípios de Minas Gerais entre os anos de 1980 a 2002. As sorovariedades mais frequentes foram: *hardjo* (Norma), 23,7%, *hardjo* (OMS), 19,7%, *hardjo* (*Hardjobovis*), 13,8% e *wolffi*, 13,2%. Os resultados demonstraram a relevância da sorovariedade *hardjo* como problema prioritário na Leptospirose em bovinos em Minas Gerais.

Langoni *et al.* (2000) avaliaram 2761 amostras de soros sanguíneos de bovinos com aptidão para corte e para leite, com idades entre seis meses e 10 anos, oriundos de sete municípios do estado de São Paulo. As maiores freqüências encontradas foram 32,1% para *wolffi*, 30,7% para *hardjo*, 12,7% para *pyrogenes* e 11,81% para *canicola*. A prevalência animal para aglutininas anti-*Leptospira* foi de 45,6% (1258/2761).

Castro *et al.* (2008) determinaram a soroprevalência da Leptospirose bovina em fêmeas de idade reprodutiva no estado de São Paulo. Foram coletados soros de fêmeas com idade superior a 24 meses, chegando a um total de 8.216 amostras provenientes de 1.021 propriedades distribuídas por todo o estado. De acordo com os resultados, a soroprevalência foi de 49,4% entre os animais e 71,3% nas propriedades. O sorovar *hardjo* (46%) e sua associação com o sorovar *wolffi* (21%) foram os mais prevalentes entre o total de animais reagentes, seguidos pelos sorovares *shermani* (8,9%), *autumnalis* (4,4%) e *grippotyphosa* (3,9%).

Lilenbaum e Souza (2003) realizaram no estado do Rio de Janeiro, trabalho com 379 soros bovinos, provenientes de 13 rebanhos leiteiros de diferentes partes do estado, encontrando reação de aglutinação em 46,9% dos animais, sendo novamente a sorovariedade *hardjo* a sorovariedade mais comumente relatada.

Na região nordeste do Brasil, podemos destacar os seguintes trabalhos:

Tenório *et al.* (2005) no estado de Pernambuco, realizaram pesquisa em 16 rebanhos leiteiros do estado, a fim de conhecer a soroprevalência de Brucelose e Leptospirose. Foram detectados 57,7% de amostras positivas para o teste de SAM (Soro Aglutinação Microscópica) entre os animais e todos os rebanhos possuíam ao menos um animal positivo para Leptospirose. A sorovariedade *hardjo* esteve presente em 18,1% das amostras.

Em um trabalho de 2007, realizado na microrregião da Parnaíba Piauí, foram analisados os soros de 1.975 animais provenientes de 16 rebanhos de aptidão leiteira, encontrando uma prevalência de 52,9%, sendo que todos os rebanhos possuíam pelo menos um animal infectado. As sorovariedades mais relatadas foram *hardjo* e *wolffi* (Mineiro *et al.*, 2007).

Lage *et al.* (2007) conduziram trabalho para a identificação da prevalência de Leptospirose bovina no estado da Paraíba. O estado foi dividido em três ecorregiões, sendo coletadas amostras de seis municípios de cada ecorregião. As amostras foram coletadas aleatoriamente, chegando a um total de 2.343 soros bovinos com prevalência animal de 32%, sendo as sorovariedades *hardjo* e *hardjobovis* as mais prevalentes.

Em um estudo realizado no estado da Bahia, no ano de 2010, com 10.823 soros de fêmeas bovinas com idade igual ou superior a 24 meses, provenientes de 1.414 propriedades, sorteadas dentro do estado, chegou a prevalência animal de 45,2% e de rebanho de 77,9%. As sorovariedades mais predominantes na região foi a *hardjo*, seguida da *wolffi* (Oliveira *et al.*, 2010).

Viana *et al.* (2010) realizaram trabalho na Bacia leiteira do Caparaó, estado da Bahia. Foram escolhidas 55 propriedades de forma aleatória, entre março de 2007 e março de 2008. A partir do cálculo de amostragem, foram coletadas 330 amostras de soros bovinos, analisadas através da técnica de

Soro aglutinação Microscópica (SAM). Foi encontrada reação em 12,4% dos animais. Os exames foram realizados no Laboratório de Leptospirose da UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais). As sorovariedades *hardjobovis*, *bolívia*, *lagoa*, *hardjo* Norma e *hardjo* OMS foram as mais soroprevalentes, respectivamente.

Dos trabalhos que abrangem a região Norte e Nordeste, podemos destacar:

Aguiar *et al.* (2006) avaliaram em Rondônia no ano de 2001, a prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em 2.109 vacas provenientes de 86 rebanhos do município de Monte Negro, estado de Rondônia, Brasil. As amostras de soro sanguíneo foram avaliadas pelo Teste de Aglutinação Microscópica frente a 24 sorovares de *Leptospira*. Títulos iguais a 1/100 para um ou mais sorovares foram detectados em 1.114 vacas (52,8%) de 82 (95,3%) rebanhos. A prevalência ajustada para o município de Monte Negro foi de 53,9% (I.C.: 95% = 49-57%). Em rebanhos leiteiros, foi encontrada uma prevalência animal de 49,6%. As sorovariedades mais prevalentes foram *hardjo* (14,5%), *wolffi* (12,3%), *shermani* (10,8%), *patoc* (7,9%) e *hebdomadis* (6,1%).

Em um trabalho realizado no ano de 2010 no estado de Goiás utilizou-se 4.571 amostras de bovinos colhidas em 715 amostras de 231 dos 246 municípios. Foram detectadas 62,2% de amostras positivas para ao menos uma sorovariedade e uma prevalência em rebanhos de 96%. Os sorovares mais frequentes no trabalho foram *wolffi* (14,5%) e *hardjo* (12,7%), concluindo que a infecção por *Leptospira* spp. é endêmica no estado de Goiás (Marques, 2010).

2.3 – Neosporose

Desde o relato inicial em 1984, em cachorros na Noruega (Bjerkas *et al.*, 1984) e do isolamento e descrição de um novo gênero e espécie denominada *Neospora caninum* (Dubey *et al.*, 1988), a Neosporose tem emergido como uma das principais doenças em rebanhos bovinos em todo o

mundo (Dubey *et al.*, 2006; Haddad *et al.*, 2005).

O. N. caninum é um protozoário classificado como um coccídio Apicomplexa da classe Sporozoa, pertencente a família Sarcocystidae, com uma ampla gama de hospedeiros. (Dubey *et al.*, 1988; Dubey *et al.*, 2007). É uma doença que acomete principalmente cães e bovinos, porém ocasionalmente são relatados casos envolvendo caprinos, ovinos, cavalos, rinocerontes lhamas e alpacas (Dubey *et al.*, 2006). Sua ocorrência é relatada em todo o mundo (Wouda *et al.*, 1998; Gondin *et al.*, 1999; Anderson, 2000; Melo *et al.*, 2001; Haddad *et al.*, 2005; Minervino *et al.*, 2008).

O protozoário tem um ciclo de vida heteroxeno. Cães (*Canis familiaris*) e coiotes (*Canis latrans*) são os únicos hospedeiros definitivos reconhecidos (Mccallister *et al.*, 1998; Gondin *et al.*, 2004). Os bovinos, e uma grande variedade de animais, podem agir como hospedeiros intermediários. Existem três estágios infectantes do parasito: taquizoítos, brasoizoítos e esporozoítos. Taquizoítos e bradizoítos ocorrem em tecidos de hospedeiros, tanto intermediário quanto definitivo, infectados, enquanto que os esporozoítos estão presentes em oocistos que são excretados pelas fezes dos hospedeiros definitivos. O *N. Caninum* pode infectar vários tipos celulares, incluindo, neutrófilos, fibroblastos, neurônios, células endoteliais, miofibras esqueléticas e miocárdicas (Dubey *et al.*, 2006; Dubey *et al.*, 2007).

O hospedeiro definitivo pode adquirir a infecção pela ingestão de tecidos contendo os cistos. Esse hospedeiro irá excretar oocistos na forma não esporulada em suas fezes, quando então ocorre a esporulação, e cada oocisto irá conter dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos (Haddad *et al.*, 2005; Dubey *et al.*, 2006)

A Neosporose é transmitida para bovinos pelas vias horizontal e vertical e estas desempenham um papel importante na infecção e são vitais para a sobrevivência do parasita. A transmissão vertical é

responsável pela disseminação da infecção de uma forma persistente, ocorrendo durante a prenhez com uma transmissão transplacentária, sendo responsável por até 95% das infecções. A transmissão horizontal ocorre pela ingestão de oocistos presentes na vida livre, geralmente através do pasto e leite contaminados. Transmissão pós-natal e transmissão congênita são termos alternativos usados na literatura para as vias de infecção horizontal e vertical, respectivamente (Dubey *et al.*, 2006; Haddad *et al.*, 2005).

O abortamento é o único sintoma apresentado pelas vacas, cuja infecção esteja sendo expressa, o qual pode ser observado em qualquer época da gestação, porém com mais frequência entre o quarto e o sétimo mês. Os fetos podem morrer no útero, serem reabsorvidos, mumificados, autolisados, ocorrer nascimento de natimortos ou nascerem animais clinicamente saudáveis, porém cronicamente infectados. Este quadro leva as fêmeas a permanecer infectadas por toda a vida e podendo transmitir a infecção para sua progênie em várias gestações consecutivas ou intermitentemente, fazendo com que a infecção por *N. caninum* se espalhe pelo rebanho em um grande número de animais (Dubey e Lindsay, 1996).

Ainda segundo Dubey e Lindsay (1996), os bezerros infectados podem ter sinais neurológicos, baixo peso ao nascer e serem incapazes de se levantar. Em alguns casos, os animais podem nascer sem nenhum sinal clínico aparente sugestivo de Neosporose.

Mas, para o diagnóstico, vários fatores devem ser levados em conta: faixa gestacional compatível, condição de autólise do feto, presença de lesões inflamatórias disseminadas, parasitas detectados na técnica de imunohistoquímica no feto, evidência sorológica da infecção e a ausência de outras possíveis causas de aborto, pois a presença de *Neospora* pode ser incidental (Anderson, 2000).

No diagnóstico sorológico são utilizadas as técnicas de Imunofluorescência indireta

(RIFI), ELISA e teste de aglutinação direta. Geralmente são utilizados isolados cultivados “in vitro” para a preparação dos antígenos. O sorodiagnóstico serve para a avaliação da exposição e do risco de infecção do rebanho, e não para determinar se uma vaca abortou por neosporose. Pode ser utilizado, por exemplo, para comparação entre os títulos de vacas com histórico de aborto com os das que não abortaram, para determinar se existe associação significativa entre os títulos anti-*Neospora caninum* e o aborto. O ponto de corte utilizado na RIFI para o soro de bovinos adultos varia entre os autores, sendo que títulos entre 1:200 e 1:640 são indicativos de infecção por *Neospora caninum*. Em soros fetais, a titulação de 1:25 é considerada específica no diagnóstico de neosporose. Portanto, a presença de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos não confirma o diagnóstico de neosporose, mas pode auxiliar no esclarecimento da causa de abortos em animais sorologicamente negativos para outras enfermidades abortivas como brucelose e leptospirose. (Dubey *et al.*, 2006; Dubey *et al.*, 2007)

Dubey *et al.* (2007) citam alguns fatores que aumentam o risco de Neosporose no rebanho, tais como, idade dos animais, presença de canídeos nas fazendas, tamanho e densidade do rebanho e, principalmente, práticas de biossegurança incorretas.

Medidas de controle para a Neosporose são feitas em duas condições. Em fazendas livres da doença, práticas rígidas de biossegurança devem ser tomadas, afim de não permitir a entrada de animais positivos no rebanho. Já em rebanhos positivos, programas de controle são baseados na diminuição da transmissão vertical, retirando do plantel animais soropositivos e, diminuição da transmissão horizontal, realizando um controle dos animais a procura de oocistos em fezes (Haddad *et al.*, 2005; Dubey *et al.*, 2007).

2.4 – Neosporose no Brasil

Os primeiros relatos de infecção por *N. caninum* no Brasil foram feitos em 1996, em

bovinos de corte e leite, com histórico de aborto. (Brautigam *et al.*, 1996; Gondin e Sartor, 1997; Pituco *et al.*, 1998).

Trabalho de 2003 realizou um grande estudo em seis estados brasileiros. Para determinar a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* 802 amostras coletadas de 1996 a 2000, foram selecionadas aleatoriamente de um banco de soros de fêmeas bovinas procedentes de rebanhos de corte e de leite de seis estados brasileiros: Mato Grosso do Sul (110), Minas Gerais (162), Paraná (90), Rio de Janeiro (150), Rio Grande do Sul (140) e São Paulo (150). A ocorrência de animais soropositivos nos seis estados foi de 23,6%, com aumento nos bovinos acima de 24 meses. Entretanto, parece não haver diferenças entre a idade média e a proporção de soros reagentes. Dentre os estados, o Rio de Janeiro apresentou a menor (14,7%) e Minas Gerais a maior (29,0%) porcentagem de soro reagentes (Ragozo *et al.*, 2003).

Na região sudeste do Brasil, vários trabalhos foram desenvolvidos a fim de se avaliar a infecção por *Neospora caninum* na região, entre os quais podemos destacar:

Pituco *et al.* (2001), no estado de Minas Gerais, realizaram estudo de frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em 107 bovinos provenientes de fazendas de aptidão leiteira e de corte. A técnica diagnóstica utilizada foi o ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) e a frequência a nível animal reportada foi de 45%. É importante observar que foram utilizados animais com histórico de problemas reprodutivos, como aborto.

Em estudo realizado no estado de Minas Gerais foram analisadas pela técnica de ELISA 584 amostras bovinas de fêmeas lactantes, provenientes de 18 rebanhos leiteiros em 14 diferentes municípios do estado. Foi encontrada uma prevalência de 18,6% dos animais, sendo que 27 das 28 propriedades possuíam ao menos um animal positivo no rebanho (Melo *et al.*, 2001).

Sartor *et al.* (2003) realizaram no município de Avaré, SP, estudo de detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em 521 soros bovinos de rebanhos leiteiros. Foram utilizadas duas técnicas diagnósticas, RIFI e ELISA. O resultado para o RIFI foi de 16%, já para ELISA encontrou-se 30% de animais reagentes. Os autores citam que o ELISA é mais específico e sensível do que o RIFI, além de ser de mais fácil realização.

Sartor *et al.* (2005), realizaram levantamento de anticorpos anti-*N. caninum* na região de Presidente Prudente-SP, testando soro de 408 bovinos de propriedades leiteiras da região. Foi relatada uma prevalência de 35% nos animais. Todas as fazendas testadas possuíam ao menos um animal doente.

Santos *et al.* (2009), conduziram estudo na região de Lavras-MG, coletando um total de 534 amostras de soros bovinos provenientes de 18 propriedades leiteiras da região. A prevalência animal encontrada foi 47% e todos os 18 rebanhos possuíam ao menos um animal positivo.

A região Sul do Brasil possui uma expressiva pecuária leiteira, e dentre os trabalhos que estudaram a prevalência de *N. caninum* na região, podemos destacar:

Em 2002, um estudo em rebanhos leiteiros do Rio Grande do Sul utilizou amostras de 223 animais, provenientes de cinco rebanhos leiteiros onde a Neosporose ainda não tinha sido diagnosticada. Foi encontrada uma prevalência de 11,2% dos animais através da técnica de RIFI (Imunofluorescência Indireta), sendo que em todas as cinco propriedades foram encontradas animais positivos (Corbellini *et al.*, 2002).

Guimarães *et al.* (2004) coletaram amostras de 623 fêmeas de bovinos, provenientes de 23 rebanhos leiteiros do estado do Paraná. Através de exames pela técnica de RIFI, foi encontrada uma prevalência de 14,3%, em nível animal, e 21 das 23 fazendas possuíam ao menos um animal positivo.

Corbelline *et al.* (2006), realizaram estudo no estado do Rio Grande do Sul para avaliar a prevalência de *Neospora caninum* e seus fatores de risco. Foram coletadas 1549 amostras provenientes de 60 rebanhos leiteiros. A prevalência encontrada foi de 17,8% entre os animais e de 93,3% nos rebanhos. A técnica diagnóstica utilizada foi a RIFI.

Dentre os trabalhos realizados nas regiões Norte, Nordeste, podem destacar:

Gondim *et al.* (1999) realizaram o primeiro estudo de soroprevalência no Brasil. O estudo foi realizado no estado da Bahia, e foram coletadas amostras de 447 animais provenientes de 14 rebanhos leiteiros. Por volta de 80% das amostras coletadas eram provenientes de vacas em lactação e selecionadas aleatoriamente dentro das fazendas. Como resultado, chegou-se a prevalência de 14,1% dos animais e, 13 das 14 propriedades possuíam ao menos um animal positivo no rebanho.

Aguiar *et al.* (2006), realizaram estudo de prevalência da Neosporose no estado do Amazonas. Foram coletadas 2.109 amostras provenientes de 86 rebanhos bovinos de corte e de leite. A técnica utilizada foi a RIFI, e a prevalência animal encontrada foi de 10,7% e de rebanho foi de 72%.

Trabalho de Teixeira *et al.* (2010), pesquisaram a frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros de bovinos leiteiros provenientes de sete municípios do estado do Maranhão. Foi utilizada a técnica de RIFI para diagnóstico de animais positivos. Foram coletadas 812 amostras de soros bovinos, chegando a uma frequência de 50,74% animais positivos.

A região Centro Oeste do Brasil possui uma expressiva pecuária bovina, e dentre os trabalhos que estudaram a *N. caninum* podemos citar:

Melo *et al.* (2006), estudaram a prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos provenientes de 21 fazendas das

microrregiões de Anápolis e Goiânia-GO, sendo 11 rebanhos leiteiros, nove de corte e um misto. Anticorpos anti-*Neospora caninum* foram detectados em 30% dos soros, e em todas as fazendas foram encontradas pelo menos um animal infectado.

Oshiro *et al.* (2007), realizaram trabalho para estimar a prevalência de Neosporose no estado de Mato Grosso do Sul. Foram analisados soros bovinos de fêmeas de idade superior a 24 meses através da técnica de RIFI. Um total de 2.488 amostras bovinas foi coletado em 205 rebanhos. A prevalência encontrada foi de 15% em nível animal e de 70% de rebanhos.

Minervino *et al.* (2008), em estudo para detecção de anticorpos contra *Neospora caninum*, no estado do Pará, coletaram soros provenientes de 160 animais de 16 fazendas de corte e de leite. Foi encontrada uma prevalência animal de 18,7% e em nível de rebanho de 80%

Benetti *et al.* (2009), realizaram trabalho no estado do Mato Grosso, sendo coletadas 932 amostras de soros bovinos provenientes de 24 propriedades. Foi relatada uma frequência de 53% de animais positivos e todas as 24 fazendas apresentaram ao menos um animal positivo.

Sartor *et al.* (1999), ao utilizarem técnicas diferentes nas mesmas amostras de soros, observaram em 521 fêmeas bovinas do estado de São Paulo, valores de 16,3% quando analisadas pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e de 30,1% pelo Ensaio Imuno Enzimático (ELISA). Também em amostras de soro bovino, Guimarães Júnior (2003) comparou a RIFI e o ELISA, encontrando valores de prevalência de 21,5% e 54,5% respectivamente, para bovinos leiteiros do estado do Paraná. Estes estudos demonstram a grande diferença entre as Sensibilidades e Especificidades encontradas nas técnicas de RIFI e ELISA.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Área de estudo e definição da amostra

Para a definição do tamanho amostral foram utilizadas 1.446 propriedades produtoras de leite presentes em onze municípios da Microrregião de Sete Lagoas (Minas Gerais) como universo amostral. O número de propriedades por município variou de 26 em Cachoeira da Prata a 287 em Cordisburgo (Tabela 1). Como prevalência esperada nos rebanhos, utilizamos o valor de 70%, já que

tratamos de duas enfermidades muito difundidas, não só no Brasil como em todo o mundo (Haddad *et al.*, 2005). O erro máximo esperado foi de 10%, ou seja, valores esperados para a prevalência foram de 77% a 63%. O nível de confiança definido para o estudo foi de 95%. Utilizando o módulo StatCalc do EpiInfo 6.04d (Dean *et al.*, 1994), foi calculado o número mínimo de rebanhos necessários para a estimativa de prevalência, sendo o número mínimo de 148 rebanhos, tendo sido amostrados, realmente, 151 propriedades.

Tabela 1 – Municípios da Microrregião de Sete Lagoas, utilizados no estudo, com número de rebanhos leiteiros, vacas ordenhadas, produção de leite e produtividade – IBGE 2006.

Municípios	Número de Rebanhos	Vacas ordenhadas	Leite (mil litros/ano)	Produtividade (litros/vaca)
Araçáí	48	928	1.119	1,206
Cachoeira da Prata	26	856	1.452	1,696
Caetanópolis	43	1.433	1.704	1,189
Cordisburgo	287	6.619	11.183	1,690
Fortuna de Minas	96	1.949	4.027	2,066
Funilândia	92	3.192	5.074	1,590
Inhaúma	79	4.840	14.384	2,972
Jequitibá	259	3.535	9.976	2,822
Paraopeba	198	7.938	11.629	1,465
Prudente de Moraes	38	1.370	2.929	2,138
Sete Lagoas	280	4.050	9.618	2,375
TOTAL	1.446	36,710	73,095	1,928

O número médio de vacas por propriedade foi de 25,4. O número de vacas que foram amostradas por propriedades foi definido por 20 animais. Algumas razões para este valor são:

- Utilizamos como forma de diagnóstico das duas doenças, dois testes considerados de referência, microaglutinação para Leptospirose e ELISA para Neosporose, ficando difícil a obtenção de um valor de sensibilidade e especificidade conjunta para estes testes (Haddad *et al.*, 2005).

- Como substituição, obtivemos a sensibilidade e especificidade de rebanho utilizando a sensibilidade e especificidade de 99%, considerando que não exista um teste diagnóstico perfeito. Os valores utilizados no programa Herdacc 3.0® (Herdacc, 1995) foram sensibilidade 0,99; especificidade 0,99; tamanho da população 25; prevalência animal esperada de 15%; e ponto de corte 1. Obtivemos uma sensibilidade de rebanho de 98,7% e especificidade de rebanho de 100% com uma amostragem de 20 animais, a partir da tabela gerada pelo programa Herdacc 3.0®.



Figura 1 – Microrregião de Sete Lagoas e seus municípios.

3.2 – Coletas das amostras, aplicação do questionário e marcação geográfica.

As 2.915 amostras de soro de vacas lactantes foram coletadas no período de Novembro de 2009 a Julho de 2010. A coleta venosa foi realizada através de tubos a vácuo para a retirada de, aproximadamente, 9mL de sangue das vacas. O material foi acondicionado e refrigerado em campo e, posteriormente, centrifugado no laboratório de Leptospirose da Escola de Veterinária da UFMG, e o soro transferido para um microtubo de 1,5ml identificado e congelado a -20°C para posterior análise.

Foi aplicado um questionário semiestruturado aos responsáveis por cada fazenda, através de entrevista pessoal. Foram abordadas questões de tocante econômico das propriedades, manejo de animais, dados zootécnicos individuais de cada animal e práticas de biossegurança.

A marcação da posição geográfica foi realizada através de um aparelho de Sistema de Posicionamento Global (GPS), e seu ponto foi armazenado dentro do próprio questionário da fazenda.

3.3 – Diagnóstico Sorológico

3.3.1 – Leptospirose

O método diagnóstico utilizado foi a Soro aglutinação Microscópica (SAM), exame recomendado pela Organização Mundial de Saúde (Magalhães, 2005), a partir da técnica descrita por Cole *et al.* (1973) modificado por Herrmann *et al.* (2004).

A técnica de SAM consiste em reagir 25 µl do soro do animal, este diluído na razão de 1:100, com igual volume de uma suspensão de antígenos, incubados em temperatura de 25 a 30°C por duas horas.

As leituras das reações foram feitas na microplaca de poliestireno, com microscópio

Axiolab®, dentro do Laboratório de Leptospirose, utilizando a técnica descrita por Galton (1962) citado por Magalhães (2005).

O soro foi considerado positivo quando ocorreram no mínimo 50% de aglutinação com título igual ou superior a 1:100. Todos os soros positivos foram diluídos até a diluição que ainda contivesse reação de aglutinação para se avaliar sua titulação.

Foram utilizadas oito sorovariedades de Leptospiras no trabalho, sendo estas as mais comumente encontradas na região (Moreira *et al.*, 1979; Araújo *et al.*, 2005). A Tabela 2 demonstra as sorovariedades utilizadas no trabalho e as amostras de referência.

Tabela 2 – Sorovariedades utilizadas no teste SAM.

Sorogrupo	Sorovariedade	Amostra de Referência
Serjoe	<i>hardjo</i>	Hardjoprajitino
	<i>hardjobovis</i>	Sponcelee
	<i>hardjo</i>	Hardjoprajitino Norma
	<i>wolffi</i>	3705
Pomona	<i>pomona</i>	Pomona
Grippotyphosa	<i>grippotyphosa</i>	Moska V
-	-	Bolívia
-	-	Lagoa

3.3.2 – Neosporose

Para o diagnóstico de *Neospora caninum*, foi utilizado um kit ELISA indireto comercial da marca Herdcheck®, (IDEXX Laboratories, Inc., EUA). Os testes foram realizados de acordo com as recomendações contidas no manual do fabricante. A leitura foi realizada em uma leitora automática em filtro de 650 nm. O resultado do teste é uma expressão numérica, denominada Razão S/P, baseada em um soro positivo, um soro negativo e o soro testado. Os resultados S/P maiores ou iguais a 0,5 são considerados amostras positivas; e os resultados S/P menores que 0,5 são considerados negativos. Este mesmo teste, ELISA, possui uma

sensibilidade relatada de 98% e especificidade de 92% (Wouda *et al.*, 1998).

3.4 – Análise estatística

As prevalências em nível de rebanho e em nível dos animais foram estimadas para ambas as doenças, utilizando formas de definir o peso específico de cada unidade amostral (Dargatz e Hill, 1996; Dohoo *et al.*, 2003), através do pacote estatístico STATA® versão 11 para geração destas prevalências.

A análise espacial foi verificada utilizando o programa SaTSacan® (<http://www.satscan.org>) com objetivo de identificação de “clusters” de doenças. Para isso, utilizamos

o modelo de Bernoulli, aonde verificamos um conglomerado puramente espacial tanto para altas taxas, como para baixas taxas (Kulldorff, 1997). O programa Terraview® versão 3.5.0 (Terraview, 2005) foi utilizado para a confecção dos mapas.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Microrregião de Sete Lagoas

A Microrregião de Sete Lagoas foi escolhida para ser a região onde este projeto se desenvolveu devido à presença de uma expressiva pecuária leiteira e, também, pela proximidade de Belo Horizonte. A região é composta de 20 municípios com 4.951 rebanhos leiteiros, tendo um efetivo de

316.443 bovinos, sendo que 3.390 propriedades, consideradas leiteiras, produzem 126 milhões de litros de leite por ano oriundo de 72.929 vacas ordenhadas (Anuário Pecuária Leiteira, 2006), com média anual de 1.727 litros por vaca.

No período de novembro de 2009 a julho de 2010, foram coletadas amostras em 11 municípios, sendo um total de 2.915 amostras provenientes de 151 fazendas localizadas nos municípios de: Araçai, Caetanópolis, Cachoeira da Prata, Cordisburgo, Fortuna de Minas, Funilândia, Inhaúma, Jequitibá, Prudente de Moraes, Paraopeba e Sete Lagoas. A Figura 2 demonstra a disposição espacial dos municípios.

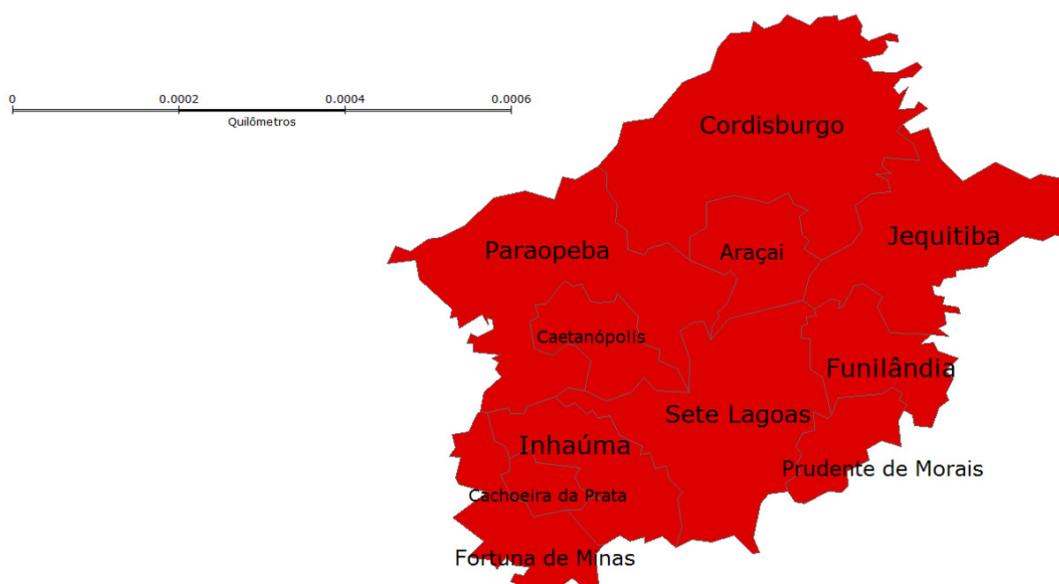


Figura 2 – Municípios participantes do estudo na microrregião de Sete Lagoas.

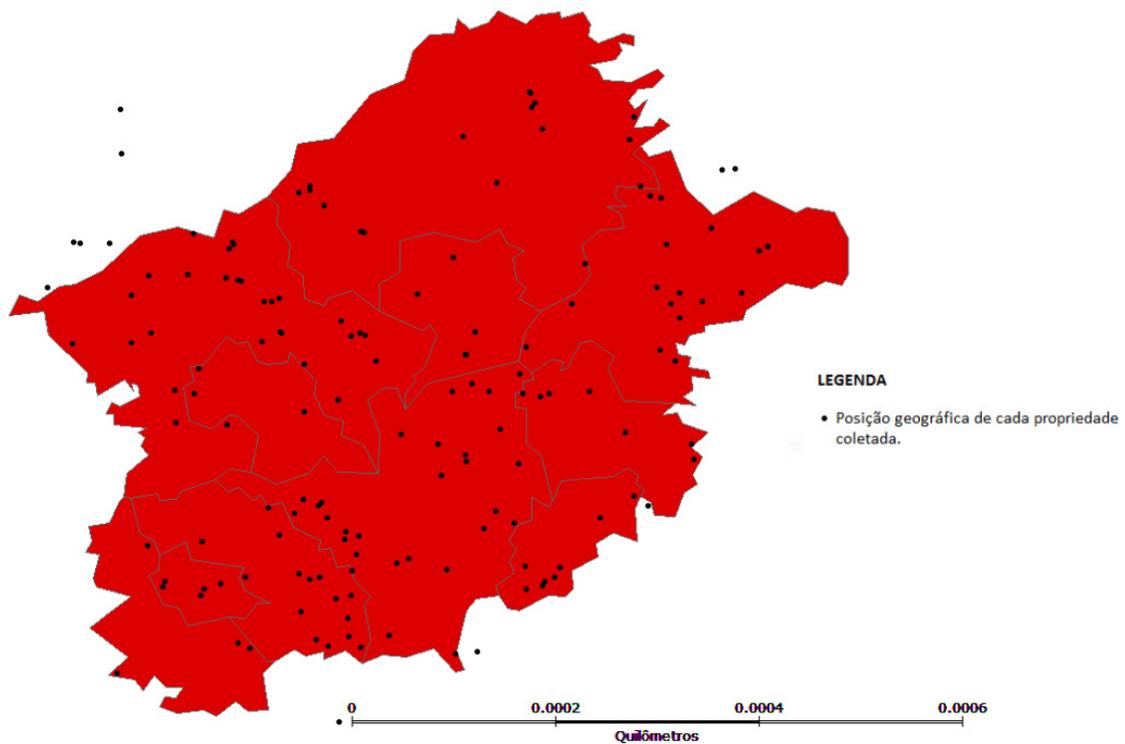


Figura 3 – Posição geográfica de cada propriedade coletada.

A presença de fazendas coletadas fora dos municípios, como demonstrada na Figura 3, de estudo pode ser explicada pelo fato do produtor possuir inscrição no IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária), informando que sua propriedade fica em um determinado município, porém geograficamente, esta fazenda encontra-se fora deste, já que não é realizado um controle de posição geográfica da fazenda.

4.2 – Prevalência animal de aglutininas anti-*Leptospira*

Nas 151 propriedades amostradas, obtivemos 2.915 amostras de soro bovino, chegando a uma média de 19,3 animais/propriedade. Cada amostra foi submetida ao exame de detecção de aglutininas anti-*Leptospira*, pela técnica de SAM. Foi encontrada uma prevalência de 20,7% (IC 95%, 17,1–24,3%) nas amostras, conforme demonstrada na Figura 4

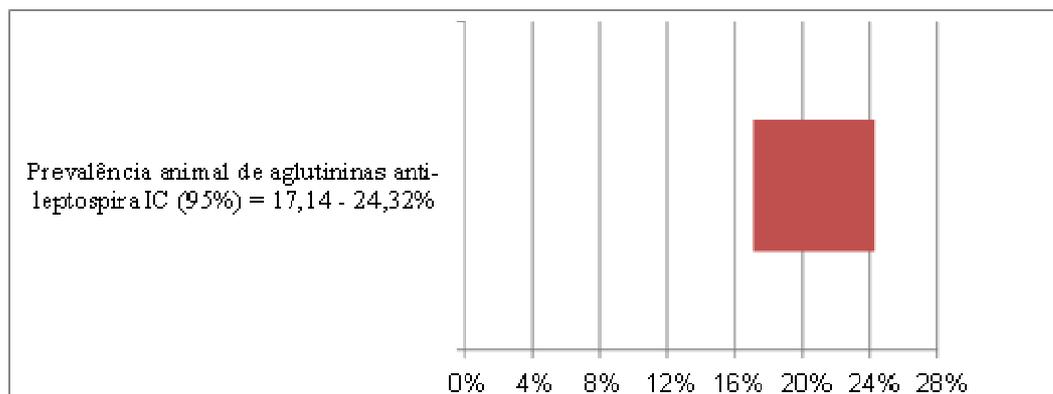


Figura 4 – Prevalência animal de aglutininas anti-*Leptospira*, em soros bovinos, na microrregião de Sete Lagoas, MG – 2010.

Este percentual foi menor que os encontrados por Favero *et al.* (2001), Lilenbaun e Souza (2003) e Tenório *et al.* (2005), 41,3%, 46,9% e 57,7% respectivamente, porém estes trabalhos utilizaram animais com histórico de problemas reprodutivos ou as amostras foram selecionadas a partir de banco de soros de animais que deram entrada para o exame de Leptospirose por terem suspeita clínica. Este fato acaba introduzindo um viés no resultado, pois o número de animais positivos tende a ser maior.

Trabalho de Moreira *et al.* (1979) no estado de Minas Gerais e Viana *et al.* (2010) na Bahia, encontram resultados bem próximo ao presente estudo, 27% e 13% de amostras positivas, respectivamente Já Favero *et al.* (2001), também em Minas Gerais, encontrou 41,3% de animais reagentes.

Os trabalhos de Vasconcellos *et al.* (1997), Langoni *et al.* (2000), Aguiar *et al.* (2006), Mineiro *et al.* (2007), Lage *et al.* (2007) e Castro *et al.* (2008), utilizando técnicas de amostragem aleatórias, acabaram por encontrar percentuais de prevalência animal maiores que o presente estudo, devido às características individuais de cada região estudada nestes trabalhos. Podemos

observar que a prevalência a nível animal para Leptospirose varia muito para cada região, sendo necessário observar características destas, tais como: índice pluviométrico, formas de produção, densidade animal, meios de prevenção e controle da doença.

As sorovariedades mais prevalentes nas amostras sanguíneas foram *lagoa* (19,3%), *hardjo* amostra Hardjoprajiitino (19,4%), *bolívia* (18,8%), *hardjobovis* (17,4%), *hardjo* amostra Norma (17,4%) e *wolffi* (11,3%), conforme demonstrada na Tabela 3. As sorovariedades *pomona* e *grippotiphosa* tiveram percentuais muito baixos, provavelmente por serem resultados de reações cruzadas.

Tanto a sorovariedade *bolívia* quanto a *lagoa*, foram isoladas pelo DMVP (Departamento de Medicina Veterinária Preventiva), da Universidade Federal de Minas Gerais, e seu sequenciamento genético esta em processo de realização, sendo suspeitado de se tratar da sorovariedade *hardjobovis*. Trabalho de Vaiana *et al.* (2010), utilizou as sorovariedades *bolívia* e *lagoa*, encontrando resultados bem próximos ao presente estudo.

Tabela 3 - Prevalência de sorovariedades nas amostras positivas para aglutininas anti-leptospirose em rebanho leiteiro da microrregião de Sete Lagoas – MG, 2010.

Sorovariedades	Amostras Analisadas	Positivos	Prevalência %
<i>hardjobovis</i>	2915	562	17,4
<i>Hardjo</i> amostra Hardjoprajiitino	2915	590	19,4
<i>hardjo</i> amostra Norma	2915	546	17,4
<i>bolivia</i> *	2915	601	18,8
<i>lagoa</i> *	2915	610	19,3
<i>pomona</i>	2915	003	0,006
<i>wolffi</i>	2915	371	11,2
<i>grippytyphosa</i>	2915	016	10,01

*- Amostras isoladas no DMVP – UFMG.

A grande predominância de reações para a sorovariedade *hardjo* em levantamentos realizados na população bovina, Moreira *et al.* (1979), Ellis (1994), Vasconcellos *et al.* (1997), Favero *et al.* (2001), Araújo *et al.* (2005), Tenório *et al.* (2005), Aguiar *et al.* (2006), Mineiro *et al.* (2007), Lage *et al.* (2007), Oliveira *et al.* (2009), Marques *et al.*

(2010) e Viana *et al.* (2010) e as encontradas no presente estudo, confirmam a importância da espécie bovina na manutenção da sorovariedade no meio ambiente, assim como já afirmado por Faine (2000) e Grooms (2006). A Figura 5 demonstra a distribuição das sorovariedades.

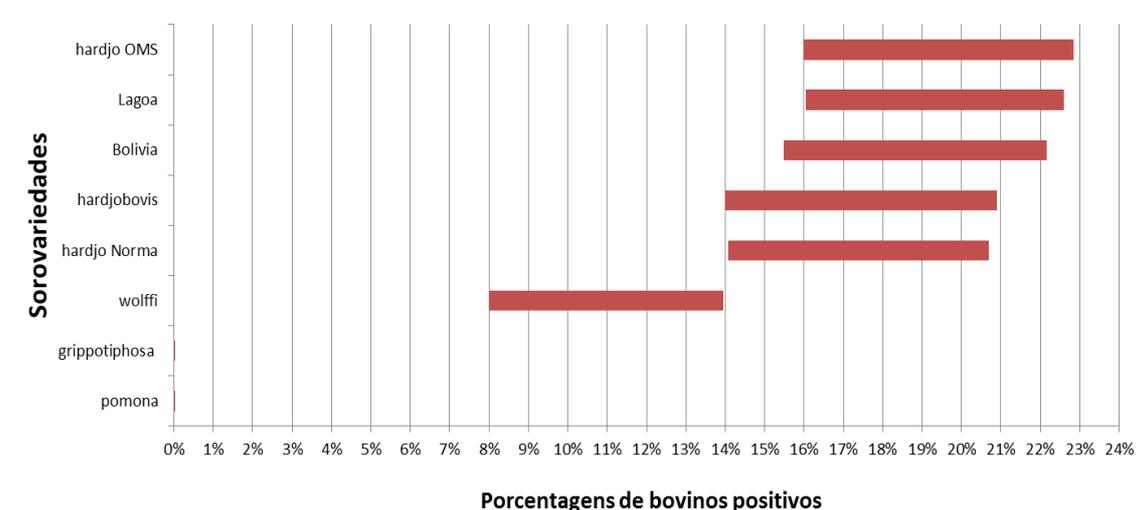


Figura 5 – Prevalência das sorovariedades testadas nos soros bovinos na microrregião de Sete Lagoas, MG- 2010.

A titulação encontrada para os animais positivos indica qual a sorovariedade mais provável como causadora da doença, além do grau de infecção no animal. Podemos então associar os dados da Figura 5 e da Tabela 4, aonde as sorovariedades *hardjo* são as mais prevalentes e com as maiores titulações. Altas titulações indicam que esta sorovariedade está presente no rebanho (Favero *et al.*, 2001) e causando a doença.

Titulações baixas pode ser fruto de reações cruzadas, uma resposta vacinal ou animais infectados, porém, não doentes. Cita-se na literatura um grande número de reações cruzadas entre as sorovariedades *hardjo*, entre si, e *wolffi* (Vasconcellos *et al.*, 1997; Favero *et al.*, 2001; Araújo *et al.*, 2005). A Tabela 4 demonstra a distribuição das titulações entre as amostras positivas para cada sorovariedade.

Tabela 4 – Distribuição da titulação das amostras positivas para o exame de SAM para aglutininas anti-*Leptospira*.

Sorovar	Título						
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400
<i>hardjobovis</i>	67,0%	13,8%	9,1%	6,5%	2,7%	0,5%	0,4%
<i>hardjo</i> (Norma)	70,8%	17,6%	6,7%	3,1%	1,3%	0,5%	-
<i>hardjo</i> amostra Hardjoprajitino	73,1%	14,2%	8,1%	3,8%	0,5%	-	0,2%
<i>bolivia</i>	60,1%	16,4%	12,2%	5,4%	2,9%	2,8%	0,2%
<i>lagoa</i>	58,2%	23,8%	10,5%	4,2%	3,3%	-	-
<i>wolffi</i>	87,0%	6,8%	5,5%	0,4%	0,3%	-	-
<i>grippotiphosa</i>	84,0%	-	16,0%	-	-	-	-
<i>pomona</i>	100%	-	-	-	-	-	-

Pode ser observado na Tabela 4 que as maiores titulações são encontradas para as sorovariedades *hardjo* e *hardjobovis*, confirmando sua importância para a doença, sendo necessário que vacinas utilizadas na população bovina da região possuam esses sorovares.

4.3 – Prevalência em nível de rebanho para aglutininas anti-*Leptospira*

Os resultados em nível de rebanho demonstram uma grande dispersão da

infecção por *Leptospira* na região. Foi encontrada uma prevalência de 80,7% (IC 95% = 73,8–87,7%), como ilustra a Figura 6. A análise espacial utilizando modelo de Bernoulli (Kulldorff, 1997), não detectou nenhum conglomerado na região, reforçando ainda mais a tese de que a distribuição da doença é difusa por toda a microrregião de Sete Lagoas-MG, não sendo encontrado nenhum local com nível de ocorrência da doença maior ou menor do que o esperado.

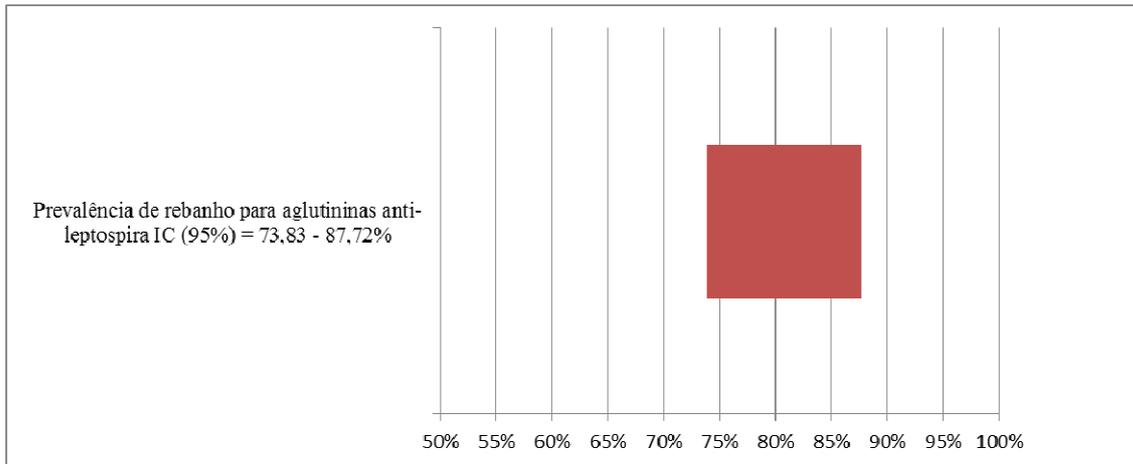


Figura 6 – Prevalência de rebanho para aglutininas anti-*Leptospira* em soros bovinos na microrregião de Sete Lagoas.

A prevalência de rebanho encontrada no presente estudo é bastante similar com as prevalências citadas na literatura. Moreira *et al.* (1979) em rebanhos do estado de Minas Gerais, chegou aos mesmos 80%. Faveiro *et al.* (2001), também em Minas Gerais, encontrou um percentual de 87,3% das propriedades positivas, confirmando a endemicidade da Leptospirose pelo estado de Minas Gerais.

Outros trabalhos, em diversos estados do Brasil, também encontraram resultados bastante semelhantes. Podemos citar os

trabalhos de Aguiar *et al.* (2006) no estado do Amazonas, com 95% de rebanhos positivos, Mineiro *et al.* (2007) na Parnaíba PI, com 100%, Castro *et al.* (2008) no estado de São Paulo, encontrando 71,3% de rebanhos positivos, Oliveira *et al.* (2009) com 77,9%, Marques *et al.* (2010), 96% e Viana *et al.* (2010) chegando a prevalência de rebanho de 78%.

A Figura 7 demonstra a posição geográfica das fazendas com rebanho positivo e negativo para aglutininas anti-leptospira.

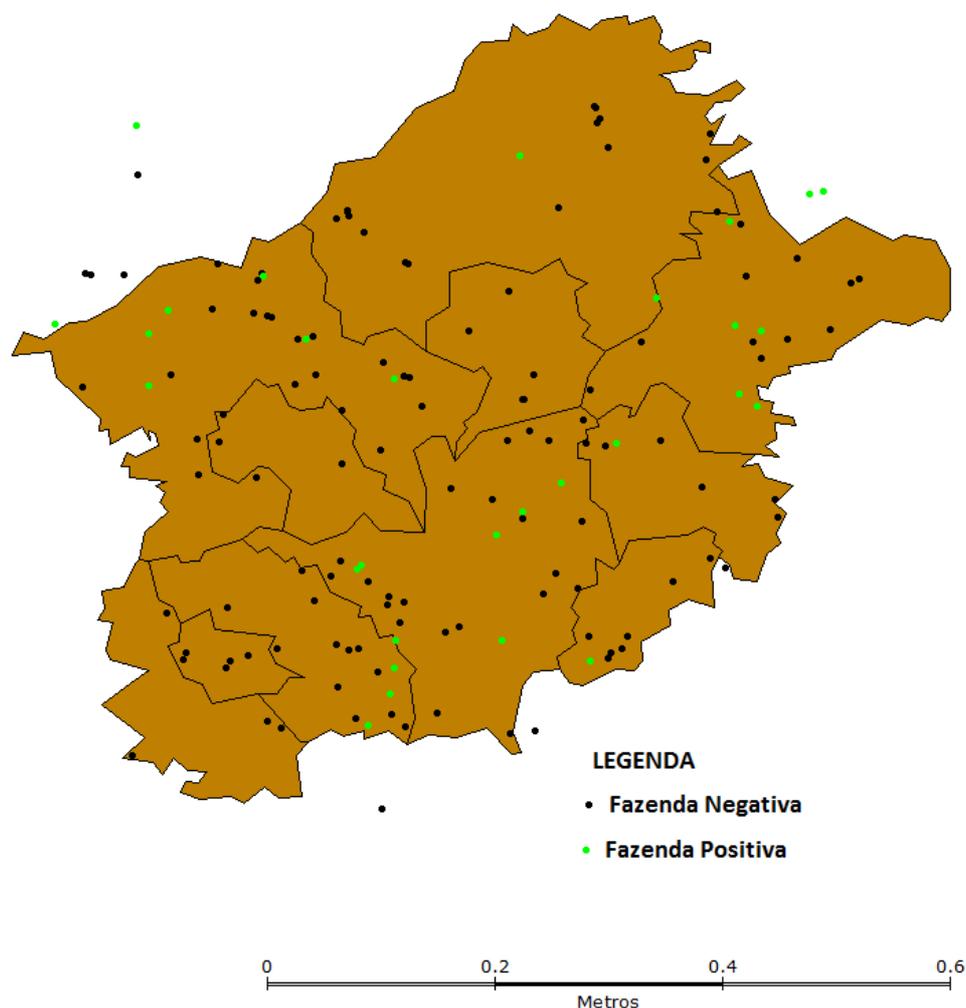


Figura 7 – Posição geográfica das fazendas positivas e negativas para aglutininas anti-*Leptospira* na microrregião de Sete Lagoas – MG, 2010.

4.4 – Prevalência animal para anticorpos anti-*Neospora caninum*

O Quadro 1 sintetiza algumas frequências de anticorpos anti-*Neospora caninum*

relatadas na literatura. Das 2.915 amostras coletadas e testadas, foi encontrada uma prevalência para anticorpos anti-*Neospora caninum* de 21,9% (IC 95% = 18,9% - 24,9%), conforme demonstrada na Figura 8.

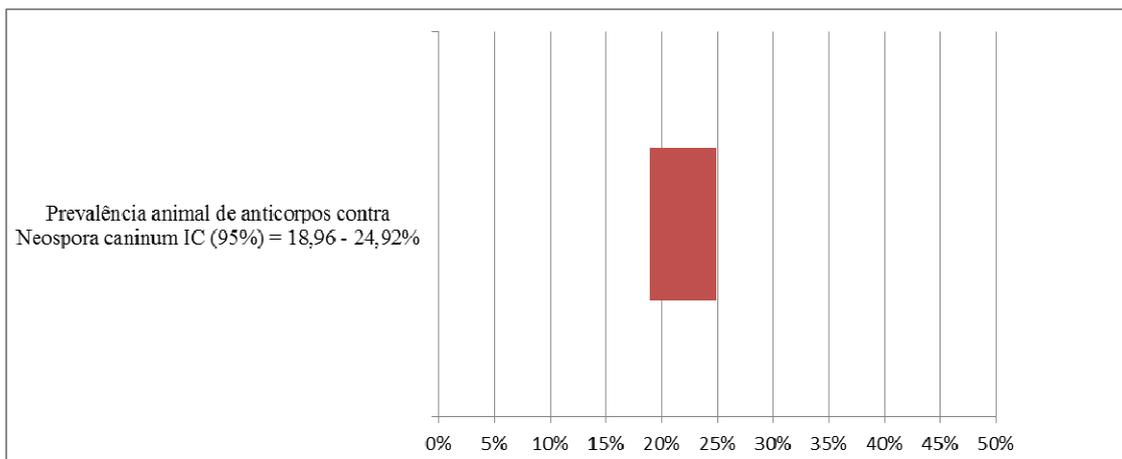


Figura 8 – Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros de bovinos leiteiros na microrregião de Sete Lagoas, MG – 2010.

Resultados similares são reportados por Gondim *et al.* (1999), Sartor *et al.* (1999), Melo *et al.* (2001), Corbellini *et al.* (2002), Guimarães Jr. *et al.* (2003), Sartor *et al.* (2003), Guimarães Jr. *et al.* (2004), Sartor *et al.* (2005) e Corbellini *et al.* (2006). Todos estes trabalhos foram realizados em populações de bovinos leiteiros. Dubey *et al.* (2006) citam que a transmissão vertical do parasita contribui, significativamente, para a persistência da infecção do *N. caninum*, já que este é passado de geração em geração. A alta presença de cães nas propriedades leiteiras é outro fator que pode estar associada à alta prevalência, assim como as práticas de biossegurança incorretas, alta densidade animal nas propriedades, erros de manejo sanitário e falta de controle diagnóstico, tanto pelo desconhecimento do proprietário, quanto do profissional veterinário responsável pelos animais (Dubey *et al.*, 2007).

No estado de Minas Gerais, Ragozo *et al.* (2003) reportou resultados similares, 29% de animais positivos, porém em propriedades de aptidão leiteira e de carne. Pituco *et al.* (2001) e Santos *et al.* (2009) relataram prevalências acima do encontrado no presente estudo, 45% e 47%, respectivamente. Já no estado Mato Grosso, o resultado encontrado foi de 53% (Benetti *et al.*, 2009) e no Maranhão o resultado foi de 50% (Teixeira *et al.*, 2010). Já o trabalho de Melo *et al.* (2001), utilizou

apenas animais de propriedades leiteiras, usando a mesma técnica diagnóstica, o ELISA, tendo encontrado uma prevalência de 18,66%, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo.

Os trabalhos de Melo *et al.* (2006) em Goiás, Aguiar *et al.* (2006) no Amazonas, Oshiro *et al.* (2007) no estado do Mato Grosso do Sul e Minervino *et al.* (2008) no Pará, demonstram resultados muito próximo ao presente estudo, porém estes utilizaram animais de aptidão leiteira e de corte como unidades amostrais.

4.5 – Prevalência de rebanho para anticorpos anti-*Neospora caninum*.

Das 151 propriedades amostradas, tivemos uma prevalência de 98,5% (IC 95%= 97,0 – 99,9%) quando utilizamos como fazendas positivas, a presença de pelo menos um animal positivo por fazenda, porém este mesmo teste ELISA possui uma sensibilidade relatada de 98% e especificidade de 92% (Wouda *et al.*, 1998). Uma especificidade de 92% pode nos levar a alguns resultados FALSOS POSITIVOS. Por esta razão, foram realizados três cálculos de prevalência: o primeiro com pelo menos um animal positivo por fazenda, o segundo com pelo menos dois animais positivos por fazenda e, por fim, o terceiro com pelo menos três animais positivos por

fazenda. Por se tratar de um trabalho com duas doenças estudadas, como marco amostral, foi utilizado a sensibilidade e especificidade de 99%, resultando nas sensibilidades e especificidades de rebanho de 98,7% e 100%, respectivamente. No entanto, quando se trata especificamente da neospora e, levando-se em conta o valor de especificidade relatada do Kit ELISA de

92%, verifica-se uma queda na sensibilidade e especificidade de rebanho nos cenários utilizando um e dois animais positivos no rebanho. No cenário com três animais positivos, a especificidade de rebanho, chega a 100%. Os resultados estão demonstrados na Tabela 5. Todas as prevalências estão demonstradas na Figura 10.

Tabela 5 – Ajuste de número de animais positivos por fazenda, para que esta seja considerada como fazenda positiva para anticorpos anti-*N. caninum* em rebanhos leiteiros da microrregião de Sete Lagoas - MG – 2010.

Condição / fazenda	Prevalência
Um animal positivo	98,5% (IC 95% = 97,0 – 99,9%)
Dois animais positivos	91,3% (IC 95% = 86,6 – 96,1%)
Três animais positivos	74,1% (IC 95 = 66,4 – 81,9%)

As três prevalências calculadas são similares a todos os resultados reportados na literatura, conforme pode ser observado no Quadro 1, indicando que a Neosporose está presente em todo o território brasileiro e com um fator mais agravante, em altas prevalências entre os rebanhos.

A Figura 9 demonstra a distribuição do número de animais positivos por fazenda. É observada uma absoluta maioria de fazendas com cinco ou mais animais positivos em seu rebanho, confirmando a alta frequência de animais doentes nos rebanhos leiteiros.

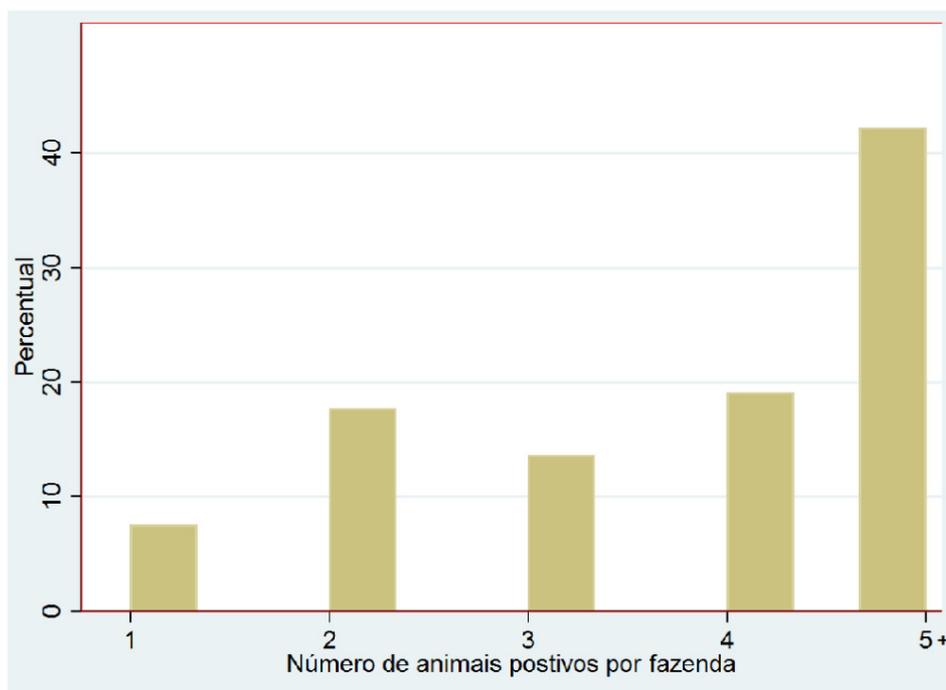


Figura 9 – Percentual de número de animais positivos para anticorpos anti-*Neospora caninum* por propriedade.

Quadro 1 – Resumo de algumas frequências para infecção por *Neospora caninum* no Brasil.

Local	Aptidão	Técnica	Frequência Animal / Rebanho	Referência
Bahia	Leite	RIFI	14,1% / 92%	Gondin <i>et al.</i> , (1999)
São Paulo	Leite	ELISA / RIFI	ELISA – 30% RIFI - 16,3%	Sartor <i>et al.</i> , (1999)
Minas Gerais	Leite / Carne	ELISA	45% / -	Pituco <i>et al.</i> , (2001)
Minas Gerais	Leite	ELISA	18,6% / 96%	Melo <i>et al.</i> , (2001)
Rio Grande do Sul	Leite	RIFI	11,2% / 100%	Corbellini <i>et al.</i> , (2002)
Paraná	Leite	ELISA / RIFI	ELISA – 54,5% RIFI – 21,6%	Guimarães Junior <i>et al.</i> , (2003)
Avaré, SP	Leite	ELISA / RIFI	ELISA – 30% RIFI – 16%	Sartor <i>et al.</i> , (2003)
Minas Gerais	Leite / Carne	RIFI	29% / -	Ragozo <i>et al.</i> , (2003)
Paraná	Leite	RIFI	14,3% / 91%	Guimarães Jr. <i>et al.</i> , (2004)
São Paulo	Leite	ELISA	35% / 100%	Sartor <i>et al.</i> , (2005)
Goiás	Leite / Carne	RIFI	30% / 100%	Melo <i>et al.</i> , (2006)
Rio Grande do Sul	Leite	RIFI	17,8% / 93%	Corbellini <i>et al.</i> , (2006)
Amazonas	Leite / Carne	RIFI	10,4% / 72%	Aguiar <i>et al.</i> , (2006)
Mato Grosso do Sul	Leite / Carne	RIFI	15% / 70%	Oshiro <i>et al.</i> , (2007)
Pará	Leite / Carne	RIFI	18,7% / 81,2%	Minervino <i>et al.</i> , (2008)
Mato Grosso	Leite	RIFI	53% / 100%	Benetti <i>et al.</i> , (2009)
Lavras-MG	Leite	RIFI	47% / 100%	Santos <i>et al.</i> , (2009)
Maranhão	Leite	RIFI	50% / -	Teixeira <i>et al.</i> , (2010)

A Figura 10 demonstra as 3 prevalências encontradas no estudo para os 3 diferentes pontos de cortes adotados devido a Sensibilidade e Especificidade do exame ELISA.

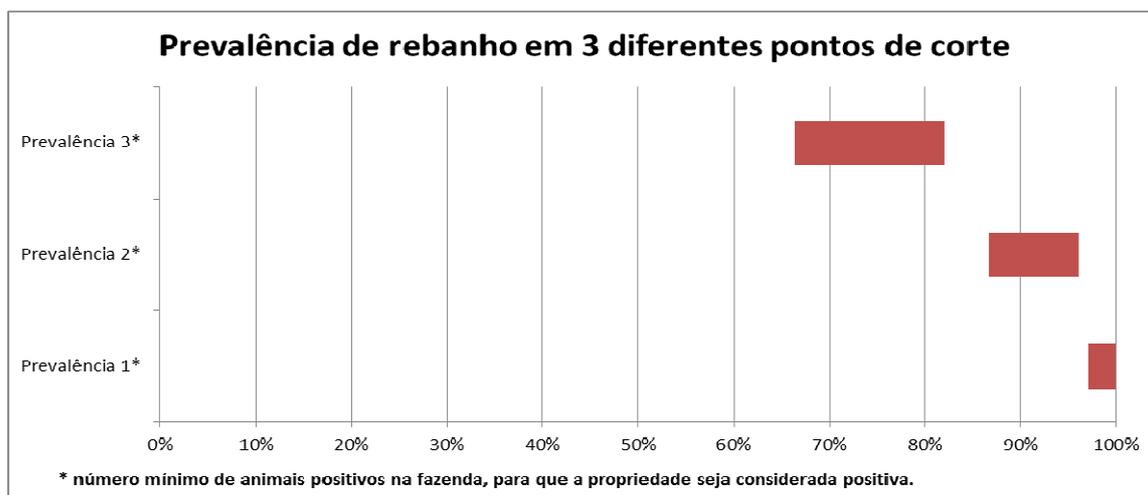


Figura 10 – Prevalência de rebanho para anticorpos anti-*N. caninum*, com 3 diferentes pontos de corte.

A análise espacial utilizando modelo de Bernoulli (Kulldorff, 1997), detectou apenas um cluster na região para taxas baixas. Nesta região, o número de fazendas positivas, quando o número mínimo de animais positivos para a fazenda ser considerada positiva foi dois, ficou abaixo

do número esperado (p-value: 0,022). Nos cenários com um animal positivo por fazenda e com três animais positivos, não foi apontado nenhum cluster. A Figura 11 demonstra a posição geográfica das fazendas deste cluster.

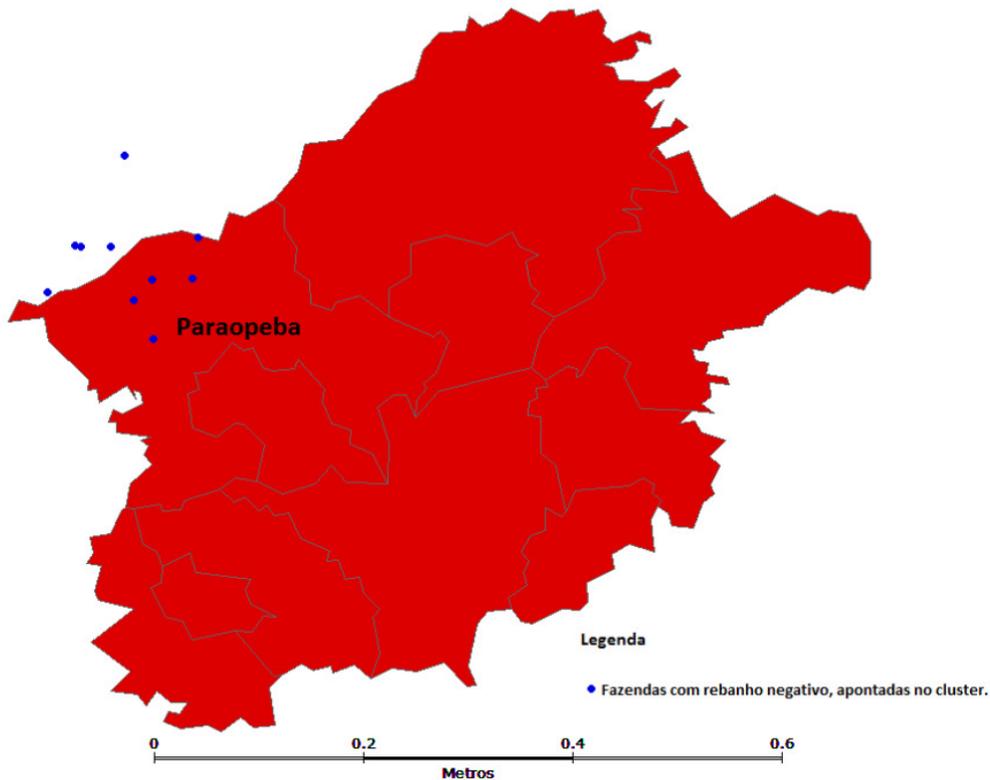


Figura 11- Posição geográfica das fazendas negativas para anticorpos anti-*N. caninum* apontadas no cluster.

4.6 – Resumo dos resultados encontrados

A Tabela 6 sintetiza todos os resultados encontrados no presente estudo, com as

prevalências em nível animal e de rebanho para aglutininas anti-*Leptospira* e anticorpos anti-*N. caninum* em rebanhos leiteiros de municípios na microrregião de Sete Lagoas, MG- 2010.

Tabela 6 - Resumo das prevalências encontradas para aglutininas anti-*Leptospira* e para anticorpos anti - *N. caninum* e bovinos leiteiros na microrregião de Sete Lagoas – MG, 2010.

Aglutininas anti-<i>Leptospira</i>	Prevalência
Animal	20,7%
Rebanho	81,7%
Anticorpos anti-<i>Neospora caninum</i>	Prevalência
Animal	21,9%
Rebanho	
1 animal positivo	98,5%
2 animais positivos	91,3%
3 animais positivos	74,1%

5 – CONCLUSÕES

A prevalência animal para aglutininas anti-leptospira foi de 20,7% (IC95% = 17,1 – 24,3%), sendo as sorovarietades *hardjo* amostra *Norma*, lagoa, *bolívia*, *hardjobovis* e *hardjo* amostra *Hardjoprajitino*, as mais prevalentes. A prevalência de rebanho para aglutininas anti-leptospira foi de 80,8% (IC 95% = 73,8 – 87,7%), confirmando a alta distribuição da doença pelo rebanho da região.

A prevalência animal para anticorpos anti-*Neospora caninum* foi de 21,9% (IC 95% = 18,9 – 24,9%). A prevalência de rebanho foi ajustada devido a uma sensibilidade de 99% e especificidade de 92% do teste ELISA, tendo, então, três prevalências: a primeira utilizando um animal positivo por fazenda, a segunda utilizando no mínimo dois animais e a terceira, três animais. Tais prevalências foram, respectivamente, de: 98,5% (IC 95% = 97,0 – 99,9%), 91,3% (IC 95% = 86,6 – 96,0%) e 74% (IC 95% = 66,3 – 81,9%).

A análise espacial apontou um cluster para taxas baixas para fazendas positivas para anticorpos anti-*N. caninum*, ao norte do município de Paraopeba, sendo assim, obtivemos um número de fazendas positivas abaixo do valor esperado.

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que na microrregião de Sete Lagoas - Minas Gerais são endêmicas tanto a Leptospirose quanto a Neosporose,

possuindo altas prevalências tanto em nível animal quanto em nível de rebanho.

6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devemos ressaltar que este trabalho faz parte de um grande projeto, financiado pelo Edital CNPq/MAPA/DAS N 064/2008, onde além da prevalência destas duas doenças, ainda será realizado um estudo sobre os fatores de risco e custos para as doenças.

O projeto foi realizado com uma estrutura bem delimitada. Todas as amostras foram coletadas aleatoriamente, assim como a escolha das fazendas. Estas características do estudo são de importante relevância ao se analisar o resultado final do projeto. Por toda a natureza epidemiológica do estudo, o trabalho é inédito no Brasil.

Agradecemos o apoio do CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), INCT (Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias), IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária), para o desenvolvimento e financiamento deste projeto.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D. M.; GENNARI, S. M.; CAVALCANTE, G. T. *et al.* Soroprevalence of *Leptospira* spp. in cattle from Monte Negro municipality, western Amazon. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 26, n. 2, p.102-104, 2006.

- AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; RODRIGUES, A.A.R. *et al.* Prevalence of anti- *Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. *Vet. Parasitol.* v.142, n.1-2, p.71-77, 2006
- ANDERSON, M.L.L.; ANDRIAN, A.G.; CONRAD, P.A. Neosporosis in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 60, n.1, p.417 - 431, 2000.
- ANUÁRIO da Pecuária Leiteira - 2006. Disponível em www.ibge.gov.br. (acessado em 16 de outubro de 2010).
- ANUÁRIO da Pecuária Leiteira- 2007 Disponível em www.ibge.gov.br (acessado em 08 de fevereiro de 2011).
- ARAÚJO, V.E.M.; MOREIRA, E.C.; NAVEDA, L.A.B. *et al.* Freqüência de aglutininas anti-Leptospira interrogans em soros sanguíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n. 1, p.430-435, 2005.
- BENETTI, A. H.; SCHEIN, F. B.; SANTOS, T. R. *et al.* Pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais da região Sudoeste do estado de Mato Grosso. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* v. 18, n. 1, p. 29-33, 2009.
- BJERKAS, I.; MOHN, S.F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing incephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenkd*; v.70, n.1, p. 271-274, 1984.
- BOLIN, C.A. Diagnosis and Control of Bovine Leptospirosis. In:PROCEEDINGS OF THE 6TH WESTERN DAIRY MANAGEMENT CONFERENCE. Reno. 2003 v.12-14, p.155-159.
- BRAUTIGAM, F.E.; HIETALA, S.K.; GLASS, R. Resultados de levantamento sorológico para a espécie *Neospora* em bovinos de corte e leite. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15, 1996, Campo Grande. *Anais...* Campo Grande: PANVET, 1996, p. 284
- CASTRO, V., AZEVEDO, S. S., GOTTI, T. B., *ET AL.* Soroprevalência da leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado de São Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Biol. São Paulo*, v. 75, n. 1, p. 3-11, 2008.
- COLE, J.R.; SULZER, C.R.; PULSSELY, P.R. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appli. Microb.* v. 25, n.6, p.976-980, 1973.
- CORBELLINI, L. G.; D. R. SMITH, C. A. PESCADOR, M. *et al.* Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. *Prev. Vet. Med.* V. 74 n. 1, p. 130-141, 2006.
- CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.F.E.; *et al.* Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Vet. Paras.* v.103, n.3, p.195-202, 2002.
- DEAN, A.G.; DEAN, J.A.; COULOMBIER, D. *Epi info. Version 6: a word processing database, and statistics program for epidemiology on microcomputers.* Atlanta, Georgia, USA: Center of Disease Control and Prevention, 1994. 589p.
- DEL FAVA, C.; PITUCO, E.M.; GENOVEZ, M.E. Diagnóstico diferencial de doenças da reprodução em bovinos. 2007. *Inst. Biol.* v.69, n.2, p. 73-79.
- DOHOO, I.R.; MARTIN, S.W.; STRYHN, H. *Veterinary Epidemiology Research.* Charlottetown, Prince Edward Island, AVC Inc, 2003, p.865.
- DUBEY JP. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. of Parasitol.* vol. 41, n. 1, p. 1-16, 2003.
- DUBEY, J.P.; CARPENTER, J.L.; SPEER, C.A. *et al.* Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v.192: n.1 p. 1269-1285, 1988.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.* V. 67: p 1-59, 1996.

- DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet. Parasitol.* v. 141, n.1, p. 1-34, 2006.
- DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007.
- ELLIS, W.A.; Leptospirosis in the Tropics: Prevalence, Pathogenesis and Control. *Prev. Vet. Med.*, v.2, n.2, p. 411-421. 1984.
- FAINE, S. *Guidelines for the control of leptospirosis*. Geneva; World Health Organization, 1982, 171 p.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C. *Leptospira and leptospirosis*. 2.ed. Melbourne: MediSci, 1999. 272p.
- FAVERO, M.; PINHEIRO, S.R.; VASCONCELLOS, S.A. *et al.* Leptospirose bovina - variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 estados do Brasil. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, v.68, n.2, p.29-35, 2001.
- FREITAS, D.C.; LACERDA, J.R.; VEIGA, J.S.; LACERDA, J.P.G. Identificação da Leptospirose bovina no Brasil. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. São Paulo*, v.6, n.1, p. 81-83, 1957.
- GALTON, M.M. A rapid microscopic slide screening test for the serodiagnosis of leptospirosis. *Am. J. Vet. of Res.* , v.19, p. 505-512, 1962.
- GONDIM, L.F.P.; SARTOR, I.F. Detecção de anticorpos contra *Neospora caninum* em vacas leiteiras em uma propriedade com histórico de aborto. In: *Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, Anais, Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinário, p.346, 1997.
- GONDIM, L.F.P.; SARTOR, I.F.; HASEGAWA, M.; YAMANE, I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Vet. Parasitol.* v. 86, n.1, p.71-75, 1999.
- GONDIM, L.F.P.; MCALLISTER, M.M.; PITT, W.C.; ZEMLIKA, D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasit.* v.34, p. 159-161, 2004.
- GROOMS, D.L. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. *Theriogenology* v. 66, n.3, p. 624-628, 2006.
- GUIMARÃES JR., J. S. *Neospora caninum* em bovinos de exploração leiteira: soroprevalência, fatores de risco e comparação de técnicas sorológicas, 2002. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- GUIMARÃES, J.S.; SOUZA, S.L.P.; BERGAMASCHI, D.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of north of Paraná state, Brazil. *Vet. Parasitol.* v. 124, n. 1-2, p. 1-8, 2004.
- HADDAD, J.P. A.; DOHOO, I.R.; VANLEEWEN, J.A. A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle: A Canadian perspective. *Can. Vet. J.* v.46, p. 230-243, 2005.
- HERDACC version 3.,1995. Disponível em <http://www.etscchoools.co.uk/EpiVetNet/files/herdacc.exe>.
- HERRMANN, G.P.; LAGE, A.P.; MOREIRA, E.C. *et al.* Soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira* spp. em ovinos nas 34, Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do estado Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciênc. Rural*, v.34, n.2, p.443-448, 2004.
- KULLDORFF M. Bernoulli, Discrete Poisson and Continuous Poisson Models: A spatial scan statistic. *Communications in Statistics: Theory and Methods*, v. 26, p. 1481-1496, 1997.
- LAGE A.P.; LEITE R.M.H.; THOMPSON J.A. *et al.* Serology for *Leptospira* sp. in cattle of the State of Paraíba, Brazil. *Arqs. Inst. Biológ. São Paulo*, v. 74, n.3, p. 185-190. 2007.

- LANGONI, H.; MEIRELES, L.R.; GOTTSCHALK, S. Perfil sorológico da leptospirose bovina em regiões do estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol. São Paulo*, v.67, n.1, p.37-41, 2000.
- LEVETT P.N. Leptospirosis. *Clin. Microb. Rev.*, v.14, n. 2, p.296-326, 2001.
- LILENBAUM, W.; SOUZA, G.N. Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Res. Vet. Scie*, v. 75, p. 249-251, 2003.
- MAGALHÃES, D.F. *Prevalência de aglutininas anti- Leptospira interrogans em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais, 2001/02*, 2005. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Escola de Veterinária Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- MANUAL de controle da leptospirose. 2 ed. rev. Brasília : Fundação Nacional de Saúde, 1989. 98p.
- MANUAL de leptospirose. Brasília: Ministério da saúde, 1995, 98p
- MARQUES, A.E.; ROCHA, W.V.; DIEDERICHSEN DE BRITO, W.M.E. Prevalência de anticorpos anti-leptospira spp. E aspectos epidemiológicos da infecção em bovinos do estado de Goiás. *Cienc. Anim. Bras.*, v. 11, n. 3, p. 607-617, 2010.
- MCALLISTER M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. *et al.* Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasit.*, v. 28, n.1, p. 1473-1479, 1998
- MELO, C.B. *Neospora caninum em Minas Gerais*. Aspectos epidemiológicos. 2001. 131f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- MELO, D.P.G.; DA SILVA, A. C.; ORTEGA-MORA, L. M. *et al.* Prevalência De Anticorpos Anti- *Neospora Caninum* Em Bovinos das Microrregiões de Goiânia e Anápolis, Goiás, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.15, n.3, p.105-109, 2006.
- MINEIRO, A.L.B.B.; BEZERRA, E.E.A.; VASCONCELLOS, S.A. *et al.* Infecção por leptospira em bovinos e sua associação com transtornos reprodutivos e condições climáticas *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, n.5, p.1103-1109, 2007
- MINERVINO, A.H.H.; RAGOZO, A.M.A.; MONTEIRO, R.M. *et al.* Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle from Santarem, Pará, Brazil. *Res. Vet. Scie*, v.84,n.1, p.254-256, 2008.
- MOREIRA, E.C. *Avaliação de métodos para erradicação de leptospiroses em bovinos leiteiros*. 1994, 93f. Tese (Doutorado)-Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- MOREIRA, E.C.; SILVA, J.A.; VIANA, F.C. Leptospirose bovina: I - aglutininas anti-leptospiras em soros sanguíneos de bovinos em Minas Gerais. *Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. Minas Gerais*, v.31, n.2, p.375-388, 1979.
- OLIVEIRA, F.C.S.; AZEVEDO, S.S.; PINHEIRO, S.R. *et al.* Fatores de risco para a leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado da Bahia, Nordeste do Brasil, *Pesqui. Vet. Bras.*, v.30, n.5, p.398-402, 2010.
- OSHIRO, L.M.; MATOS, M.F.C.; OLIVEIRA, J.M. *et al.* Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 16, n. 3, p. 133-138, 2007.
- PITUCO, E.M.; SOARES; J.A.G.; OKUDA, L.H.; STEFANO, E. Ocorrência de neosporose bovina em rebanhos com histórico de abortamento no Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, v.65, p.70, 1998.
- PITUCO, E.M.; STEFANO, E.; OKUDA, L.H. *et al.* Sorodiagnóstico de Neosporose bovina no Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, v.68,n.2, p.83, 2001.
- RAGOZO, A.M.A.; PAULA, V.S.O.; SOUZA, S.L.P. *et al.* Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis estados brasileiros. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 12, n. 1, p. 33-37, 2003.

- SALLES, R.S.; LILENBAUM, W. Leptospirose bovina no Brasil. *Rev. CFMV*, Brasília, v.21, p. 42-46, 2006.
- SANTA ROSA, C.A.; CASTRO, A.F.P.; TROISE, C. Isolamento de *Leptospira Icterohaemorrhagiae* de bovino em São Paulo. *Arq. Inst. Biol. São Paulo*, v. 28, n.1, p.113-118. 1961.
- SANTOS, R.R.D.; GUIMARES, A.M.; ROCHA, C.M.B.M.; HIRSCH, C. Frequência de Anticorpos Anti-*Neospora Caninum* em bezerras e novilhas de rebanhos leiteiros na microrregião de Lavras, Minas Gerais. *Ciênc. Anim. Bras.*, v. 10, n. 1, p. 271-280, 2009.
- SARTOR, I. F.; HASEGAWA, M. Y.; GONDIM, L. F. P. *et al.* Prevalência de anticorpos contra *Neospora caninum* em rebanhos leiteiros no município de Avaré, Anais. Salvador, In: Colégio *Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, p. 225-232, 1999.
- SARTOR, I.F.; GARCIA FILHO, A.; VIANNA, L.C. *ET AL.* Ocorrência de anticorpos Anti-*Neospora Caninum* em bovinos leiteiros e de corte da região de Presidente Prudente, SP. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, v.72, n.4, p. 413-418, 2005.
- SARTOR, I.F.; HASEGAWA, M.Y.; CANAVESSI, A.M.O.; PINCKNEY, R.D. Ocorrência de anticorpos de *Neospora caninum* em vacas leiteiras avaliados pelos métodos de ELISA e RIFI no município de Avaré, SP. *Sem. Ciênc. Agrár.* v.24, n.1, p.3-10, 2003.
- TEIXEIRA, W.C.; UZÊDA, R.S.; GONDIM, L.F.P. *et al.* Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* (Apicomplexa: Sarcocystidae) em bovinos leiteiros de propriedades rurais em três microrregiões no estado do Maranhão. *Pesqui. Vet. Bras*, v.30, n.9, p. 729-734, 2010.
- TENÓRIO, T.G.S.; MELO, L.E.H.; VASCONCELLOS, S.A. *et al.* Soroprevalência da brucelose e leptospirose em de rebanhos bovinos leiteiros do estado de Pernambuco. *Vet. Not.* v.11, n.2, p.43-48, 2005.
- TERRAVIEW 3.5.0. São José dos Campos, SP: INPE, 2010.
- TERRESTRIAL animal health code. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/en_mcode.htm>. Acessado em: 18/11/2010.
- VASCONCELLOS, S.A.; BARBARINI JÚNIOR, O.; UMEHARA, O. Leptospirose bovina. Níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. *Arq. Inst. Biol. São Paulo*, v.64, n. 2, p.7-15, 1997.
- VIANA, K.F.; ZANINI, M.S.; MOREIRA, E.C. Frequência de anticorpos anti-leptospira spp em rebanhos bovinos da bacia leiteira do Caparaó, estado do Espírito Santo. *Arch. Vet. Scien.*, v.15, n.2, p.100-106, 2010.
- WOLF CA: The economics of dairy production. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* v.19, n.2, p. 271-293, 2003.
- WOUDA, W.; BRINKHOF, J.M.A.; VAN MAANEN, C. *et al.* Serodiagnosis of neosporosis in individual cows and dairy herds, a comparative study of three enzyme-linked immunosorbent assays. *Clinic. Diagn. Lab. Immun.*, v.5, n.2, p 711-716, 1998.