

**JUSCIVETE FÁTIMA FÁVERO**

**NEOSPOROSE E LEPTOSPIROSE EM VACAS DE LEITE NO OESTE DE SANTA CATARINA:  
IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE RISCO E A RELAÇÃO CAUSA-EFEITO DA DOENÇA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração Ciência e Produção Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Zootecnia**.

Orientador (a): Dr. Aleksandro Shafer da Silva  
Co-orientador(s): Dr. Alexandre A. Tonin

**CHAPECÓ  
2017**

Fávero, Juscivete F.  
NEOSPOROSE E LEPTOSPIROSE EM VACAS DE LEITE NO  
OESTE DE SANTA CATARINA: IDENTIFICAÇÃO DE FATORES  
DE RISCO E A RELAÇÃO CAUSA-EFEITO DA DOENÇA /  
Juscivete F. Fávero. - Chapecó , 2017.  
98 p.

Orientador: Aleksandro S. da Silva  
Co-orientador: Alexandre A. Tonin  
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado  
de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do  
Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia,  
Chapecó, 2017.

1. Neospora caninum. 2. Leptospirose. 3.  
Problemas reprodutivos. 4. Bovinos de leite. I. da  
Silva, Aleksandro S.. II. Tonin, Alexandre A. ,  
.III. Universidade do Estado de Santa Catarina,  
Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com auxílio do programa de geração automática da Biblioteca Setorial do CEO/UDESC.

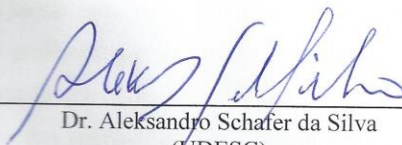
JUSCIVETE FÁTIMA FÁVERO

**NEOSPOROSE E LEPTOSPIROSE EM VACAS DE LEITE NO OESTE  
DE SANTA CATARINA: IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE RISCO  
E A RELAÇÃO CAUSA-EFEITO DA DOENÇA**

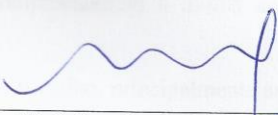
Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Zootecnia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia, da Universidade do Estado de Santa Catarina.

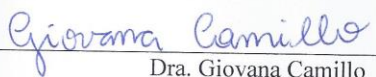
**Banca Examinadora:**

Orientador:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Aleksandro Schafer da Silva  
(UDESC)

Membros:

  
\_\_\_\_\_  
Phd. Dra. Lenita Moura Stefani  
(UDESC)

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Giovana Camillo  
(UNOESC)

Chapecó, 10 de março de 2017.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus pelo Dom da Vida e por ter me iluminado na caminhada exaustiva, me dando forças a prosseguir continuamente.

Agradeço aos meus pais Armando Fávero e Oneida Bissani Fávero pela dedicação com os filhos e por ter me ensinado a viver intensamente e a jamais desistir, persistindo nas metas estabelecidas.

Ao meu orientador e exemplo de pesquisador, Dr. Aleksandro Shafer da Silva pela oportunidade de aprendizado, incentivo, conselhos, ideias, puxões de orelha. Tudo serviu para meu crescimento e jamais esquecerei. A ti minha eterna gratidão!!

Aos colegas de profissão que não mediram esforços no auxílio com a coleta de dados e amostras, mostrando que somos mais que colegas.

Aos proprietários dos animais, os quais permitiram adentrar em suas propriedades para realização das coletas.

Aos amigos que compreenderam a minha ausência e a falta de atenção nesta caminhada.

Aos meus colegas de trabalho, principalmente ao meu amigo Selito Giroto, a quem tenho maior estima, por me aconselhar e por me incentivar sempre.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Pesquisa em Parasitologia Animal, pela ajuda, paciência, companheirismo e pelas horas de descontração, enfim aos amigos da UDESC, o meu muito obrigado!!

Não podia esquecer a amiga/irmã que ganhei nesta caminhada, a qual foi confiante, companheira, conselheira e acima de tudo compreensiva. Jamais esquecerei o teu acolhimento Jéssica Giuriatti.

Agradeço a FUMDES – UNIEDU pelo apoio financeiro recebido, o qual foi de suma importância para a continuidade dos estudos.

"A grandeza de uma nação pode ser julgada pelo modo que seus animais são tratados."

Mahatma Gandhi

**RESUMO**

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Universidade do Estado de Santa Catarina

## **NEOSPOROSE E LEPTOSPIROSE EM VACAS DE LEITE NO OESTE DE SANTA CATARINA: IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE RISCO E A RELAÇÃO CAUSA-EFEITO DA DOENÇA**

AUTOR: Juscivete Fátima Fávero  
ORIENTADOR(A): Dr. Aleksandro Shafer da Silva  
Chapecó, 10 de março de 2017.

A ocorrência de problemas reprodutivos em bovinos de leite no Oeste de Santa Catarina, Brasil é um grande problema na produção. O aborto nos vários estágios de gestação, natimortos, infertilidade, metrites e retenção de tecidos placentários estão entre os problemas que muitas vezes são causados por doenças infecciosas. Entre estas doenças, a neosporose causada pelo *Neospora caninum* e a leptospirose causada por espécies patogênicas de *Leptospira* spp foram alvo de estudo nas últimas décadas, pois são agentes responsáveis por problemas reprodutivos em vacas. No oeste de Santa Catarina está localizada uma das maiores bacias leiteiras do Brasil, e problemas reprodutivos são comumente descritos pelos proprietários. Portanto, este estudo objetivou verificar a soroprevalência de *N. caninum* e *Leptospira* spp, assim como identificar os fatores de risco e relação causa-efeito das doenças causadas por estes agentes infecciosos nos bovinos de leite no estado de Santa Catarina. Para isso, amostras de soro de 1518 vacas de 72 propriedades foram usadas para pesquisa de anticorpos para neosporose, sendo utilizada a técnica de Imunofluorescência indireta (RIFI). Já para a leptospirose foi utilizada a técnica de Soroaglutinação Microscópica (MAT), mas apenas 1242 amostras de soro de vacas oriundas de 69 propriedades foram usadas na pesquisa. Os resultados revelaram que estas infecções são prevalentes em Santa Catarina, com soropositividade de 30,69% para *N. caninum*, assim como 6,44% para leptospirose. A presença e o acesso de cães às pastagens foram identificados como fator de risco para neosporose e leptospirose. A idade dos animais e a falta de diagnóstico foram relacionadas com a ocorrência da neosporose, assim como o contato de roedores com o alimento aumenta as chances de positividade para a leptospirose no rebanho estudado. Já a ocorrência de problemas reprodutivos está diretamente relacionada com a infecção nos rebanhos de leite, isto é, grande parte dos abortos e demais problemas reprodutivos ocorrem em vacas positivas para *N. caninum* e *Leptospira* spp. Por serem doenças que acarretam prejuízos econômicos medidas de controle, prevenção e de biossegurança devem ser tomadas, minimizando o impacto no setor produtivo do oeste do estado de Santa Catarina.

**avras-chave:** *Neospora caninum*. Leptospirose. Problemas reprodutivos. Bovinos  
e

**ABSTRACT**

Master's Dissertation  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Universidade do Estado de Santa Catarina

**NEOSPIROSIS AND LEPTOSPIROSIS IN DAIRY CATTLE IN THE WEST OF  
SANTA CATARINA: IDENTIFICATION OF RISK FACTORS AND CAUSE-  
EFFECT RELATION OF THE DISEASE**

AUTHOR: Juscivete Fátima Fávero  
ADVISER: Dr. Aleksandro Shaefer da Silva  
Chapecó, March, 10<sup>th</sup>, 2017

The occurrence of reproductive problems in dairy cattle is a major concern in the West of Santa Catarina state, Brazil. Abortion in various stages of pregnancy, stillbirths, infertility, metritis and retention of placental tissues are among the main problems that are often found in cases of infectious diseases. Among these diseases, neosporosis caused by *Neospora caninum* and leptospirosis caused by pathogenic species of *Leptospira* spp were subject of study in the last decades since they are an important cause of reproductive problems in cows. The West of Santa Catarina state has the largest Brazilian dairy basins, and reproductive problems are commonly reported by farmers. Therefore, this study aimed to verify the seroprevalence of *N. caninum* and *Leptospira* spp, as well as to identify the risk factors and their cause-effect relationship to these diseases in dairy cattle of the West of Santa Catarina state. For that, serum samples of 1518 cows of 72 properties were used for Indirect Immunofluorescence technique (RIFI) for neosporosis. For leptospirosis, microscopic serum-agglutination technique (MAT) was used but only on 1242 serum samples from 69 properties. The results showed that both infections are prevalent in Santa Catarina, with seropositivity of 30.69% for neosporosis, and 6.44% for leptospirosis. For both diseases, the presence of dogs and their access to cow's pasture were considered risk factors for the maintenance of the agents in the herd. The age of the animals and the lack of diagnosis were related to the occurrence of neosporosis, as well as the contact of rodents with cow's food increased the chances of positivity for leptospirosis. It was found that the occurrence of reproductive problems was directly related to the infection in dairy herds, that is, most of the abortions and other reproductive problems occurred in cows positive for *N. caninum* and *Leptospira* spp. Since these diseases may cause severe economic losses, there is a need to control, prevent using in order to minimize their impact in the productive sector of the West of Santa Catarina state.

**Keywords:** *Neospora caninum*. Leptospirosis. Reproductive problems. Dairy cattle.

**SUMÁRIO**

<b>1</b>	<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>9</b>
1.1.	Bovinocultura leiteira: doenças reprodutivas .....	9
1.2.	Neosporose .....	11
1.2.1.	Ciclo biológico .....	14
1.2.2.	Patogenia, sinais clínicos e patológicos.....	19
1.2.3.	Métodos de diagnóstico .....	22
1.2.4.	Controle e prevenção da doença.....	24
1.3.	Leptospirose .....	25
1.3.1.	Ciclo biológico .....	27
1.3.2.	Patogenia, sinais clínicos e patológicos.....	31
1.3.3.	Métodos de diagnóstico .....	33
1.3.4.	Controle e prevenção da doença.....	35
1.4.	OBJETIVOS .....	36
1.4.1.	Objetivo geral .....	36
1.4.2.	Objetivos específicos.....	36
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>37</b>
2.1.	Manuscrito I.....	38
2.2.	Manuscrito II .....	59
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>83</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>84</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>100</b>



# 1 CAPÍTULO I

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. *Bovinocultura leiteira: doenças reprodutivas*

O rebanho bovino brasileiro atingiu o ápice em 2014 com 212,3 milhões de cabeças, representando um aumento de 569 mil cabeças quando comparado com o ano anterior, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2015), levando o Brasil ao segundo lugar no ranking mundial, perdendo apenas para a Índia. Deste total, 23 milhões são fêmeas bovinas ordenhadas que participam da produção de leite nacional. Com isto, a produção de leite em 2015 chegou a 35,2 bilhões de litros, levando o Brasil a ocupar a quinta posição mundial, ficando atrás apenas da União Européia, Índia, Estados Unidos (EUA) e China (IBGE 2015; EMBRAPA 2016). Contudo no segundo trimestre de 2016, a aquisição de leite feita por estabelecimentos sob serviços de inspeção federal, estadual ou municipal, reduziu para 5,17 bilhões de litros, 8,4% menor que o trimestre anterior (IBGE, 2016). Resultados estes, atribuídos a baixas temperaturas e diminuição das chuvas nas regiões produtoras de leite, reduzindo a vegetação e aumentando os custos com outras dietas.

A região Sul passou a ocupar o primeiro lugar em nível das grandes regiões em 2014, mas Minas Gerais continua com 26,6% da produção nacional, ficando em primeiro no ranking dos estados. Santa Catarina ocupa a quinta posição no ranking nacional, ficando atrás somente do Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo (IBGE, 2016). A bovinocultura leiteira é um setor do ramo agropecuário que ocupa lugar de destaque, considerada uma fonte de renda importantíssima ao produtor, uma vez que 99% das propriedades rurais produzem leite (EMBRAPA, 2015), sendo a viabilidade da produção fator limitante para o seu crescimento. Com a ascensão da cadeia produtiva do leite as exigências sanitárias e a preocupação com a sanidade do rebanho tornaram-se essenciais no contexto da produção, uma vez que causam perdas econômicas significativas (PASQUALOTTO et al., 2015).

Muitas doenças infectocontagiosas são responsáveis por graves perdas econômicas devido a ocorrência de problemas reprodutivos no rebanho leiteiro, como abortos, natimortos, infertilidade, mastites e até mesmo levando o animal a morte

(PASQUALOTTO et al., 2015). Algumas dessas doenças também são consideradas zoonóticas, causando preocupação aos trabalhadores nas propriedades e na indústria de laticínios por ter impacto na saúde pública. Uma série de doenças infecciosas podem causar problemas reprodutivos em vacas, como neosporose, leptospirose, brucelose, rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), diarreia viral bovina (BVD), campilobacteriose, listeriose (KESHAVARZI et al., 2017; ANDERSON, 2007) entre outras afecções.

Dentre as principais causas destas manifestações clínicas e subclínicas que causam infecções em bovinos e afetam a reprodução estão os agentes *Leptospira* spp e *Neospora caninum* (HOLLER, 2012). Estes são responsáveis por desencadear a leptospirose e a neosporose nos bovinos, doenças que podem provocar distúrbios reprodutivos ou apenas tornar os animais portadores da infecção o que facilita a disseminação no rebanho (ELLIS, 1994). A principal manifestação clínica destas doenças são os quadros de aborto, sendo considerado um fator limitante para a produção, causando aumento da taxa de descarte no rebanho e desencadeando sequelas nos animais, as quais podem ser irreversíveis (GÄDICKE et al., 2013; KESHAVARZI et al., 2017). O nascimento de bezerros fracos e manifestações de mastites na leptospirose são adicionais aos custos de produção, além de gastos com doses de sêmen e tratamentos veterinários (GÄDICKE et al., 2013).

A neosporose é uma doença emergente que afeta várias espécies de animais, mas não afeta o homem, sendo considerada importante devido a sua alta prevalência em bovinos de leite no mundo todo (DUBEY et al., 2007; MCCAN et al., 2008). Já a leptospirose, é uma doença que possui importância em saúde pública, pois é considerada uma zoonose cosmopolita, com predominância em países de clima tropical, acometendo várias espécies de animais, incluindo os bovinos de leite (ELLIS, 1994). A alta prevalência destas doenças no território brasileiro indica baixa eficácia nos sistemas de controle das infecções, sejam eles programas vacinais, no caso da leptospirose ou de sistemas de manejo envolvendo descarte de animais positivos (ELLIS, 1994; MENDES et al., 2009; PASQUALOTTO et al., 2015). Cabe ressaltar a importância de conhecer o histórico de vida e reprodutivo de cada animal e do *status* sanitário do rebanho leiteiro, pois assim medidas de controle podem ser aplicadas com eficácia.

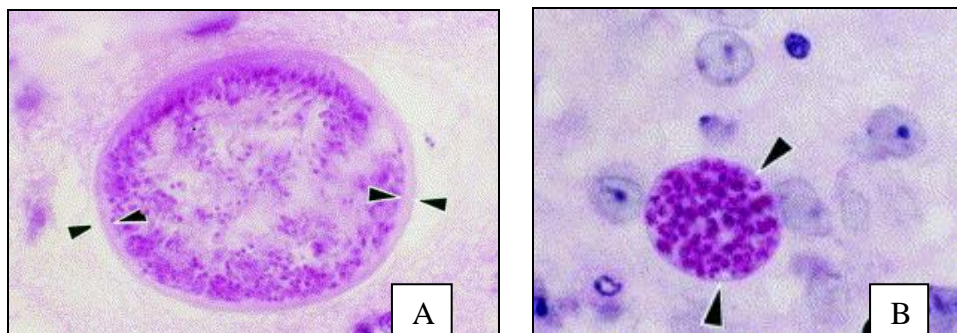
## 1.2. Neosporose

Neosporose é uma doença causada por um parasito conhecido como *Neospora caninum*. Um protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa coccida, família Sarcocystidae (HEMPHILL et al., 2000). Foi confundido com *Toxoplasma gondii* até meados de 1984 (DUBEY et al. 2002), quando a ocorrência de grave encefalomielite em cães foi diagnosticada com a presença de um protozoário estruturalmente diferenciado do *T. gondii* (BJERKÅS et al. 1988). A ausência de anticorpos para *T. gondii* nestes cães, confirmou a suspeita de um novo protozoário como sendo o responsável pela doença, meses após a morte (BJERKÅS et al., 1984), sendo então classificado como uma espécie distinta em 1988 (DUBEY et al., 1988).

Três características clínicas foram avaliadas para diferenciar *T. gondii* e *N. caninum* sendo: a paralisia dos membros posteriores a qual não foi observada em nenhuma outra espécie com diagnóstico positivo para toxoplasmose, os cistos encontrados nos tecidos morfológicamente distintos de *T. gondii* e por fim, a ausência de reação para detecção de anticorpos do *T. gondii* em teste imunohistoquímico (BJERKÅS et al., 1984). Os cistos de *N. caninum* (Fig. 1A) encontrados nos tecidos dos cães por Bjerškås et al. (1984), bem como a descrição original do parasito (DUBEY et al. 1988) se restringe a tecidos neurais, com paredes de espessura de 1-4  $\mu\text{m}$ ; já os cistos do *T. gondii* tem paredes mais finas ( $<0.5 \mu\text{m}$ ) e podem ser encontrados em vários órgãos (Fig. 1B).

Algumas diferenças fundamentais em relação ao hospedeiro natural, a antigenicidade, aos fatores de virulência e a patogênese, foram subseqüente relacionadas, distinguindo os dois parasitas (DUBEY et al. 2007; DUBEY e LINDSAY, 1996). O hospedeiro definitivo do *T. gondii* são os felídeos e a doença provocada pelo protozoário é considerada uma zoonose; já o *N. caninum* não parece ser transmitido aos humanos (MCCANN et al., 2008) e seu hospedeiro definitivo se restringe aos canídeos.

**Figura 1** - *N. caninum* (A), cistos em tecidos de cães naturalmente infectados, em cortes histológicos, comparados com cistos de *T. gondii* (B), mostrando as diferenças na espessura de parede entre eles.



Fonte: Adaptado de Dubey et al., 2002.

Em estudo subsequente, Dubey et al. (1988) propuseram que o *N. caninum* foi o responsável por provocar severa doença neuromuscular em cães após o isolamento do parasito em culturas celulares de tecidos, obtidas de filhotes infectados congenitamente, os quais desenvolveram sinais clínicos similares, como os descritos originalmente por Bjerkås et al. (1984). Nesta ocasião, observaram-se nos tecidos, cistos de parede espessa, e a realização de teste de Imunofluorescência indireta (RIFI) detectou anticorpos de *N. caninum* no soro dos cães infectados e um método imunohistoquímico posteriormente, diferenciou *N. caninum* de *T. gondii* (LINDSAY e DUBEY, 1989).

Os parasitos relatados por Bjerkås et al. (1984) e Dubey et al. (1988) foram comparados morfológicamente e histologicamente em material fixado, originário de cães infectados, demonstrando serem diferentes de qualquer outro parasito já analisado (BJERKÅS e DUBEY, 1991). Assim se descobriu um novo agente etiológico causador de doença neuromuscular em cães, e os estudos foram continuamente executados, sendo que uma década após sua descoberta, McAllister et al. (1998) descreveram a fase sexual do parasito, quando observaram oocistos de *N. caninum* em fezes de cães alimentados com tecidos contendo cistos do parasito. A partir daí, o protozoário descrito como *Neospora caninum* foi transmitido experimentalmente para outras espécies de animais, como bovinos, ovinos, caprinos, suínos, felinos e roedores. Contudo, cistos de *N. caninum* foram naturalmente encontrados nos tecidos de bovinos, ovinos, caprinos, cervos e equinos em anos subsequentes (DUBEY e LINDSAY, 1996).

A partir daí, o *N. caninum* foi alvo de estudos e isolado de vários outros tecidos de animais, sendo encontrado em amostras de sangue de European bison (*Bison bonasus bonasus*) na Polônia por Bien et al. (2010), em tecido cerebral de bezerros assintomáticos na Espanha por Rojo-Montejo et al. (2009), bem como em cérebros de fetos por Fisch et al. (2007) em Israel. Desde então, diversas pesquisas com *N. caninum* foram feitas, com a descrição de importantes informações sobre o parasito e a patogenia da doença.

A neosporose em bovinos de leite é prevalente em várias regiões brasileiras com distribuição cosmopolita nos rebanhos de leite. Sendo que a prevalência apresenta oscilação nas diferentes regiões geográficas, com registros de baixa e alta soropositividade (7,67%) no estado de Alagoas (SOUSA et al., 2012) e 50,74% em propriedades maranhenses, respectivamente (TEIXEIRA et al., 2010). A presença de cães é constante nestas propriedades facilitando a disseminação da infecção entre os bovinos; assim como a inexistência de local apropriado para o descarte de fetos abortados permite que cães e outros canídeos se infectem a partir destes tecidos (MCALLISTER et al., 1996; SOUSA et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2010). Já na região Sul, as prevalências entre os estados são similares, porém mais baixas que outras regiões, variando de 11,2% - 14,3% (CORBELLINI et al., 2002; MOORE, 2005), reforçando a presença de cães como fator de risco para a doença. A prevalência da neosporose é similar em vários países, sendo que na Colômbia um estudo desenvolvido registrou 64% de bovinos soropositivos, assim como no Uruguai, onde houve soropositividade de 60% (PULIDO-MEDELLÍN et al., 2016; KASHIWAZAKI et al., 2004), relacionando a ocorrência da infecção com o número de partos e o estado gestacional das vacas. No Reino Unido e nos Estados Unidos da América (USA), a prevalência varia de 15% a 49,2% respectivamente (TREES et al., 1994; DAVISON et al., 1999; BRICKELL et al., 2010; MCALLISTER et al., 1996; RODRIGUEZ et al., 2002). A introdução de animais positivos com diagnóstico desconhecido pode aumentar as chances de transmissão da infecção para o rebanho (RODRÍGUEZ et al., 2016), alertando para a importância do conhecimento do *status* sanitário.

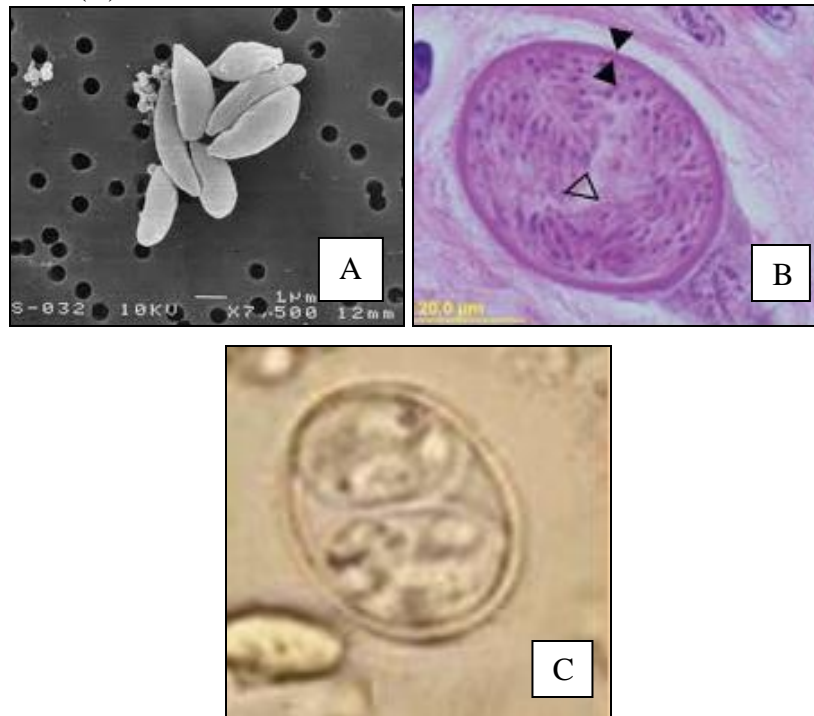
### 1.2.1. Ciclo biológico

Pesquisas realizadas por Dubey et al. (1988), Dubey e Lindsay (1996), descreveram detalhes da morfologia do *N. caninum* que é similar ao *T. gondii*, porém diferenciado biologicamente, sendo que algumas características estruturais são marcantes e o tornam particularmente único. Os taquizoítos de *N. caninum* (Fig. 2A) apresentam-se de forma ovóide, lunar ou globular, podendo medir 3-7x1-5  $\mu\text{m}$ , dependendo do estágio de divisão que se encontram. Podem parasitar várias células de hospedeiros, sendo que cada célula pode conter muitos taquizoítos inseridos no citoplasma, dentro do vacúolo parasitóforo. Os taquizoítos possuem muitas organelas, similares às encontradas nos merozoítos dos coccídeos, porém os microporos dificilmente são detectados (DUBEY et al., 1988; LINDSAY et al., 1989).

Os cistos teciduais (Fig. 2B) possuem parede de 4  $\mu\text{m}$  de espessura, onduladamente contornado, ausência de protruções, septo e tecido secundário. No interior destes cistos encontram-se os chamados bradizoítos, com morfologia alongada e núcleo subterminal, medindo aproximadamente 8x2  $\mu\text{m}$ , onde se inserem organelas, grânulos e micronemas.

Os oocistos de *N. caninum* (Fig. 2C) são encontrados nas fezes dos canídeos e seu tamanho pode variar de 11,7x11,3  $\mu\text{m}$  de comprimento, com paredes de espessura medindo 0,6–0,8  $\mu\text{m}$  e um raio de 1,04. Dentro destes se encontra dois esporocistos, medindo 8,4x6,1  $\mu\text{m}$  (7,4–9,4x5,6–6,4). Os esporocistos contém em seu interior quatro esporozoítos alongados, medindo 6,5x2,0  $\mu\text{m}$ .

**Figura 2** - Taquizoítos de *N. caninum* em cultivo celular (A); corte histológico de cisto de tecido em bezerro naturalmente infectado; (triângulo central) presença de bradizoítos (B); oocisto de *N. caninum* (C).



Fonte: [http://www.gds18.org/Neosporose/images\\_NEO/neo1.jpg](http://www.gds18.org/Neosporose/images_NEO/neo1.jpg)

Fonte: <https://www.researchgate.net/figure/8663822>

Desde a descoberta do parasito até os dias atuais, diversas pesquisas indicam que uma ampla variedade de animais (domésticos e selvagens) é exposta ao *N. caninum* diariamente no ambiente em que vivem. Contudo, em poucas espécies o *N. caninum* foi isolado viável. Baseado nisto, Dubey e Shares (2011), McAllister et al. (1998) e King et al. (2010) demonstraram que os cães domésticos e selvagens (*Canis familiaris*), dingos (*Canis lupus dingo*), bem como os coiotes (*Canis latrans*) e os lobos cinzentos (*Canis lupus lupus*) são os hospedeiros definitivos para o *N. caninum*.

Os bovinos são hospedeiros intermediários, sendo a doença vista como a maior ameaça para os bovinos de leite e em menor escala para os bovinos de corte, nas últimas três décadas (MCALLISTER et al., 1998). Hospedeiros intermediários são considerados as espécies animais a qual são infectadas somente pelo estágio assexuado do parasito (MCALLISTER et al., 1998). Estudos recentes realizados por Gondim, (2004), Dubey e Schares (2011), revelam que outras espécies de vertebrados de sangue quente podem servir como potenciais hospedeiros intermediários, contribuindo para o ciclo da transmissão. São

descritos como hospedeiros intermediários as zebras (*Equus burchelli*), búfalo africano (*Syncerus caffer*), búfalo da água, equinos e bisons (DUBEY et al., 2007), além dos bovinos, ovinos e caprinos.

O protozoário *N. caninum* é caracterizado por um complexo ciclo de vida heteroxeno facultativo elucidado há décadas por Dubey e Lindsay (1996), Dubey et al. (2007) e Dubey e Shares (2011), o qual envolve um hospedeiro definitivo, neste caso o cão, onde a replicação sexual ocorre e um hospedeiro intermediário, no qual a replicação assexuada é desencadeada.

É caracterizado por três estágios de vida infecciosos, conforme relatado por Dubey et al. (2006), iniciando com a forma de esporozoíto, os quais são encontrados em oocistos esporulados, que se dividem em taquizoítos de forma rápida e subsequente e se proliferam até a forma de bradizoítos, envoltos em cistos nos tecidos dos hospedeiros infectados. Os oocistos são a forma de vida resistente e infecciosa do parasito no ambiente, sendo eliminado através das fezes do hospedeiro definitivo. Estes são gerados através da replicação sexual que ocorre nas células epiteliais do intestino dos cães, os quais são eliminados na forma não infecciosa, sem esporulação (DUBEY et al., 2004). No ambiente, os oocistos passam por um processo de esporulação num período de 24-72 horas, onde desenvolvem dois esporocistos. Cada esporocisto abriga quatro esporozoítos em seu interior, os quais são os responsáveis por desencadear a infecção através da via oral, quando estes são ingeridos na forma esporulada (DUBEY et al., 2006, 2007).

No trato gastrointestinal do hospedeiro, os esporozoítos são liberados através do rompimento de esporocistos, onde passam a parasitar o intestino, se transformando em taquizoítos, como observado por Hemphill et al. (2006). As formas de taquizoítos tem capacidade de infectar uma variedade de células nucleadas, como as mononucleadas que provavelmente participam da disseminação desta forma parasitária do *N. caninum* através dos leucócitos (DUBEY et al., 2006; HEMPHILL et al., 2006). Após infectarem estas células, que são agora hospedeiras, os taquizoítos iniciam um processo de proliferação no interior de um vacúolo parasitóforo, que nada mais é do que um compartimento intracelular formado a partir da membrana de células hospedeiras, com modificações, as quais impedem que ocorra a fusão com vesículas da endocitose (HEMPHILL et al., 2006).



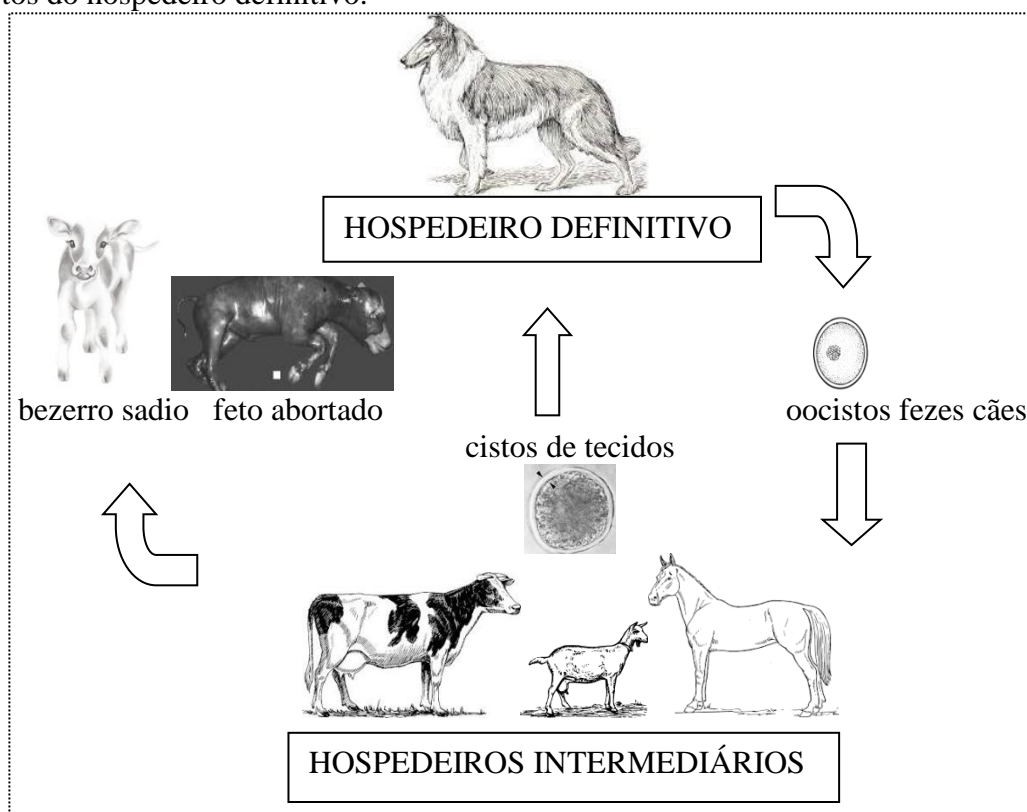
O *N. caninum* pode ser transmitido através de duas formas distintas, a forma vertical ou a horizontal, conhecida também como pós-natal, segundo Dubey et al. (2007) (Fig. 3). A transmissão transplacentária ou congênita, também conhecida como transmissão vertical, refere-se ao principal modo de transmissão da infecção em bovinos, onde ocorre recrudescência da infecção durante a gestação de uma vaca infectada cronicamente, sendo considerada a principal forma de manutenção do parasito dentro dos rebanhos bovinos, resultando em altas taxas de transmissão ao feto (WILLIAMS et al., 2009; REICHEL et al., 2013). Já a transmissão horizontal ou exógena ocorre através da ingestão de oocistos esporulados por bovinos saudáveis e está associado com a ocorrência de aborto epidêmico em vacas, conforme visto por Williams et al. (2009).

Dubey et al. (2006) relatam que uma vez adquirida a infecção por *N. caninum*, os animais se tornam infectados por toda a vida e podem disseminar a doença por gerações consecutivas aos seus descendentes. Isto se confirma através de estudo experimental, onde vacas infectadas demonstraram uma taxa de transmissão transplacentária em torno de 95%. Dubey et al. (2006, 2007) também descreveram que bezerros nascidos de vacas infectadas podem apresentar-se clinicamente normais e não infectados, mas podem vir a ser infectados durante a vida, com a ingestão de oocistos do ambiente.

Dubey e Schares (2011) e Goodswen et al. (2013) demonstraram que algumas vacas soropositivas infectam os fetos durante a gestação, mas esta infecção depende do estágio gestacional da mãe. Por exemplo, quando a infecção por *N. caninum* ou reativação de cisto tecidual ocorrer no primeiro trimestre da gestação, por volta dos 100 dias, é improvável a sobrevivência do feto, uma vez que neste período o processo de desenvolvimento de tecidos linfóides é altamente perceptível. Com isto, as chances de ocorrer reabsorção embrionária se elevam (DUBEY et al., 2007; DUBEY e SCHARES, 2011). Se a infecção ou reativação de cisto tecidual ocorrer entre o quinto e sétimo mês, as manifestações clínicas de aborto serão mais frequentes, porém neste período, o feto possui capacidade de montar uma resposta imune frente à infecção (REICHEL et al., 2013), impedindo o aborto, sem evitar a infecção. Mas se as vacas sofrerem infecção ou reativação de cisto tecidual no terceiro trimestre de gestação, quando a resposta imune do feto já está desenvolvida e a gestação for levada à termo, o bezerro nasce clinicamente sadio, porém infectado pelo *N. caninum*

(BUXTON et al., 2002; DUBEY et al., 2006) ou ainda, pode ocorrer o nascimento de bezerros saudáveis e sorologicamente negativos (GIBNEY et al., 2008).

**Figura 3** - Ciclo biológico do *N. caninum*, mostrando a transmissão vertical envolvendo hospedeiro intermediário e as possíveis consequências e a transmissão horizontal através de oocistos do hospedeiro definitivo.



Fonte: Autor, 2016.

Nos hospedeiros definitivos, a transmissão ocorre através da ingestão de tecidos, como placentas, fetos abortados de hospedeiros intermediários, os quais contêm cistos de tecidos (DUBEY et al., 2006). Dubey et al. (2007) indicam que o *N. caninum* é mantido num ciclo de vida doméstico, onde ocorre a transmissão entre cães e bovinos, mostrando a estreita relação da presença de canídeos e a incidência de bovinos positivos para neosporose nas fazendas.

Porém, alguns estudos enfatizam a possibilidade da manutenção da doença através de um ciclo de vida silvestre, envolvendo canídeos selvagens (lobos, coiotes e cães selvagens) e outras espécies de animais herbívoros, pois a detecção de alta prevalência de anticorpos e oocistos nestas espécies no norte dos Estados Unidos indica alto risco de infecção pelo parasito; assim como em bovinos de corte, onde há criação extensiva em

regiões próximas à presença de coiotes (DUBEY et al., 2013; GONDIM et al., 2004; DUBEY et al., 2007).

De acordo com a literatura, na Austrália, a realização de sorologia de exemplares de canguru cinzento ocidental (*Macropus fuliginosus ocydromus*) revelou prevalência de 18%, mostrando ser responsável pela realização do ciclo silvestre neste país (MAYBERRY et al., 2014). Através das evidências da ocorrência de infecção por *N. caninum* em várias regiões e países Europeus, bem como Americanos, onde os cães domésticos não se fazem presentes, o ciclo silvestre pode ocorrer entre canídeos selvagens e bovinos (FERROGLIO et al., 2003; GONDIM et al., 2004; HORNOK et al., 2006; MAYBERRY et al., 2014).

### 1.2.2. Patogenia, sinais clínicos e patológicos

Conforme já mencionado, o *N. caninum* infecta animais e causa doença clínica ou subclínica (PARISH et al., 1987; ASMARE et al., 2013; DUBEY et al., 1988). Os caninos podem desenvolver doença neuromuscular; já os bovinos podem desencadear problemas reprodutivos, como morte fetal, aborto, nascimento de prematuros, ou ainda déficit neurológico em bezerros, causando sérias perdas econômicas (PARISH, 1987; DUBEY, 2003; REICHEL et al., 2013) ou pode ser assintomática.

No processo agudo da infecção, os taquizoítos podem ser encontrados em uma variedade de tecidos do hospedeiro. Nesta fase, Dubey et al. (2007) mencionam que ocorre a replicação intracelular, a lise de células hospedeiras infectadas pela forma parasitária, a liberação dos taquizoítos e como consequência a infecção de células adjacentes, bem como o início de sequelas imunopatológicas que darão início a formação de possíveis lesões em alguns hospedeiros e em outros causar a doença clínica.

Num hospedeiro intermediário imunocompetente, os taquizoítos, responsáveis por desencadear o estágio agudo da neosporose passa por cerca de 20 divisões antes de se diferenciarem em bradizoítos, os quais são responsáveis pela ocorrência da cronicidade da infecção em vacas (DUBEY et al., 2006). Estes desenvolvem um estágio de vida quiescente, provocado pela pressão do sistema imune do hospedeiro, se transformando em cistos de tecido (GOODSWEN et al., 2013). Os cistos de tecidos nos hospedeiros albergam bradizoítos; sendo que fatores imunológicos facilitam a persistência do parasito a um

período mais longo que o usual e desencadeia infecções crônicas assintomáticas nestes animais (DUBEY et al., 2007; DUBEY e SCHARES, 2011).

Alguns processos de imunomodulação ou imunossupressão no animal foram evidenciados por Hemphill et al. (2006) e Williams et al. (2009), como responsáveis por promoverem mudanças no estado imunológico do hospedeiro, podendo provocar recrudescência da infecção, resultando na reativação da forma latente dos bradizoítos e convertendo-os a taquizoítos. Este fato pode ocorrer em animais em estado gestacional, onde a propagação dos taquizoítos para outros tecidos é possível, incluindo a transmissão vertical através da placenta e como consequência infecção do feto nos bovinos.

Nos hospedeiros intermediários, o *N. caninum* pode causar morte celular devido à ativa multiplicação de taquizoítos, os quais alcançam as células do hospedeiro através da corrente sanguínea e do sistema linfático (DUBEY e LINDSAY, 1996). O reconhecimento das células do hospedeiro pelo parasito se faz necessário para que a infecção seja viabilizada e instalada. Neste caso, proteínas são usadas como receptores para o parasito, as quais parecem invadir as células por meio de selagem das membranas, para então serem englobadas pela vacúolo do parasito. Destes vacúolos, taquizoítos são liberados e infectam outras células adjacentes, tornando-se assim bradizoítos, os quais tem capacidade de formar cistos teciduais podendo persistir por anos de forma assintomática nos hospedeiros (DUBEY, 2003).

Os cistos que alojam os bradizoítos em seu interior são considerados a forma infecciosa; contudo, os hospedeiros definitivos infectados podem contaminar o ambiente com excreção de oocistos nas fezes na fase aguda da infecção, os quais são a principal chave epidemiológica, tornando-se uma fonte de infecção para outras espécies animais, que ingerem água ou alimento contaminado. As formas císticas do parasito, bem como os bradizoítos que podem estar presentes nos tecidos de fetos abortados e placenta de vacas infectadas se ingeridas por caninos, podem desencadear a infecção (DUBEY e SHARES, 2011).

A infecção por *N. caninum* é conhecida pelo mundo todo, como sendo uma das principais causas de perdas econômicas no rebanho bovino, sendo a manifestação clínica de aborto, a principal forma de ocorrência nesta espécie (DUBEY et al., 2007; DUBEY e SCHARES, 2011). Os fetos abortados podem ser expelidos intactos, em processo de

autólise, ou como mumificação fetal, porém ao exame macroscópico não são observadas alterações específicas (DUBEY et al., 2006). Fetos abortados e necropsiados revelam alterações no sistema nervoso como hidrocefalia, hipoplasia do cerebelo e da medula, regiões pálidas dispersas com áreas escurecidas no cérebro, medula espinhal e coração, bem como no músculo esquelético, que histologicamente estão relacionadas com áreas sugestivas de inflamação e em processo de necrose (DUBEY et al., 2006). A placenta de fetos abortados pode apresentar características normais ou com áreas necrosadas nos cotilédones, associada à inflamação mononuclear e ocasionalmente taquizoítos arranjados de forma aglomerada no interior de trofoblastos (DUBEY et al., 2006).

A ocorrência do aborto ou morte fetal depende de fatores relacionados com os mecanismos imunológicos da vaca e do feto, bem como da presença e replicação do parasito em ambos. O parasito ao se multiplicar nos tecidos da placenta ou do feto provoca danos, os quais levam a insuficiente oxigenação e nutrição do feto, causando trombose vascular, desencadeando o aborto (DUBEY et al., 2006). A ativação do sistema imune materno, pela presença do parasito, estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico ou até mesmo prostaglandinas pela placenta, provocando os danos teciduais. Se altas respostas pro-inflamatórias ocorrem no início da gestação, os danos placentários são maiores ocorrendo deterioração da placenta e como consequência uma redução na vascularização de nutrientes ao feto, levando a morte fetal (CÁNTON et al., 2014; BUXTON et al., 2002).

Os bezerros que nascem infectados podem apresentar menor tamanho para a idade gestacional, apresentando sinais clínicos como ataxia, propriocepção reduzida e dificuldade de permanecer em estação. Assim como hiperextensão ou flexão de membros anteriores e posteriores, exoftalmia, escoliose, hidrocefalia e estreitamento da medula espinhal. As lesões características da infecção são comumente encontradas no sistema nervoso central, principalmente na medula espinhal, bem como presença de cistos nos tecidos (DUBEY et al., 2003, 2006). Cabe ressaltar que a neosporose não é considerada uma causa de infertilidade em vacas infectadas, mas a ocorrência de bezerros prematuros ou natimortos, bem como com deficiências neurológicas são achados característicos da doença (PARISH et al., 1987).

Nos canídeos, como a neosporose é uma doença neuromuscular, é comum os animais apresentarem manifestações da infecção em qualquer faixa etária; sendo atrofia muscular e hiperextensão dos membros pélvicos, fraqueza cervical e disfagia os sinais mais comuns (DUBEY et al., 2003; REICHEL et al., 2006). Os casos mais severos da doença em cães ocorrem em animais jovens infectados congenitamente (JACKSON et al., 1995). Dependendo das células parasitadas, a infecção nos cães, pode induzir a uma variedade de lesões, incluindo miocardite, polimiosite, pancreatite e pneumonia intersticial com edema, bem como alveolite (BUXTON et al., 2002).

### 1.2.3. Métodos de diagnóstico

A neosporose requer um diagnóstico diferencial de outras doenças infectocontagiosas e de possíveis causas tóxicas, que venham provocar aborto em bovinos, sendo importante avaliar a localização geográfica do rebanho. A melhor forma de iniciar um diagnóstico referente a manifestações de casos de aborto é um exame geral, com redobrada atenção, desde a mais simples até a mais complexa causa possível do aborto (MCALLISTER, 2016).

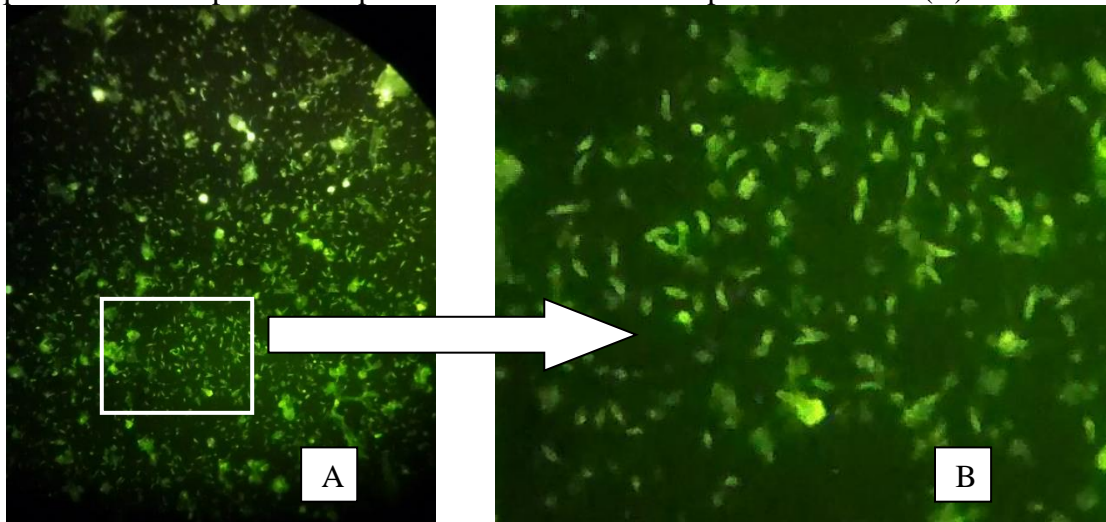
O diagnóstico de neosporose pode ser realizado através do uso de análise sorológica das fêmeas, com intuito de detectar evidências de patógenos específicos; ou pela necropsia de fetos abortados. As pesquisas sorológicas têm como vantagem a facilidade para o *start* inicial do diagnóstico, auxiliando na investigação (DIJKSTRA et al., 2001), porém a metodologia apresenta limitação na identificação de distintos patógenos. Por outro lado, o exame de fetos abortados prevê ser a melhor ferramenta para detectar uma variedade de problemas responsáveis por causar abortos, contudo a dificuldade em encontrar fetos em condições apropriadas para o manuseio, bem como o transporte, torna esta técnica desvantajosa e muito pouco usada (MCALLISTER, 2016).

Em bovinos, a infecção por *N. caninum* é primariamente diagnosticada por sorologia, sendo detectados anticorpos específicos em amostras de soro, plasma ou leite (ALVAREZ-GARCIA et al., 2013). Os métodos de avaliação sorológica incluem a imunofluorescência indireta (RIFI) descrito por Conrad et al. (1993) e Moré et al. (2009),

ensaio de imun absorção enzimático (ELISA) (DUBEY e SCHARES, 2006), entre outros menos utilizados.

A técnica de RIFI baseia-se no princípio de detectar a presença de anticorpos no soro dos animais, usando a fluoresceína como um marcador, sendo possível a visualização total da membrana do parasito fluorescente, o que caracteriza o diagnóstico positivo para neosporose (Fig. 4). É o método usado como referência para o sorodiagnóstico da infecção por *N. caninum* no Brasil, porém é considerada uma técnica trabalhosa e onerosa. A interpretação dos resultados é subjetiva, podendo existir variações nos resultados, dependendo do leitor (CONRAD et al., 1993).

**Figura 4** - Visualização ao microscópico de fluorescência na amplitude de 100x de amostra positiva para *Neospora caninum* (A); ampliação da lâmina de RIFI com visualização de taquizoítos com superfície corpórea totalmente recoberta por fluoresceína (B).



Fonte: o autor

O teste de ELISA é selecionado sempre que se deseja rastrear anticorpos de *N. caninum* em nível de rebanho. Este método tem o princípio de detectar os primeiros anticorpos produzidos após a infecção com menor afinidade para o antígeno, do que os produzidos tardiamente (AGUADO-MARTÍNEZ et al., 2008). Sendo assim, não é uma técnica selecionável para diagnóstico individual e clínico dos animais.

Outras técnicas consideradas alternativas, também são utilizadas, sendo que estas objetivam a detecção do DNA do parasito em amostras de sangue ou do sêmen de machos através da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Esta técnica é altamente sensível e

específica e pode ser utilizada em amostras de tecidos, sangue e fluidos corporais (DUBEY et al., 2007; DUBEY e SCHARES, 2011), mas é utilizada somente em pesquisas.

#### 1.2.4. Controle e prevenção da doença

Os bovinos de leite apresentam uma maior soroprevalência (REICHEL et al., 2013), com perdas econômicas duas vezes maiores que no rebanho de corte, sendo que do total de perdas nas propriedades, a neosporose é responsável por 64,9%. E, portanto, atinge uma média estimada em torno de \$ 1.298,3 milhões/ano, com variações entre \$ 633,4 mil a 2.380,1 milhões (REICHEL et al., 2013). O maior alarmante de perdas ocorre em função da necessidade de substituição de animais produtivos, que apresentam manifestações clínicas de aborto ou ainda de vacas soropositivas, que necessitam serem descartadas. Em bovinos de leite, os custos são calculados através do valor zootécnico do animal, subtraindo o valor de carcaça obtido na venda, chegando assim, ao valor estimado do aborto. No rebanho de corte, a estimativa de perdas é feita em função da substituição de bezerros produtivos (REICHEL et al., 2013).

Em vários países, o impacto econômico da infecção pelo *N. caninum* apresenta variações em valores, em virtude da prevalência da doença no rebanho e da aptidão dos bovinos. No Brasil, a média nacional estimada de perdas econômicas para os produtores de leite, gira em torno de US \$ 51,3 milhões por ano (Reichel et al., 2013), similarmente às perdas ocorridas na Argentina e na Nova Zelândia (US \$ 38,5 milhões e US \$35.7 milhões), alertando para a urgência na aplicação de métodos de controle efetivos para a neosporose (MOORE et al., 2009; REICHEL et al., 2013).

Estratégias de controle têm sido propostas com o intuito de minimizar perdas reprodutivas com a neosporose nos bovinos. As técnicas visam a minimizar os fatores de risco relacionados com a manutenção da doença no rebanho e o surgimento de novos casos. As pesquisas demonstram que impedir a presença e a restrição do acesso de cães a depósito de alimento, bem como pastagens, e fontes de água, evita a contaminação destes por oocistos, reduzindo a ocorrência da transmissão horizontal (REICHEL et al., 2006; MCALLISTER, 2016; MAZUZ et al., 2014; ASMARE et al., 2013).



A ingestão de fetos e restos de placenta de bovinos pelos cães são fatores de risco para infecção, portanto a quebra deste círculo vicioso impede que os cães se tornem hospedeiros definitivos para o *N. caninum*. O descarte de vacas sorologicamente positivas do rebanho e sua prole, bem como o uso de biotécnicas de reprodução, como transferência de embriões, seria sugestivo de controle para a neosporose (DIJKSTRA et al., 2001; MCALLISTER, 2016). No entanto, com a alta prevalência nas propriedades, é inviável o descarte dos animais e muitos produtores não atendem esta recomendação. Contudo, estudos revelam que estas estratégias de controle somente são economicamente viáveis quando no rebanho monitorado, existir uma soroprevalência média inferior a 18-21% (REICHEL e ELLIS, 2006). Isto se deve aos altos custos com sorologia e gastos com renovação do rebanho produtivo.

Muitos países adotam programas de controle, em nível nacional, para reduzir o impacto da infecção por *N. caninum* no rebanho leiteiro. O objetivo destes programas é identificar o nível de infecção dos bovinos nas fazendas, através de testes sorológicos, assim como monitorar a situação epidemiológica nas distintas regiões geográficas. Estes programas estão estabelecidos no Reino Unido, na Irlanda, nos Países Baixos, Espanha e na Suíça. Através dos resultados de levantamentos sorológicos, são adotados manejos que visam minimizar a neosporose bovina, incluindo métodos para prevenir a transmissão horizontal e vertical (GUIDO et al., 2016).

### 1.3. *Leptospirose*

Leptospirose é conhecida mundialmente como uma das mais importantes doenças zoonóticas, sendo endêmica e relatada como re-emergente em vários países (LANGSTON et al. 2003), inclusive no Brasil (SILVA et al., 2012). É causada por espécies patogênicas de *Leptospira* spp (CÔRTEZ, 1993). A maior prevalência da doença é observada em países onde o clima predominante é tropical e subtropical, devido a melhor sobrevivência das leptospiras em ambiente quente e úmido ou em período de altos índices pluviométricos (THIERMANN, 1984; LEVETT, 2001; ADLER et al., 2010). Uma grande variedade de animais domésticos e selvagens é acometida pela infecção sendo considerada uma doença

ocupacional no homem. Mas as mudanças na globalização colocam a população humana em risco iminente à exposição ao agente infeccioso (BHARTI et al., 2003).

O agente causador da leptospirose são bactérias do gênero *Letospira* spp as quais são divididas em 21 espécies distintas, sendo conhecidos mais de 300 sorovares, agrupados em 20 sorogrupos (CERQUEIRA e PICARDEAU, 2009; SAITO et al., 2013). Esta classificação é devida às diferenças antigênicas encontradas entre eles. As leptospirosas patogênicas possuem como principal hospedeiro, os roedores, mas outras espécies animais como bovinos, equinos, caninos, suínos e também animais silvestres servem de reservatório para o agente (FAINE et al., 1999; MONTE et al., 2013). Nos bovinos, a leptospirose tem sido considerada uma das doenças infectocontagiosas mais importantes, devido ao impacto econômico negativo, interferindo na reprodução, com a ocorrência de abortos, morte embrionária, natimortos, infertilidade e até mesmo a morte dos animais (ADLER et al., 2010). Isso resulta em perdas econômicas diretas, as quais também estão relacionadas com queda na produção de leite e redução na taxa de crescimento, bem como custos indiretos oriundos de gastos com medicamentos e assistência de médicos veterinários (FAINE et al. 1999; FÁVERO et al., 2002; ADLER et al., 2010). Os bovinos são considerados uma das espécies com maior importância na epidemiologia servindo como reservatório dos sorovares de leptospirosas (RADOSTITIS et al., 2007).

A doença é facilmente transmitida através do contato direto ou indireto com solo, água, fluidos fetais, bem como urina ou outros materiais contaminados com urina dos animais infectados (RADOSTITIS et al., 2007). Conforme Adler et al. (2010), as leptospirosas penetram através da pele que apresenta soluções de continuidade ou através da mucosa, desencadeando uma infecção sistêmica no animal pela disseminação hematogênica do agente, colonizando assim vários órgãos, com predileção dos rins e fígado (ADLER et al., 2010).

Frequentemente na espécie bovina, a leptospirose apresenta-se como uma infecção subclínica, com a manifestação de pouco ou nenhum sinal clínico característico da doença. Com isto o diagnóstico se torna difícil, sendo necessária a utilização de diferentes métodos sorológicos e de cultura bacteriana para a identificação da infecção por leptospirose (ADLER et al., 2010).

A disseminação da leptospirose ocorre no mundo todo com oscilações na prevalência, devido a diferentes regiões geográficas com variações nas estações chuvosas, umidade e clima (ELLIS, 1984). No Brasil há delimitações territoriais quanto a estas características, sendo que os bovinos leiteiros encontrados nas regiões Nordeste e Centro-oeste apresentam as maiores sororeatividades para *Leptospira* spp (98,8%) (FIGUEIREDO et al., 2009). Fatores epidemiológicos, como os mencionados, foram confirmados por Fávero et al. (2001) que encontraram baixa prevalência em Santa Catarina (25,2%), havendo ainda interferência de diferentes densidades de rebanhos. A ocorrência da leptospirose foi também verificada nos bovinos de leite do Peru (2,6%) e em outros países, como no Chile, onde mais de 70% dos rebanhos leiteiros apresentaram-se reativos a algum sorovar de *Leptospira* spp (ARIAS et al., 2011; SALGADO et al., 2014).

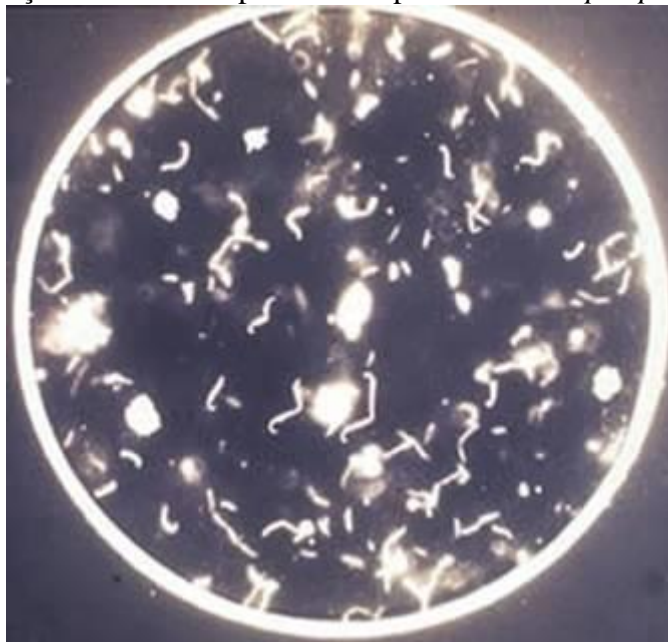
### 1.3.1.Ciclo biológico

O agente etiológico da leptospirose são leptospiras, pertencentes ao filo das espiroquetas (Fig. 5). Estas são conhecidas por ser um grupo de bactérias que divergiram do grupo tradicional através de eventos evolutivos, apresentando característica morfológica única (PASTER et al., 1991). São pertencentes à família Leptospiraceae do gênero *Leptospira* e subdividido em duas espécies, as quais podem ser classificadas em patogênicas e saprófitas (DIKKEN et al., 1978; TERPSTRA, 1992).

O genoma leptospiral é comparado com outras espiroquetas existentes, como o *Treponema* spp e *Borrelia* spp, justificando a habilidade de sobrevivência que a *Leptospira* spp possui no meio ambiente e nos hospedeiros (DE LA PENA-MOCTEZUMA, 1999). As espiroquetas de leptospiras são obrigatoriamente aeróbicas e tem alta capacidade de mobilidade, pois a morfologia celular se assemelha ao formato de uma hélice cilíndrica, com diâmetro de 0,01-0,02  $\mu\text{m}$ , permitindo um movimento helicoidal ao redor do seu eixo, assim como possui um órgão locomotor interno, conhecido por endoflagelo, o qual permite grande motilidade, em diferentes meios (CERQUEIRA e PICARDEAU, 2009). Os tamanhos das espiroquetas são variáveis, isto é, entre 0,25 x 6-25  $\mu\text{m}$  e com capacidade para atravessar barreiras de até 0,45  $\mu\text{m}$  (HOVIND-HOUGEN, 1976). As leptospiras tem

ótimo crescimento em temperaturas entre 28°C e 30°C e são bactérias do grupo catalases e oxidase positiva (FAINE et al., 1999).

**Figura 5** – Visualização em microscópico de campo escuro de *Leptospira interrogans*



Fonte: <http://www.austinncc.edu/microbio/2704x/li.htm>

O sistema de nomenclatura dos sorogrupos de *Leptospiras* spp não está relacionado com a posição taxonômica, mas presume-se a determinação do sorogrupo através de testes sorológicos, tendo este valor epidemiológico. Contudo, em pacientes humanos, respostas sorológicas apresentam pouca relação com o sorovar infectante quando testado individualmente (ADLER, 2010).

De acordo com a similaridade da relação do DNA e da patogenicidade de cada espécie, as leptospiros foram classificadas em três grupos. Estes compreendem seis espécies saprófitas, conhecidas como cepas ou sorovares ambientais não patogênicas; nove espécies patogênicas, que envolvem as cepas isoladas de humanos ou de animais e somente cinco espécies que são chamadas de intermediárias, as quais a virulência das cepas não foi reproduzida em estudos experimentais até o momento (Tabela I) (CERQUEIRA e PICARDEAU, 2009; ADLER et al., 2010).

Esta classificação coexiste com uma classificação sorológica onde os antissoros são usados para estabelecer relação antigênica entre os sorovares isolados (DIKKEN et al.,

1978). As cepas de *Leptospiras* spp são identificadas pelo seu sorovar de referência. Muitos sorovares já estudados são referenciados por apenas uma estirpe, mas pode aumentar à medida que novos estudos são realizados e assim, mais estirpes podem ser relacionadas (LEVETT, 2001).

Tabela I - Relação das espécies de leptospiras e divisão dos grupos com suas cepas.

<b>ESPÉCIES</b>	<b>SOROGRUPOS</b>	<b>CEPAS</b>
<b>Patogênicas</b>		
<i>L. interrogans</i>	Icterohemorrhagiae	Copenhagi
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe
<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni
<i>L. santarosai</i>	Tarassovi	Atlantae
<i>L. alexanderi</i>	Manhao	Manhao
<i>L. alstonii</i>	Não determinado	Sichuan
<i>L. kmetyi</i>	Não determinado	Não determinado
<b>Intermediárias</b>		
<i>L. wolffii</i>	Não determinado	Não determinado
<i>L. licerasiae</i>	Não determinado	Varillal
<i>L. inadai</i>	Tarassovi	Kaup
<i>L. fainei</i>	Hurstbridge	Hurstbridge
<i>L. broomii</i>	Undesignated	Não determinado
<b>Saprófitas</b>		
<i>L. wolbachii</i>	Codice	Codice
<i>L. meyeri</i>	Semaranga	Semaranga
<i>L. biflexa</i>	Semaranga	Patoc
<i>L. vanthielii</i>	Holland	Holland
<i>L. terpstrae</i>	Não determinado	Não determinado
<i>L. yanagawae</i>	Semaranga	Saopaulo

Fonte: Adaptada de Ajay et al. (2003).

A leptospirose é uma doença encontrada no mundo todo, seja em áreas urbanas ou rurais, devido a presença de reservatórios, que na maioria das vezes são animais domésticos ou selvagens (Tabela II). Em alguns animais reservatórios, a doença se apresenta assintomática, como nos ratos. Nesta espécie a doença se apresenta crônica com persistente colonização dos túbulos renais proximais pelas leptospiras, sendo excretadas no ambiente através da urina, contaminando-o. A excreção pode ser intermitente ou contínua, sendo que as leptospiras não sobrevivem em urina ácida (ADLER et al., 2010).

Segundo Adler et al. (2010), nos bovinos a leptospirose é frequentemente causada pelo sorovar *Hardjo*, incluindo a *L. borgpetersenii* sorogrupo hardjobovis e a *L. interrogans* sorogrupo hardjoprajitano, mas outros sorovares podem estar envolvidos na infecção, como *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Pomona*, *Bratislava* e *Grippotyphosa* (FAINE et al., 1999).

Tabela II - Sorovares de letospiras e seus principais reservatórios.

<b>RESERVATÓRIO</b>	<b>SOROVAR</b>
Suíno	<i>Pomona, Tarassovi</i>
Bovinos	<i>Hardjo, Pomona</i>
Horses	<i>Bratislava</i>
Caninos	<i>Canícola</i>
Ovinos	<i>Hardjo</i>
Ratos	<i>Icterohemorrhagiae, Copenhageni</i>

Fonte: Adaptada de Ajay et al. (2003).

A transmissão das leptospiras para o humano e outros animais, se dá por via direta, onde ocorre o contato com a urina, sangue ou ainda tecidos de animais infectados, bem como ambiente contaminado, penetrando na pele com escoriações ou pela mucosa intacta (FAINE et al., 1999; PICARDEAU, 2013). Os sorovares encontrados nos animais considerados reservatórios de manutenção, são geralmente associados a uma espécie animal específica. Por exemplo, os ratos são hospedeiros do sorovar *Icterohemorrhagiae*; a *Leptospira* sorovar *Hardjo* é adaptada aos bovinos, sendo estes considerados hospedeiros

de manutenção e tem grande importância na transmissão de bovino para bovino; os canídeos abrigam o sorovar *Canicola* (ELLIS, 1994; PICARDEAU, 2013).

As leptospirosas são muito sensíveis a ambientes secos e pH próximo ao neutro, mas estudos revelam que algumas espécies patogênicas podem sobreviver em ambientes alagadiços por até 30 dias, associando a ocorrência de casos de leptospirose em épocas chuvosas (PICARDEAU, 2013).

As leptospirosas possuem grande biodiversidade ambiental, sendo largamente afetada pela região geográfica, pelo clima e interações bióticas existentes. Estas diferenças afetam a transmissão da leptospirose pela modificação da população biológica, do comportamento ou da comunidade das espiroquetas e seus hospedeiros (LEVETT et al., 1998; MATTHIAS e LEVETT, 2002).

### 1.3.2. Patogenia, sinais clínicos e patológicos

Como mencionado, o agente causador da leptospirose são as espiroquetas de *Leptospira*, que após invadirem o corpo atingem a corrente sanguínea e se espalham pelo organismo desencadeando uma fase de bacteremia com duração de poucas horas até sete dias. Nesta fase, as leptospirosas presentes no sangue e nos tecidos se multiplicam, atingindo um nível crítico, provocando lesões devido à ação proveniente de toxinas leptospirais ou ainda de células remanescentes de leptospirosas (ELLIS, 1994; DE BRITO et al., 1992), culminando com o aparecimento dos sinais clínicos. Este estágio é conhecido como fase aguda, onde quadros de piroxia são observados, bem como excreção de leptospirosas ou ainda animais assintomáticos (ELLIS, 1994).

As lesões primárias provenientes da infecção se dão nos pequenos vasos, provocando dano no endotélio, levando a uma isquemia localizada nos órgãos afetados. Dependendo do órgão afetado pode ocorrer necrose tubular, como nos rins, dano nas células hepáticas e pulmonares, bem como quadros de miosite e placentite. As leptospirosas colonizam e persistem em vários órgãos após o quadro de bacteremia principalmente nos túbulos renais e no trato genital feminino. Em alguns casos a ocorrência de hemorragias leva a quadros ictericos, com diminuição acentuada no número de plaquetas (ELLIS, 1994; ADLER et al., 2010).

Uma vez as leptospiros presentes na circulação, a linha de defesa de anticorpos é acionada, removendo-as do sangue e dos tecidos por um processo de opsonofagocitose, podendo durar de quatro a 30 dias (LEVETT et al., 2001). Se o causador do dano tecidual persistir com severidade, podem ocorrer complicações, observadas como cicatrizes nos rins dos suínos e cães, vistos macroscopicamente como pontos brancos nestes órgãos (ADLER et al., 2010).

As leptospiros são excretadas pela urina por um período variável, sendo esta uma via importante de manutenção da doença. O tempo de excreção depende da idade do animal infectado e do sorovar. O sorovar *Hardjo* pode ser eliminado da urina de bovinos por até 542 dias e possivelmente pelo resto da vida do animal (THIERMANN, 1982). Em vacas gestantes, infectadas por leptospirose, as leptospiros podem permanecer no útero por até 142 dias, infectando o feto e causando danos reprodutivos, eliminando leptospiros por até oito dias após o parto através de descargas uterinas. Em vacas vazias, as leptospiros podem ser encontradas por até 97 dias no trato genital feminino, após serem infectadas, tornando-se fonte de infecção para o rebanho (THIERMANN, 1982).

Nos bovinos, a leptospirose é uma das doenças responsáveis pela maior causa de aborto, sendo uma manifestação crônica da doença em bovinos adultos e frequentemente um dos únicos sinais clínicos observados no rebanho (ELLIS, 1994). A *Leptospira Interrogans* sorovar *Hardjo* e *Pomona* estão associados com as maiores taxas de ocorrência de abortos nesta espécie, embora em alguns casos os sorovares *Grippotyphosa* e *Icterohaemorrhagiae* têm sido responsáveis por abortos (RADOSTISTIS et al., 2007).

Os sinais clínicos de infecção aguda por leptospirose nos bovinos envolvem quadros de febre, anemia hemolítica, hemoglobinúria, icterícia e alta mortalidade em bovinos jovens. Em vacas adultas e produtivas podem ocorrer casos de mastite associados a secreções de leite com sangue e espesso, bem como quadros de agalactia (RADOSTISTIS, 2007; ELLIS, 1994; ADLER e DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

As manifestações de aborto podem ocorrer em vários estágios de gestação, dependendo da infecção inicial. Se a vaca se infectar pelo sorovar *Hardjo*, as ocorrências de aborto acontecem no primeiro trimestre de gestação. Já abortos no primeiro semestre são vistos em vacas infectadas pelo sorovar *Pomona*. A infecção por *L. Hardjo* está associada com infertilidade e abortos a partir dos quatro meses de gestação, bem como a incidência de



nascimento de bezerros fracos. Os abortos ocorridos no último trimestre de gestação são devidos à infecção por *L. Pomona*. O nascimento de bezerros fracos, prematuros ou natimortos pode ocorrer na fase crônica da infecção, sendo que o surgimento desta ocorre de uma a 12 semanas após a fase aguda. Geralmente, estes animais não apresentam manifestações clínicas na fase aguda da doença (ELLIS, 1994).

Os fetos abortados devido à leptospirose, independente do estágio de gestação, apresentam-se macroscopicamente autolisados e ictéricos (quando infectados por *L. Pomona*). No exame histológico raramente são observadas alterações, porém nefrite intersticial e necrose tubular renal podem ser observadas em alguns casos (YAEGER e HOLLER, 2007).

Todas as espécies envolvidas em infecção por leptospirose podem desenvolver quadros de desordens reprodutivas, mas em equinos frequentemente são observados quadros de uveíte (PICARDEAU, 2013). Além disso, nos humanos, a leptospirose está associada à de cabeça e mialgia, bem como desordens de caráter reprodutivo (BHARTI et al., 2003).

### 1.3.3. Métodos de diagnóstico

As leptospirosas são bactérias muito adaptáveis e difíceis de serem cultivadas, portanto, as rotinas de diagnóstico são impraticáveis como, por exemplo, o isolamento bacteriano (PICARDEAU et al., 2013). Algumas formas de diagnóstico são preconizadas tais como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (AHMED et al., 2009), o teste de aglutinação microscópica (MAT) (MARTIN et al., 1918), que é o mais utilizado, segundo Limmathurotsakul et al. (2012), e o ensaio imunoenzimático ligado a IgM (ELISA) (CERQUEIRA e PICARDEAU 2009).

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido amplamente utilizada nos últimos anos para o diagnóstico de leptospirose devido a sensibilidade e a capacidade de obtenção de um diagnóstico precoce. Um teste positivo para PCR revela a presença de leptospirosas patogênicas na amostra testada, mas em nenhum caso é capaz de identificar o sorovar da leptospirose (MERIEN et al., 2006). Esta técnica detecta antígenos de

leptospirose no sangue por um período curto após a infecção, ou seja, no primeiro estágio da doença ou na fase de bacteremia (PICARDEAU, 2013).

Já a sorologia é o teste usado com mais frequência no diagnóstico para leptospirose. O teste considerado como referência atualmente é o teste de aglutinação microscópica (MAT), devido a sua alta sensibilidade e especificidade, desenvolvido pelo Instituto de Pasteur (MARTIN et al., 1918; CUMBERLAND et al., 1999). Esta técnica é considerada cara e requer treinamento de pessoal especializado para desenvolvê-la, sendo limitante como um indicador epidemiológico. A detecção de títulos de anticorpos de leptospiras se dá tardiamente, após a bacteremia da infecção, a qual ocorre em torno de sete a dez dias (PICARDEAU, 2013). Através do uso do soro, o MAT é capaz de detectar graus de aglutinação de anticorpos de leptospiras vivas. O princípio do teste consiste em incubar várias diluições de amostras de soro com diferentes cepas de leptospiras. A amostra será considerada positiva somente se 50% das leptospiras, após a diluição, sofrerem aglutinação, quando comparadas com o antígeno controle, este sem o soro. Várias titulações são permitidas, mas em áreas endêmicas, são utilizadas as variações 1/100 - 1/400 (KUSUM et al., 2005), sendo as variações de titulação de 1/100 ou 1/200 correspondentes a uma prévia infecção por leptospirose ou a resposta vacinal. Neste caso é necessário o uso de técnica adicional, como o ensaio imunoenzimático ligado a IgM (ELISA) para diferenciar infecção de resposta vacinal (PICARDEAU, 2013). Para confirmar um diagnóstico de leptospirose pela técnica de MAT é necessário amostragens com intervalos de duas semanas, onde haverá soro-conversão ou aumento significativo nos títulos de anticorpos (PICARDEAU, 2013).

De acordo com a literatura, o ensaio imunoenzimático ligado a IgM (ELISA) é um método amplamente utilizado para o diagnóstico de leptospirose, porém com variabilidade na especificidade e na sensibilidade (EFFLER et al., 2002; BLACKSELL et al., 2006; DESAKORN et al., 2012). O teste se baseia na detecção de anticorpos frente à totalidade de leptospiras nas amostras. Um resultado positivo para ELISA não é capaz de indicar o sorovar/sorogrupo infectivo e não é suficiente para um diagnóstico definitivo, sendo necessário o uso de outras técnicas como o MAT, PCR ou até mesmo cultura para confirmar (PICARDEAU, 2013).

#### 1.3.4. Controle e prevenção da doença

É de suma importância que cada produtor conheça o *status* sanitário de sua propriedade, para com isto, lançar mão de medidas que venham a minimizar ou controlar as mais diversas doenças que acometem o rebanho leiteiro. O conhecimento dos fatores de risco relacionados à manutenção e a incidência de novos casos de leptospirose bovina nas propriedades é primordial, sendo que a compra de animais e a presença de outros ruminantes, tem sido considerado fator primordial por Williams e Winden (2014).

A prevenção da leptospirose no rebanho bovino é um desafio a ser descoberto, pois o controle, porém não totalmente efetivo, se restringe a vacinação e tratamento de casos positivos. Conforme Cardwel et al. (2016), as medidas de biossegurança e de manejo sanitário podem auxiliar no processo de minimizar os fatores de risco, porém não impedem que a leptospirose esteja presente, devido a seus reservatórios.

As medidas poderiam envolver a restrição do acesso de outros animais a fontes de água ou alimento dos bovinos; evitar o contato com outras espécies animais, evitando assim a contaminação do ambiente com leptospiras excretadas pela urina dos animais infectados, porém estas medidas não mostraram significância (CARDWELL et al., 2016).

As vacinas anti-leptospiras disponíveis no mercado global são bacterinas inativadas, conjugadas ou não, que possuem proteção dirigida ao antígeno LPS das *Leptospira* spp (NAIMAN et al., 2001), sendo soroespecíficas, e com potencial para desencadear uma resposta imune no animal semelhante à infecção natural por leptospiras (LEVETT et al., 2001; ADLER et al., 2010).

A prevenção da infecção por leptospiras através da vacina é muito limitada, mas as vacinas inativadas podem prevenir a excreção urinária de leptospiras, diminuindo o risco de novas infecções, conforme observado por André-Fontaine et al. (2003). As vacinas são parcialmente efetivas devido a uma indução de imunidade restrita a natureza do sorovar da vacina e a existência de outros sorovares no espaço geográfico, diferentes dos compostos na vacina, gerando um desafio de infecção ao rebanho.

Cardwell et al. (2016) demonstrou que, mesmo após a adoção de medidas de biossegurança em propriedades, a vacina não apresentou efeito protetivo frente a *L. Hardjo*. Com isto, se observa que o sucesso de um programa vacinal depende da

continuidade de estudos epidemiológicos numa população, avaliando a incidência de novos sorovares (WANG et al., 2007).

#### 1.4.OBJETIVOS

##### 1.4.1.Objetivo geral

Identificar os fatores de risco que contribuem para a prevalência e a disseminação da neosporose e da leptospirose nos rebanhos de bovinos de leite, bem como o surgimento de novos casos. Verificar a relação causa-efeito provocada por estas doenças nos bovinos soropositivos em propriedades leiteiras do Oeste de Santa Catarina, Brasil.

##### 1.4.2.Objetivos específicos

- Identificar os fatores de risco relacionados com a manutenção da neosporose e da leptospirose nas propriedades;
- Relacionar com os problemas reprodutivos relatados nos animais;
- Identificar a relação entre causa-efeito das doenças nos bovinos de leite.

## **CAPÍTULO II**

### **MANUSCRITO**

Os resultados desta dissertação estão apresentados na forma de um (01) manuscrito e um (01) artigo, com sua formatação de acordo com as orientações da revista: *Microbial Pathogenesis* para o Manuscrito I, e para o artigo II, sendo este aceito para publicação.

2.1. *Manuscrito I*

**Risk factors for *Neospora caninum* infection in dairy cattle and their possible cause-effect relation for disease**

Autores: Juscivete Fátima Fávero, Gabriela Campigotto, Gustavo Machado, Ricardo E. Mendes, Luiz Daniel de Barros, João Luiz Garcia, Fernanda F. Vogel, Lenita M. Stefani, Aleksandro S. da Silva.

De acordo com normas para publicação em:  
Microbial pathogenesis

1     **Risk factors for *Neospora caninum* infection in dairy cattle and their possible cause-**  
2   **effect relation for disease**

3  
4  
5     Juscivete F. Fávero<sup>a,b,g</sup>, Gabriela Campigotto<sup>a</sup>, Gustavo Machado<sup>c</sup>, Ricardo E. Mendes, Luiz  
6     Daniel de Barros<sup>d</sup>, João Luis Garcia<sup>d</sup>, Fernanda F. Vogel<sup>e</sup>, Lenita M, Stefani<sup>a,b</sup>, Aleksandro  
7   S. Da Silva<sup>a,b\*</sup>

8  
9     <sup>a</sup>Graduate Program in Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina  
10     (UDESC), Chapecó, Santa Catarina (SC), Brazil.

11     <sup>b</sup>Department of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC),  
12     Chapecó, Santa Catarina (SC), Brazil.

13     <sup>c</sup>Department of Veterinary Population Medicine, College of Veterinary Medicine,  
14     University of Minnesota, USA.

15     <sup>d</sup>Department of Preventive Veterinary Medicine, Universidade Estadual de Londrina  
16     (UEL), Londrina, Paraná (PR), Brazil.

17     <sup>e</sup>Department of Preventive Veterinary Medicine, Universidade Federal de Santa Maria  
18     (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul (RS), Brazil.

19     <sup>g</sup>Bolsista FUMDES/UNIEDU

20  
21     \* Author for correspondence: Phone: 55 49 2049-9560. E-mail:  
22     [dasilva.aleksandro@gmail.com](mailto:dasilva.aleksandro@gmail.com).

23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

32 **ABSTRACT**

33 *Neospora caninum* causes reproductive problems in cattle, such as abortion, premature  
34 birth, retention of fetal membranes, and metritis. Therefore, this study aimed to verify  
35 possible risk factors for *N. caninum* infection in dairy cattle and their cause-effect relation  
36 to neosporosis. Serum samples of 1518 dairy cows from the West of Santa Catarina State,  
37 Southern Brazil were analyzed by indirect immunofluorescence assay (IFA) for *N.*  
38 *caninum*, where 466 were found to be positive (30.69%-CI<sub>95%</sub>; 28.3-33.0). In addition, an  
39 epidemiological survey was conducted in order to verify possible risk factors for  
40 neosporosis and their relationship to the disease. The presence of dogs in the farm was  
41 strongly associated with IFA positive results, and lack of history for neosporosis in the farm  
42 increased the chances of positivity in 66%. It was found a significant cause-effect relation  
43 between the occurrence of reproductive problems and the number of time this same  
44 problem had occurred related to the presence of antibodies to *N. caninum* (p=0.05). It is  
45 possible to conclude that *N. caninum* is widely distributed in dairy farms of the Western  
46 part of Santa Catarina state, Brazil, the occurrence of reproductive problems is directly  
47 related to the disease, and the presence of dogs is a risk factor for *N. caninum* infection.

48

49 **Key words:** dairy cattle, dog, neosporosis, reproductive problem, risk factor

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62



## 63 INTRODUCTION

64 *Neospora caninum* is an obligate intracellular protozoan of the Apicomplex phylum  
65 that infects domestic and wild animals [1]. It was discovered in 1984 in canids, known  
66 definitive hosts of this parasite [2, 3] and up to 1988 *N. caninum* used to be **confused** with a  
67 closely related parasite *Toxoplasma gondii* [4]. In subsequent research, some differences  
68 were identified distinguishing the two parasites: intermediate hosts, virulence factors and  
69 pathogenesis [5]. However, in 1988 researchers were able to describe *N. caninum* as a new  
70 parasitic species [4]. *Neospora caninum* cause clinical disease in canids [6], and in dairy  
71 and beef cattle may lead to reproductive problems, such as abortion, causing economic  
72 losses in many countries of South America [7]. A study conducted by López-Gatius [8] has  
73 indicated that *N. caninum* seropositive cows may have 12 to 19 times more chances of  
74 abortion compared to seronegative animals with an average of approximately 30 to 44% of  
75 abortion.

76 A study in dairy cattle demonstrated the risk factor relationship between *N. caninum*  
77 infection and abortion [9]. The presence of dogs in the farm is a determinant factor for the  
78 *N. caninum* infection in bovines [10, 11, 12]. Animal age was observed by Guimarães-  
79 Junior [13] as a risk factor for *N. caninum* infection, where older animals show greater  
80 seroprevalence, indicating that the horizontal transmission has great influence on the herds  
81 tested. In addition, a study in South America have demonstrated that neoporosis in dairy  
82 cattle has many more risk factors related to the infection [14]. Therefore, the aim of this  
83 study was to evaluate the risk factors for *N. caninum* infection, and possible cause-effect  
84 relation to the disease in dairy cattle.

85

## 86 2. MATERIALS AND METHODS

### 87 2.1 Animals selection and blood sampling

88 This study was conducted in 72 dairy farms of the Western region of Santa Catarina  
89 state, Brazil (Figure 1). The choice of properties was given for convenience, none of which  
90 was addicted, that is, with a history of known reproductive problems. From each herd  
91 selected lactating cows to the study. Blood samples of 1518 cows of different stages of  
92 lactation were collected from approximately 30 to 60% of each herd from the caudal vein,  
93 stored in tubes without anticoagulant, and transported under refrigeration to the laboratory.

94 Then, all samples were centrifuged at 3500 rpm for 10 min to obtain the serum, and stored  
95 at -20°C until serological analyzes by indirect immunofluorescence antibodies test (IFA),  
96 as previously described [7, 15].

97

## 98 **2.2 Epidemiological survey**

99 An epidemiological questionnaire was applied to farmers in order to investigate the  
100 risk factors for *N. caninum* infection, as well as to verify possible causes and effects related  
101 to neosporosis. The variables studied were: age (years), breed (Holstein-Friesian, Jersey, or  
102 mixed), number of pregnancies, diet, type of feedstocks (closed or open), water source  
103 (natural, river, lake or potable **water**), years of farming (up to 5 years, 6-10 years or >10  
104 years), feed source, presence of dogs, dogs with access to pasture, history of neosporosis,  
105 animal origin (born in the farm or acquired), reproductive problems occur (abortion,  
106 stillbirth, repeated heat, mummified fetus), number of times of problem and presence of  
107 neurological problems.

108

## 109 **2.3 Serological tests**

110 Sera samples were analyzed by IFA test in order to detect immunoglobulin G  
111 (IgG) anti-*Neospora* sp. For this, the antigen was obtained from *N. caninum* (NC-1 Strain)  
112 tachyzoites previously grown in Vero cells. All cells were maintained at 37 °C in RPMI  
113 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum in a 5% CO<sub>2</sub> incubator.  
114 Subsequently, tachyzoites were placed on a glass slides, followed by the addition of the  
115 serum sample diluted at 1:100 [7, 15]. A secondary antibody, species-specific known as  
116 rabbit fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled anti-bovine IgG (Sigma-Aldrich, St.  
117 Louis, USA) was used. Sera samples from cows know as positive and negative for  
118 *Neospora* spp were used as controls.

119

## 120 **2.4 Statistical analysis**

121 The data collected regarding the animals and general farm management were used  
122 as independent variables, and the model as a function of the results of individual serological  
123 tests for *N. caninum* was used as dependent variable, by means of a regression analysis with  
124 dichotomized outcomes. Cross tabulation and descriptive statistics, such as frequency and

125 percentage, were performed on all independent variables. Independent variables (Table 1)  
126 were first screened based on the response variable IFA. Variables with large amounts of  
127 missing data (>10%) and limited variability (<20%) were not included in the multivariable  
128 model. The remaining variables were inserted individually into a univariate logistic  
129 regression model. Under the assumption that each animal is clustered within a herd in a  
130 mixed model, we used the herd as random-effect due to the lack of independency among  
131 samples. Univariate analysis was first conducted using all twelve pre-selected variables.  
132 Subsequently, all variables with  $p \leq 0.20$  (eight variables) were selected for inclusion in the  
133 multivariable analysis. Variance inflation factor (VIF) was estimated to verify the  
134 relationship between all selected independent variables to check for potential collinearity,  
135 in which coefficient  $>10$  was considered as high. If high VIF was found, the variable with  
136 lowers p-value was considered for the multivariable model. Adjusted odds ratio (OR) was  
137 use to assess the impact of the association.

138         A second univariate model was performed in order to test for a possible cause-effect  
139 relationship. For this, we used as outcome variables the presence of reproductive problem  
140 (presence or absence), the presence of neurological problem (presence or absence), and a  
141 dichotomized (by the median) of the number of times the problem occurred in each cow, as  
142 predicted variables and as independent variable, such as the laboratory test result, and for  
143 this model a  $p \leq 0.05$  was considered significantly associated.

144         Multivariate models were built in a manual forward method; each remaining  
145 variable was added to the best previous model, selected by the Akaike Information  
146 Criterion (AIC). A backward elimination step was used, resulting in a final model in which  
147 only variables with  $p \leq 0.05$  were retained. Confounding effects were investigated by  
148 checking changes in the point estimated for the variables that remained in the model.  
149 Changes in parameter estimated  $>25\%$  were considered a confounder and we kept it in the  
150 model until the final model, and finally two-way interaction terms between variables with  
151 biological plausibility were investigated. We used deviance goodness of fit test for the  
152 overall model.

153

### 154 3. RESULTS

155 IFA test found 466 (30.69%-CI<sub>95%</sub>; 28.3-33.0) seropositive animals out of 1518  
156 tested samples (Figure 1). On the univariate analysis, it was found that eight variables  
157 (Table 1) had a tendency of association with the outcome. One should notice that age was  
158 significantly associated, showing an increase of 1.25 in the odds for each year increased in  
159 animal age. The presence of dogs was also strongly associated with positive results for *N.*  
160 *caninum* (OR=2.30), and remarkably associated to farms that had never been tested for *N.*  
161 *caninum*, with approximately 66% more chances of been positive.

162 In the final model (Table 2), we used the multivariable approach and found that  
163 farms with dogs showed 1.22 more chances of been seropositives for *N. caninum*. Farms  
164 without history of neosporosis were more likely to be positives (OR=1.58)

165 For the cause-effect relationship, we found significant association between the  
166 presence of reproduction problem and neosporosis, since cows with history of reproductive  
167 problems were 25% more likely to be positives for *N. caninum* (p=0.05). On the other hand,  
168 the frequency of reproductive problems showed p=0.07, which probably means a tendency  
169 for the cause-effect relationship to seropositivity for *N. caninum*. Besides, the presence of  
170 neurological problems was found to be not significantly associated (p=0.50) to *N. caninum*  
171 seropositivity.

172

### 173 4. DISCUSSION

174 This study showed that neosporosis is a prevalent disease in dairy cattle of farms  
175 from the Western part of Santa Catarina state, with more than 30.9% of the positives cows  
176 for the *N. caninum*, with cut-off 1:100. Dubey and Lindsay [5] already used cut off 1: 640  
177 or higher titles, however Venturini [16] noted the need for the use of lower titers. Currently  
178 the diagnostic laboratories use titles 1: 200 or smaller in order to identify circulating  
179 antibodies. This seroprevalence is higher than other states in the South of Brazil, as well as  
180 other Brazilian region, where geographical differences are marked, with fluctuations in  
181 climate, temperature and rainfall. This disease is highly prevalent in dairy cattle in Minas  
182 Gerais (91.2%) [17], as shown in Fig. 2.

183 In Latin America, neosporosis is considered an emergent disease in dairy cattle  
184 being responsible for causing economic losses related to abortion with variations in the

185 prevalence of *N. caninum* of 11.3% in Venezuela, and 76.9% in Colombia [18, 19] (Figure  
186 2). On average, the prevalence of *N. caninum* in cattle of Latin America is similarly to what  
187 we found, with *N. caninum* widespread in dairy farms. A study conducted by Dubey and  
188 Schares [15] showed that the prevalence of neosporosis differs between countries, inside  
189 the same territory and regions, and also among cattle for beef or milk. In Israel, neosporosis  
190 is present in 35.5% of all dairy herds [20] and in Iran, Nayebdzadeh [21] reported 9.8% of  
191 seroprevalence for *N. caninum* in dairy cattle. According to the literature, this high  
192 prevalence of *N. caninum* occurs due to the intensive way used for milk production with  
193 animal confinement [14].

194         The cause-effect relationship has been reported in many studies: results from  
195 Colômbia showed high prevalence (64%) of it, directly related to abortion [22]. However,  
196 Darío Cedeño and Bibiana Benavides [19] showed that high prevalence of the *N. caninum*  
197 in cattle might be associated to low rates of abortion, not contributing to show that the  
198 disease is present in the herd. However, cows infected by *N. caninum* were three to seven  
199 times more likely to have an abortion compared to seronegatives cows [12, 20], with an  
200 average of 30 to 44% of abortion, according López-Gatius [8]. Similarly, to this study,  
201 Kashiwasaki [23] described that there is a close relationship between seropositivity to *N.*  
202 *caninum* and occurrence of reproductive problems as abortion. With this, when possible,  
203 the analysis of aborted fetuses should be performed, associated with the presence of the  
204 parasite, and to correlate them with the serological results of the herd to verify the actual  
205 cause of the abortion. However, Moore [14] mentioned that the risk for abortion increases  
206 in cows with higher antibody titers, and this might be due to recent parasitemia. In this  
207 study, we verified a relation with the titers of antibodies detected (1: 100) with the  
208 occurrence of reproductive problems in the cow.

209         The studied variables suggest that the existence of risk factors in the farm  
210 contributes to the maintenance and the emergence of new cases of neosporosis in the herd.  
211 In this study, it was verified that animal age is relatively significant to *N. caninum*  
212 infection, i.e., as age increases, higher are the risk of infection by the protozoan. It was also  
213 mentioned by Moore [14], where the increase of cows age between two to six years,  
214 showed an increase in the risk of *N. caninum* infection. According to the literature, Dubey  
215 [24] observed that older cows present higher seropositivity for *N. caninum*, indicating a

216 greater possibility of horizontal transmission of the disease. On the other hand, the presence  
217 of dogs in the farms was evidenced as a high risk for *N. caninum*, showing that cows are  
218 2.22 more likely to become infected by the protozoan. Previous studies have already  
219 highlighted that the presence of domestic and wild canids in the vicinity farms is  
220 considered a risk factor for *N. caninum* [12, 25], since cows might become infected by  
221 ingesting oocysts previously eliminated by contaminated dog feces, which contaminates  
222 food and water [2]. Farms not previously tested for antibodies against the parasite were  
223 found to be more likely to have this type of infection, regardless of the origin of these  
224 animals (born in the farm or not). Since the disease can be introduced into the properties  
225 through the acquisition of seropositive cows [26], previous testing may help the farmers to  
226 avoid this problem. It should be emphasized that congenital and vertical transmission play  
227 an importance role in the maintenance of the disease in cattle [27, 28]. Anderson [27]  
228 observed that cows infected by *N. caninum* had high rate of vertical transmission, showing  
229 positive serology in newborns of successive pregnancies. The relationship with presence of  
230 antibodies by *N. caninum* and occurrence of reproductive problems was significant in this  
231 study, showing that cows presenting this type of issue have close relationship with  
232 neosporosis, with 25% more likelihood of occurrence, which was similarly described by  
233 other researchers [7, 9, 15]. As well as the number of times reproductive problems occur in  
234 the herds analyzed are related to seropositivity for *N. caninum*. Just like in this study,  
235 Asmare [25] reported abortion, fetal membranes retention, birth of stillborn calves and  
236 metritis as the most frequent reproductive disorders among herds seropositive cows in the  
237 farms studied.

238

## 239 **5. CONCLUSION**

240 The *N. caninum* is highly prevalent in dairy cattle in Southern Brazil, with an  
241 index of 30.9% of seropositivity in Santa Catarina state. Therefore, neosporosis has a  
242 cause-effect relationship with occurrence of reproductive problems, showing that positive  
243 cows are 25% more likely of showing reproductive problems, such as abortion, metritis and  
244 neonatal mortality. The presence of dogs in the farm, as well as the absence of any  
245 diagnostic test for *N. caninum* were found to be the main risk factors to the maintenance of  
246 the disease in dairy cattle.

247 **Committee of ethics and animal welfare**

248 The experimental protocol was approved by the Committee of Ethics and Animal  
249 Welfare at the University of Santa Catarina State (UDESC), under protocol number  
250 1.25.15.

251

252 **REFERENCES**

253 [1] J.P. Dubey, G. Schares, Neosporosis in animals - The last five years *Vet. Parasitol.* 180  
254 (2011) 90-108.

255

256 [2] M.M. Mccallister, J.P. Dubey, D.S. Lindsay, W.R. Jolley, R.A. Wills, A.M. Meguirre,  
257 Dogs are definitive host of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 28 (1998) 1473-1479.

258

259 [3] L.F.P. Gondim, M.M. Mccallister, W.C. Pitt, D.E. Zemlicka, Coyotes (*canis latrans*)  
260 are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 34 (2004) 159-161.

261

262 [4] J.P. Dubey, A.L. Hattel, D.S. Lindsay, M.J. Topper, Neonatal *Neospora caninum*  
263 infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am.*  
264 *Vet. Med. Assoc.* 193 (1988) 1259–1263.

265

266 [5] J.P. Dubey, D.S. Lindsay, A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet.*  
267 *Parasitol.* 67 (1996) 1-59.

268

269 [6] M.P. Reichel, M.A. Ayanegui-Alcérreca, L.F.P. Gondim, J.T. Ellis, What is the global  
270 economic impact of **Neospora caninum** in cattle - The billion dollar question *Int. J.*  
271 *Parasitol.* 43 (2012) 133-142.

272

273 [7] L.M. Campero, L. Minke, G. Moré, M. Rambeaud, D. Bacigalupe, D.P. Moore, Y.  
274 Hecker, C.M. Campero, G. Schares, M.C. Venturini, Evaluation and comparison of  
275 serological methods for the detection of bovine neosporosis in Argentina *Rev. Arg.*  
276 *Microbiol.* 47 (2015) 295-301.

277

- 278 [8] F. López-Gatius, M. López-Béjar, K. Murugavel, M. Pábon, D. Ferrer, S. Almeria,  
279 *Neospora*-associated to an abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in a north-  
280 east Spain J. Vet. Medicine ser. B 51 (2004) 348-352.  
281
- 282 [9] V. Klauck, G. Machado, R. Pazinato, W.M. Radavelli, D.S. Santos, J.C. Berwaguer, P.  
283 Braunig, F.F. Vogel, A.S. Da Silva, Relation between **Neospora caninum** and abortion in  
284 dairy cows: Risk factors and pathogenesis of disease Microb. Pathol. 92 (2016) 46-49.  
285
- 286 [10] J. Paré, G. Fecteau, M. Fortin, G. Marsolais, Seroepidemiologic study of *Neospora*  
287 *caninum* in dairy herds J. Am Vet. Med. Assoc. 213 (1998) 1595-1598.  
288
- 289 [11] C.J.M. Bartels, W. Wouda, Y.G. Shukken, Risk factors for *Neospora caninum*  
290 associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997) Theriagenology  
291 52 (1999) 247-257.  
292
- 293 [12] W. Wouda, T. Dijkstra, A.M.H. Kramer, C. Van Maneem, J.M.A. Brinkhof,  
294 Seroepidemiologic evidence for a relationship between *Neospora Caninum* infections in  
295 dog and cattle Int. J. Parasitol. 29 (1999) 1677-1682.  
296
- 297 [13] J.S. Guimarães-Junior, S.L.P. Souza, D.P. Bergamaschi, S.M. Gennari, Prevalence of  
298 *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of  
299 the north of Paraná state, Brazil Vet. Parasitol. 124 (2004) 1-8.  
300
- 301 [14] D.P. Moore, Neosporosis in South America Vet. Parasitol. 127 (2005) 87-97.  
302
- 303 [15] J.P. Dubey, G. Schares, Diagnosis of bovine neosporosis Vet. Parasitol. 31 (2006) 1-  
304 34.  
305  
306  
307



- 308 [16] M.C. Venturini, L. Venturini, D. Bacigalupe, M. Machuca, I. Echaide, W. Basso, J.M.  
309 Unzaga, C. Di Lorenzo, A. Guglielmone, M.C Jenkins, J.P. Dubey Neospora caninum  
310 infections in bovine foetuses and dairy cows with abortions in Argentina Int. J. Parasitol. 29  
311 (1999) 1705-1708.  
312
- 313 [17] M.H.P. Guedes, A.M. Guimarães, C.M.B.M. Rocha, C. Hirsch, Frequência de  
314 anticorpos anti-Neospora caninum em vacas e fetos provenientes de municípios do sul de  
315 Minas Gerais Revista Brasileira Parasitologia Veterinária 17 (2008) 189–194.  
316
- 317 [18] D. Lista-Alves, R. Palomares-Naveda, F. Garcia, C. Obando, D. Arrieta, A.E. Hoet,  
318 Serological evidence of Neospora caninum in dual-purpose cattle herds in Venezuela Vet.  
319 Parasitol. 136 (2006) 347-349.  
320
- 321 [19] Q. Darío Cedeño, B. Bibiana Benavides, Seroprevalence and risk factors associated to  
322 Neospora caninum in dairy cattle herds in the municipality of Pasto, Colombia Rev. MVZ  
323 Cordoba 18 (2003) 3311-3316.  
324
- 325 [20] M.L. Mazuz, L. Fish, D. Reznikov, R. Wolkomirsky, B. Leibovitz, I. Savitzky, J.  
326 Golenser, V. Shkap, Neosporosis in naturally infected pregnant dairy cattle Vet. Parasitol.  
327 205 (2014) 85-91.  
328
- 329 [21] H. Nayebzadeh, S.R. Nourollahi Fard, M. Khalili, N. Zakian, M. Taati,  
330 Seroprevalence of Neospora caninum infection in dairy cattle in west of Iran Inst. Univers.  
331 Vet. Fakultesi Dergisi 41 (2015 ) 162-166.  
332
- 333 [22] M.O. Pulido-Medellín, D.J. García-Corredor, J.C. Vargas-Abella, Seroprevalencia de  
334 Neospora caninum en un Hato Lechero de Boyacá, Colombia Rev. Inv. Vet. Perú 27 (2016)  
335 355-362.  
336
- 337 [23] Y. Kashiwazaki, R.E. Giannechini, M. Lust, J. Gil, Seroepidemiology of neosporosis  
338 in dairy cattle in Uruguay Veter. Parasitol. 120 (2004) 139-144.

- 339 [24] J.P. Dubey Recent advances in *Neospora* and neosporosis *Vet. Parasitol.*  
340 84 (1999) 349–367.  
341
- 342 [25] K. Asmare, F. Regassa, L.J. Robertson, E. Skjerve, Seroprevalence of *Neospora*  
343 *caninum* and associated risk factors in intensive or semi-intensively managed dairy and  
344 breeding cattle of Ethiopia *Vet. Parasitol.* 193 (2013) 85-94.  
345
- 346 [26] P. Anruvipas, T. Inpankaew, S. Jittapalapong, Seroprevalence and Risk Factors of  
347 *Neospora caninum* Infection among Dairy Cows in the Western Provinces of Nakhon  
348 Pathom, Ratch-aburi and Kanchanaburi, Thailand *Kasetsart J. (Natural Science)* 46 (2012)  
349 64–70.  
350
- 351 [27] M.L. Anderson, J.P. Reynolds, J.D. Rowe, K.W. Sverlow, A.E. Packhman, B.C. Barr,  
352 P.A. Conrad, Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. Infection in dairy cattle. *J.*  
353 *Am. Vet. Assoc.* 210 (1997) 1169-1172.  
354
- 355 [28] A.M. Rodríguez, S. Maresca, D.B. Cano, J.I. Armendano, G. Combessies, S. Lopéz-  
356 Valiente, E.R. Odriozolo, E.J.L. Späth, A.C. Odeón, C.M. Campero, Frequency of  
357 *Neospora caninum* infections in beef cow-calf operations under extensive management *Vet.*  
358 *Parasitol.* 219 (2016) 40-43.  
359
- 360 [29] N.C. Puray, A.V. Chávez, E.A. Casas, P.N. Falcón, G.V. Casas, Prevalencia de  
361 *Neospora caninum* em bovinos de uma empresa ganadera de la sierra central del Perú *Rev.*  
362 *Inv. Vet. Perú* 17 (2006) 189–194.  
363
- 364 [30] A.N. Patitucci, M.J. Perez, K.F. Israel, M.A. Rozas, Prevalence of *Neospora caninum*  
365 in two dairy herds of the IX Region of Chile *Arch. Med. Vet.* 32 (2000) 209–214.  
366
- 367 [31] T. Osawa, J. Wastling, L. Acosta, C. Ortellado, J. Ibarra, E.A. Innes, Seroprevalence  
368 of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Paraguay *Vet. Parasitol.* 110  
369 (2002) 17–23.

- 370 [32] D.P. Moore, C.M. Campero, A.C. Odeón, M.A. Posso, D. Cano, M.R. Leunda, W.  
371 Basso, M.C. Venturini, E. Späth, Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study  
372 of *Neospora caninum* in Argentina Vet. Parasitol. 107 (2002) 303–316.  
373
- 374 [33] L.M. Campero, M.C. Venturini, D.P. Moore, L. Massola, H. Lagomarsino, B. García,  
375 D. Bacigalupe, M. Rambeaud, L. Pardini, M.R. Leunda, G. Schares, C.M. Campero,  
376 Isolation and molecular characterization of a new *Neospora caninum* isolate from cattle in  
377 Argentina Exp. Parasitol. 155 (2009) 8-12.  
378
- 379 [34] P. Bañales, L. Fernandez, W.V. Repiso, A. Gil, D.A. Dargatz, T. Osawa, A nationwide  
380 survey on seroprevalence of *Neospora caninum* infection in beef cattle in Uruguay Vet.  
381 Parasitol. 139 (2006) 15-20.  
382
- 383 [35] L.G. Corbellini, D. Driemeier, C.F.E. Cruz, L.F.P. Gondim, V. Wald, Neosporosis as a  
384 cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil Vet. Parasitol. 103  
385 (2002) 195–202.  
386
- 387 [36] M.Y. Hasegawa, I.F. Sartor, A.M.O. Canavessi R.D. Pinckney, Ocorrência de  
388 anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos de corte e em cães da região de Avaré,  
389 Estado de São Paulo, Brasil Semina 25 (2004) 45-50.  
390
- 391 [37] A.D. Munhoz, M.J.S. Pereira, W. Flausino, C.W.G. Lopes, *Neospora caninum*  
392 seropositivity in cattle breeds in the South Fluminense Paraíba Valley, state of Rio de  
393 Janeiro Pesq. Vet. Bras. 29 (2009) 29–32.  
394
- 395 [38] M.H.P. Guedes, A.M. Guimarães, C.M.B.M. Rocha, C. Hirsch, Frequência de  
396 anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas e fetos provenientes de municípios do sul de  
397 Minas Gerais Revista Brasileira Parasitologia Veterinária 17 (2008) 189–194.  
398

- 399 [39] F.R.P. Bruhn, D.O. Daher, E. Lopes, J.M. Barbieri, C.M.B.M. Rocha, A.M.  
400 Guimarães, Factors associated with seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in  
401 southeastern Brazil *Trop. Anim. Health and Product.* 45 (2013) 1093-1098.  
402
- 403 [40] V.S.F. Oliveira, G. Álvarez-García, L.M. Ortega-Mora, L.M.F. Borges, A.C. da Silva,  
404 Abortions in bovines and *Neospora caninum* transmission in an embryo transfer center *Vet.*  
405 *Parasitol.* 173 (2010) 206-210.  
406
- 407 [41] M.E. Sousa, W.J.N. Porto, P.P.F. Albuquerque, O.L. Souza Neto, E.B. Faria, J.W.  
408 Pinheiro Júnior, R.A. Mota, Seroprevalence and risk factors associated with infection by  
409 *Neospora caninum* of dairy cattle in the state of Alagoas, Brazil *Pesq. Vet. Brasil.* 32  
410 (2012) 1009-1013.  
411
- 412 [42] M.I.S. Silva, M.Â.O Almeida, R.A. Mota, J.W. Pinheiro-Junior, S.S.A.Rabelo, Fatores  
413 de riscos associados à infecção por *Neospora caninum* em matrizes bovinas leiteiras em  
414 Pernambuco *Ciência Animal Brasileira* 9 (2008) 455–461.  
415
- 416 [43] W.C. Teixeira, R.S. Uzêda, L.F. Gondim, M.I. Silva, H.M. Pereira, L.C. Alves, M.A.  
417 Faustino, Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* (Apicomplexa: Sarcocystidae)  
418 em bovinos leiteiros de propriedades rurais em três microrregiões no estado do Maranhão  
419 *Pesquisa Veterinária Brasileira* 30 (2010) 729-734.  
420
- 421 [44] A.H.H. Minervino, A.M.A. Ragozo, R.M. Monteiro, E.L. Ortolani, S.M. Gennari,  
422 Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle from Santarém, Pará, Brazil *Res. Vet.*  
423 *Sci.* 84 (2008) 254–256.  
424
- 425 [45] D.M. Aguiar, G.T. Cavalcante, A.R. Rodrigues, M.B. Labruna, L.M.A. Camargo, E.P.  
426 Camargo, S.M. Gennari, Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs  
427 from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors, *Vet.*  
428 *Parasitol.* 142 (2006) 71-77.  
429

430 1.1 [46] R. V. Boas, T. A. Pacheco, A. L. T. Melo, A. C. S. de Oliveira, D. M.  
431 de Aguiar, R. C. Pacheco, Infection by *Neospora caninum* in dairy cattle belonging to  
432 family farmers in the northern region of Brazil *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária*  
433 24 (2015).

434

435 [47] L.M. Oshiro, M.F.C. Matos, J.M. de Oliveira, L.A.R.C. Monteiro, R. Andreotti,  
436 Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle from the state of Mato Grosso do  
437 Sul, Brazil *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária* 16 (2007) 133–13.

438

439 [48] A.H. Benetti, F.B. Schein, T.R. dos Santos, G.H. Toniollo, A.J. Costa, J.R. Mineo, J.  
440 Lobato, D.A. Oliveira Silva, S.M. Gennari, Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum*  
441 em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais da região Sudoeste do Estado de Mato  
442 Grosso *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária* 18 (2009) 29–33.

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461 Table 1. Univariate analysis of associated risk factors for *Neospora caninum* infection in  
 462 the west part of Santa Catarina state, Southern Brazil.

Variables	Frequency % (n)/Median	<i>p</i> – value	OR (IC 95%)
<b>Water source</b>			
Natural	63.7 (967)	-	-
River	11.1 (169)	0.26	1.23 (0.86-1.78)
Lake	17.9 (272)	0.52	1.09 (0.82-1.47)
Potable <i>water</i>	7 (110)	0.06	1.53 (0.98-2.46)
<b>Years of farming</b>			
Up to 5 years	4.8 (73)	-	-
6-10 years	25.6 (389)	0.38	0.76 (0.41-1.35)
> 10 years	69.6 (1056)	0.12	0.64 (0.35-1.09)
<b>Local of feed stock</b>			
Close	56.9 (864)	-	-
Open	43.1 (654)	0.15	1.17 (0.94-1.46)
<b>Age (years)</b>	2	0.05	1.25 (0.99-1.56)
<b>Number of pregnancies</b>			
1- 2	44.3 (658)	-	-
3- 4	35.5 (527)	0.96	0.99 (0.77-1.27)
5	9 (131)	0.13	1.38 (0.91-2.14)
More than 5	11.2 (170)	0.65	1.08 (0.75-1.57)
<b>Feed source</b>			
Pasture	1.1 (17)	-	-
Pasture and ratio	91.2 (1385)	0.50	0.68 (0.19-1.93)
Other	7.6 (116)	0.78	0.84 (0.22-2.56)
<b>Presence of dogs</b>			
Yes	93.0 (1411)	0.001	2.30 (1.40-3.98)
No	7 (107)	-	-
<b>Pasture access</b>			
Yes	80.0 (1215)	0.16	1.22 (0.92-1.62)
No	20.0 (303)	-	-
<b>Previous diagnostic for neosporosis</b>			
Yes	6.7 (101)	-	-
No	93.3 (1417)	0.01	1.66 (1.09-2.50)
<b>Breed</b>			
Holstein	73.7 (1103)	-	-
Jersey	15.9 (238)	0.80	1.03 (0.32-2.57)
Mixed	10.4 (155)	0.76	9.49 (0.01-10.43)
<b>Animal origin</b>			
Outside the farm	25.7 (390)	-	-
Born in the farm	74.3 (1126)	0.33	0.88 (0.68-1.13)

464 Table 2. Multivariate analysis of risk factors for *Neospora caninum* infection in the west  
 465 part of Santa Catarina, Southern Brazil.

Variables	Estimate ( $\beta$ )	<i>p</i> -value	OR (CI: 95%)
<b>Previous diagnostic for neosporosis</b>			
Yes	-	-	-
No	0.46	0.03	1.58 (1.04-2.38)
<b>Presence of dogs</b>			
Yes	0.79	<0.001	2.22 (1.35-3.84)
No	-	-	-

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

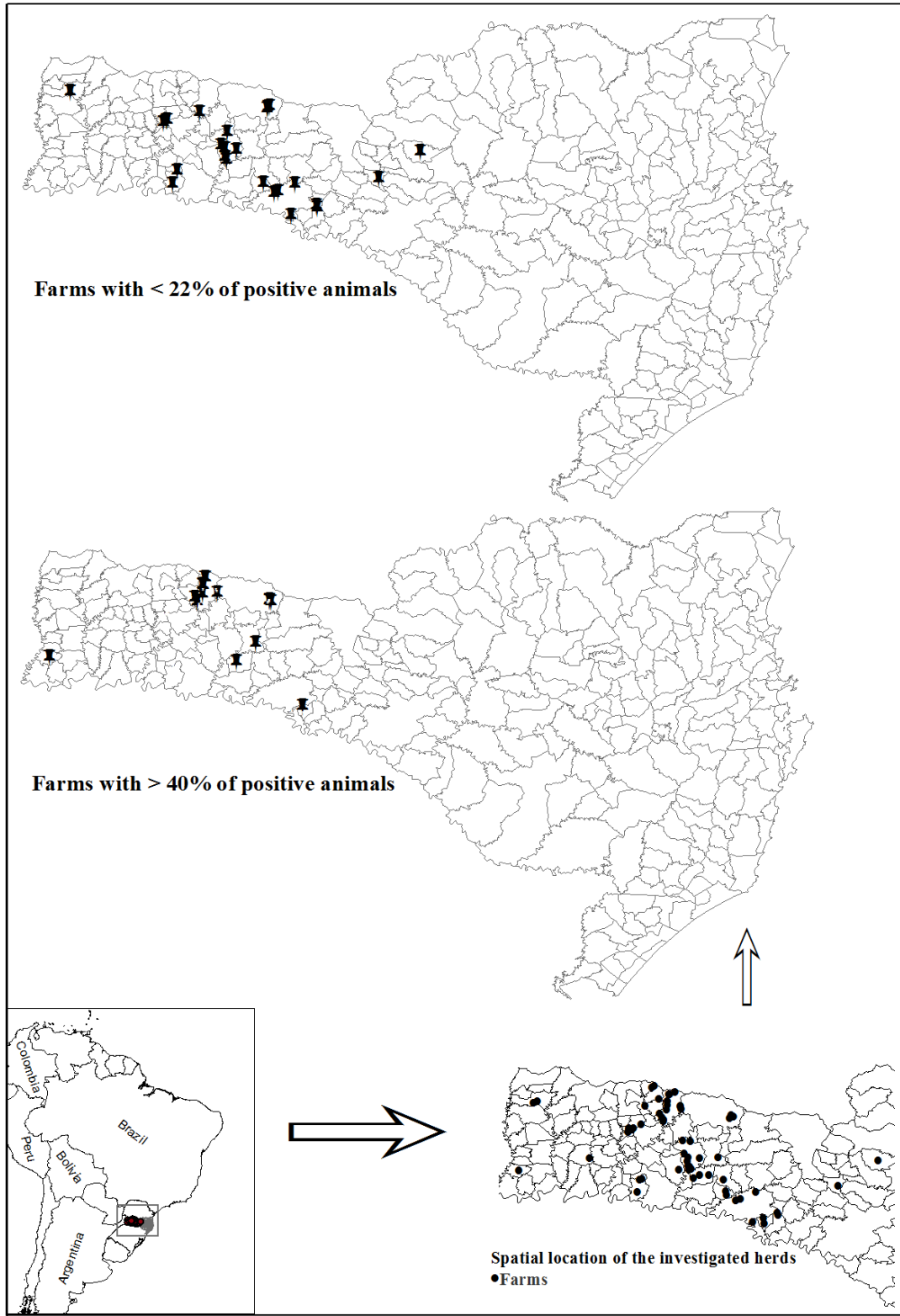
485

486

487

488

489



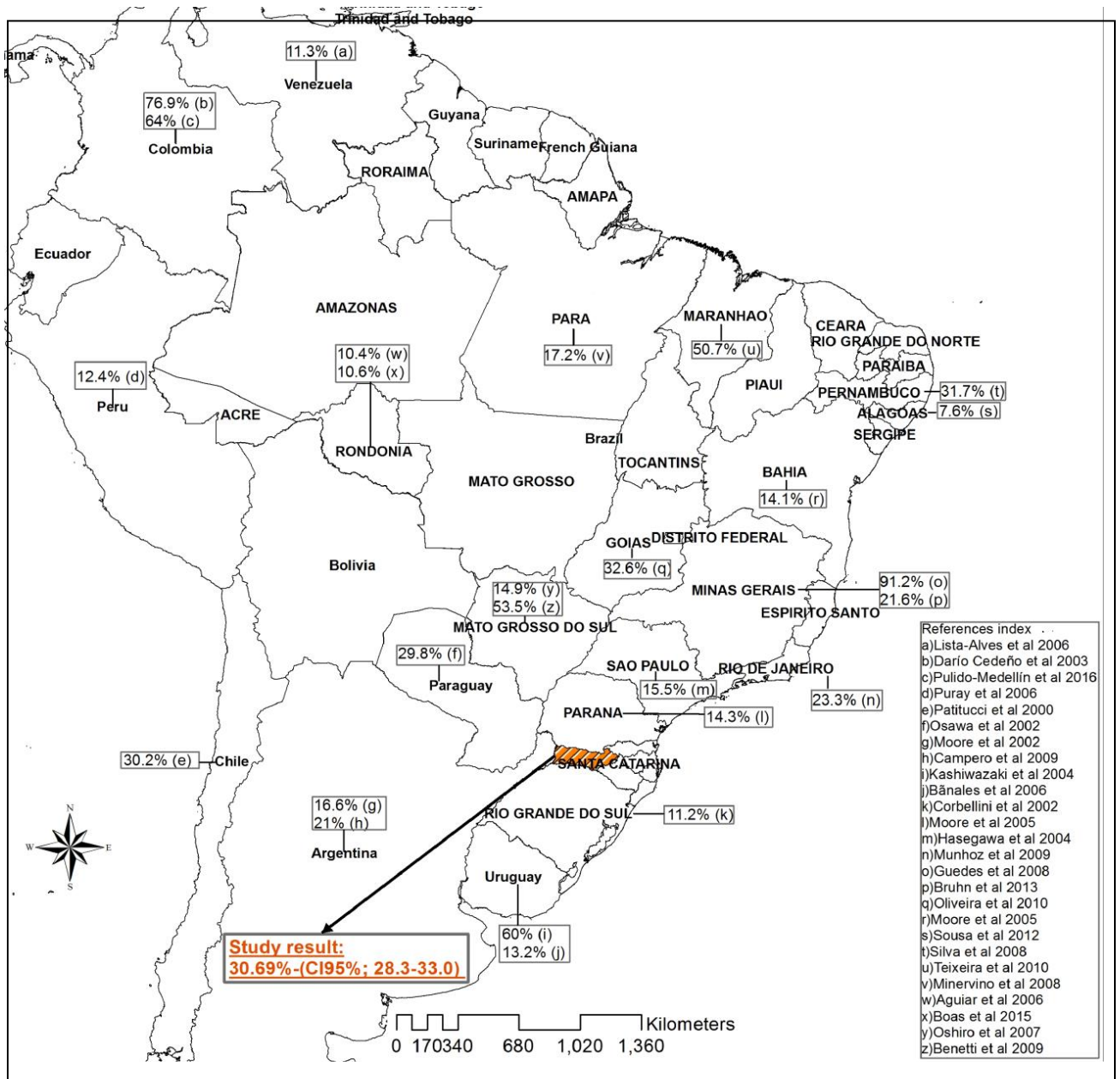
490

491 Fig. 1. Representative map of *Neospora caninum* seroprevalence in the Western part of

492 Santa Catarina state, South of Brazil.



493



494

495

496 Fig. 2. Representative map of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cows in South  
 497 America, highlighting the west part of Santa Catarina state, Southern Brazil. Note: Lista-  
 498 Alves et al. [17], Darío Cedeño et al. [18], Pulido-Medelin [21], Puray et al. [29], Patitucci  
 499 et al. [30], Osawa et al. [31], Moore et al. [32], Campero et al. [33], Kashiwaska et al. [22],  
 500 Bãnales et al. [34], Corbellini et al. [35], Moore et al. [14], Hasegawa et al. [36], Munhoz et  
 501 al. [37], Guedes et al. [38], Bruhn et al. [39], Oliveira et al. [40], Sousa et al. [42], Silva et

502 al. [42], Teixeira et al.[43], Minervino et al. [44], Aguiar et al. [45], Boas et al. [46], Oshiro  
503 et al. [47], Benetti et al. [48].  
504

*2.2.Artigo II*

**Bovine leptospirosis: prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation**

Autores: Juscivete F. Fávero, Hugo Libonati de Araújo, Walter Lilenbaum, Gustavo Machado, Alexandre A. Tonin, Matheus B. Baldissera, Lenita M. Stefani, Aleksandro S. Da Silva

Artigo aceito para publicação na *Microbial Pathogenesis*.

1 **Bovine leptospirosis: prevalence, associated risk factors for infection and their cause-**  
2 **effect relation**

3  
4 Juscivete F. Fávero<sup>a,b,g</sup>, Hugo Libonati de Araújo<sup>c</sup>, Walter Lilenbaum<sup>c</sup>, Gustavo Machado<sup>d</sup>,  
5 Alexandre A. Tonin<sup>e</sup>, Matheus D. Baldissera<sup>f</sup>, Lenita M. Stefani<sup>a,b</sup>, Aleksandro S. Da  
6 Silva<sup>a,b\*</sup>

7  
8 <sup>a</sup>Graduate Program in Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina  
9 (UDESC), Chapecó, Santa Catarina (SC), Brazil.

10 <sup>b</sup>Department of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC),  
11 Chapecó, Santa Catarina (SC), Brazil.

12 <sup>c</sup>Laboratory of Veterinary Bacteriology, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói,  
13 Rio de Janeiro (RJ), Brazil.

14 <sup>d</sup>Department of Veterinary Population Medicine, College of Veterinary Medicine,  
15 University of Minnesota (UMN), Saint Paul, Minnesota (MN), USA.

16 <sup>e</sup>Department of Veterinary Medicine, Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC),  
17 Xanxerê, Santa Catarina (SC), Brazil.

18 <sup>f</sup>Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Maria, RS,  
19 Brazil.

20 <sup>g</sup>UNIEDU – FUMDES scholarship, Santa Catarina State (SC), Brazil.

21  
22 \*Author for correspondence: Phone: 55 49 2049-9560. E-mail:  
23 [dasilva.aleksandro@gmail.com](mailto:dasilva.aleksandro@gmail.com).

24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

32 **ABSTRACT**

33 Leptospirosis is a cosmopolitan infectious disease that causes severe reproductive disorders  
34 in cattle, especially those related to abortion. This disease has rodents as main reservoirs;  
35 however, cattle are responsible for maintenance of the disease. Thus, the aim of this study  
36 was to identify the factors associated with infection and cause-effect relation of  
37 leptospirosis in dairy herds from Southern of Brazil. Serum samples of 1,242 cows were  
38 collected from herds classified as of medium and high density, and tested by microscopic  
39 agglutination test (MAT). These farms were located in the West part of Santa Catarina  
40 State (Brazil). A total of 80 cows (6.44%) were considered positives for the infection with  
41 titration of 1:100. Using a multivariate analysis, we identified two factors associated to  
42 bovine leptospirosis: dog access to pastures ( $p<0.001$ ) and feed exposure to rodents  
43 ( $p=0.05$ ). Cause-effect analysis demonstrated that the occurrence of reproductive disorders  
44 was significantly ( $p=0.01$ ) linked to leptospirosis. Thus, we conclude that leptospirosis is  
45 prevalent in dairy cattle in the west part of Santa Catarina state, as well as the access of  
46 dogs to pastures and contact of rodents with feed increase the chance of cattle infection by  
47 *Leptospira* spp.

48

49 **Keywords:** dairy cattle, infectious disease, *Leptospira*, reproductive disorders.

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

## 63 INTRODUCTION

64 Brazil has 23 million cows milked every day, milk production is present in about  
65 99% of rural properties [1], placing Brazil in the fifth position in global cow's milk  
66 production [2]. Of particular interest, the Southern region of Brazil occupies the first place  
67 in the national ranking [3], and the state of Santa Catarina is the fifth largest cow's milk  
68 producer. Some studies have reported some risk factors associated to high prevalence of  
69 bovine leptospirosis in many countries [4,5,6], as well as in some Brazilian states,  
70 indicating that this disease causes severe economic losses [7,8,9,10,11].

71 Leptospirosis is a zoonotic infectious disease caused by pathogenic spirochetes of  
72 the genus *Leptospira* spp. [12]. It has worldwide distribution and it is considered endemic  
73 in Brazil. It occurs mainly in countries with tropical or subtropical climates, where the  
74 humidity and heat favor bacterium survival [13,14,15]. *Leptospira* spp. infects wild and  
75 domestic animals, and it is transmitted mainly through direct contact with urine of infected  
76 reservoirs, as well as through consumption of contaminated water and food [16]. According  
77 to Saito et al. [17], there are approximately 300 serovars of *Leptospira* spp., divided into 28  
78 groups. Although rodents are considered the main reservoirs, other animals can also be  
79 reservoirs, contributing for the dissemination of this pathogen [18]. Cattle are recognized as  
80 maintenance hosts of Hardjo serovar, as well as other members of Sejroe serogroup,  
81 causing chronic disease with subclinical and persistent infection of their reproductive tract  
82 [19]. However, serovars Pomona, Icterohaemorrhagiae and Grippityphosa can also be  
83 associated to bovine leptospirosis [19,20]. Therefore, bovine leptospirosis is definitely a  
84 cause of important economic losses, especially due to the occurrence of reproductive  
85 disorders, such as abortion, stillbirth, and decreased milk production, besides the  
86 occurrence of birth of weak calves [21,22].

87 The presence of dogs in rural properties has been considered an important factor on  
88 leptospirosis epidemiology and on its prevalence within the herd [23]. Rodents with direct  
89 contact with cattle food are also an important risk factor, as observed by cattle positive  
90 serology [24]. However, these associated factors may depend on many variables such as  
91 farm localization and technification, herd composition, animal handling and care, diet,  
92 among others [9]. Thus, the aim of this study was to evaluate the seroprevalence bovine  
93 leptospirosis in dairy cattle of in the West part of Santa Catarina State, Brazil, as well as to

94 identify associated risk factors for *Leptospira* spp. infection and their cause-effect relation  
95 to the disease.

96

## 97 **2. MATERIAL AND METHODS**

### 98 **2.1 Animal selection and sampling**

99 Serum samples from 1,242 adult cows of different stages of lactation from 69 herds  
100 (Figure 1) of the West part of Santa Catarina State (Brazil) were submitted to quantitative  
101 and qualitative serological analyzes for *Leptospira* spp. Among these properties, 68 were  
102 with semi-extensive farming (diet based on concentrate and free grazing), and one property  
103 with freestall farming (confined during lactation). The herds were classified by size as  
104 medium (with 15 to 30 cows) or large (more than 30 cows) [25], based on the number of  
105 cows in lactation and the milking system (mechanics).

106 Blood samples were collected into tubes without anticoagulant and transported to  
107 the laboratory under refrigeration. Blood centrifugation was performed at 3500 rpm for 10  
108 min, and serum samples were kept at -20 °C until utilization.

109

### 110 **2.2 Epidemiological survey**

111 An epidemiological survey was applied to the farmer in order to investigate more  
112 precisely the production system and animal management, and to help identifying the risk  
113 factors and cause-effect relation of leptospirosis in dairy cattle. Many variables were  
114 collected such as: age (years), breed (Holstein, Jersey or crossbreed), number of  
115 gestations, history of reproductive problems (abortions, repetition of estrus, and fetal  
116 mummification), cow origin (purchased or born in the farm), diet (concentrate, pasture or  
117 both), diet storage (closed silo or outdoor), presence of dogs and their access to pasture,  
118 water source (natural, river, lake or chlorinated), time in the dairy business (1-5 years, 5-15  
119 years, or more than 15 years), presence of rodents and their access to cattle food.

120

### 121 **2.3 Serology**

122 Serological diagnosis was performed according to the recommendation of the World  
123 Organization for Animal Health (OIE), using microscopic agglutination test (MAT) with  
124 live antigens, using a microscope equipped with a dark field condenser, as previously

125 described [26]. These antigens were maintained in liquid media (EHJM), as recommended  
126 by OIE [26]. The panel of antigens used in this study was composed by six standard strains  
127 considered the most prevalent [27] with the following serogroups: Australis,  
128 Icterohaemorrhagiae, Sejroe, Autumnalis, Pomona, and Shermani. As recommended, the  
129 serum samples were initially tested using a 1:50 dilution, and those with agglutination level  
130 equal or greater than 50% were further diluted [28]. The final titration was determined as  
131 the dilution where the level of agglutination of 50% was observed. All reactions were  
132 analyzed by a same technician to avoid biased interpretation. Titration of 1:50 was used to  
133 indicate that the animals were exposed to the etiologic agent. Titration  $\geq 1:100$  were  
134 considered positive for *Leptospira* infection.

135

#### 136 **2.4 Statistical analysis**

137 To determine the factors associated with exposure or infection, as well as cause-  
138 effect relation we used all data from animals seroreagents to *Leptospira*, i.e. with titration  $\geq$   
139 1:50.

140 The data collected regard farm management and information at the animal level  
141 were used as independent variables and model as a function of the result of individual  
142 serological tests for leptospirosis as dependent variable, by means of a regression analysis  
143 with outcome dichotomized. Cross tabulation and descriptive statistics such as frequency  
144 and percentage were performed on all independent variables. Independent variables (Table  
145 1) were first screened based on the response variable coded as positive or negative for  
146 MAT to *Leptospira* (titration  $\geq 1:50$ ), variables with large amounts of missing data ( $>10\%$ )  
147 and limited variability ( $<20\%$ ) were not included in the multivariable model. The remaining  
148 variables were entered individually into a univariate logistic regression model. Under the  
149 assumption that each animal is clustered within a herd, a mixed model was performed using  
150 the herds as a random-effect due to the lack of independency among samples. Univariate  
151 analysis was first conducted using all the twelve pre-selected variables. Subsequently, all  
152 variables with  $p \leq 0.20$  (eight variables) were selected for the inclusion in the multivariable  
153 analysis. Variance inflation factor (VIF) were estimated to verify the relation between all  
154 selected independent variables to check for potential collinearity, in which coefficient  $>10$   
155 was considered high, and if any high VIF was found the variable with lower p-value was



156 considered for the multivariable model. Adjusted odds ratio (OR) was use to assess the  
157 impact of the association.

158 A second univariate model was built in order to test for a possible “effect-cause”  
159 relation, for this matter it was used as an outcome variable the presence of reproductive  
160 problem (presence or absence), and the number of reproductive problem (one time or more  
161 the occurrence of abortion or return to estrus) as predicted variables and as independent  
162 variable the laboratory test result (MAT - coded as positive or negative) and the serotype  
163 isolated, for this model a  $p \leq 0.05$  was considered significantly associated.

164 Multivariate models were built in a manual forward method; each remaining  
165 variable was added to the best previous model, selected by the Akaike Information  
166 Criterion (AIC). A backward elimination step was used, resulting in a final model in which  
167 only variables with  $p \leq 0.05$  were retained. Confounding effects were investigated by  
168 checking changes in the point estimates of the variables that remained in the model.  
169 Changes in parameter estimates  $>25\%$  were considered as a confounder, and kept in the  
170 model until the final model, and finally two-way interaction terms between variables with  
171 biological plausibility were investigated. We used deviance perform as a goodness of fit  
172 test for overall model.

173

### 174 3. RESULTS

175 MAT (titers  $\geq 1:100$ ) showed that 80 animals had antibodies against at least three  
176 serogroups of *Leptospira*, generating a seroprevalence of 6.44%. The serogroups identified  
177 in target herds were: Pomona (3.2%), Sejroe (3.1%) and Icterohaemorrhagiae (0.6%).

178 For statistical analysis, all seroreagent animals (titers  $\geq 1:50$ ) were considered  
179 positives, i.e. 230 cows (18.51%-CI<sub>95%</sub>; 16.41-20.81) were exposed or infected by the  
180 etiological agent. On the unavailable analysis, it was found that seven variables (Table1)  
181 had a tendency to be associated with the outcome. Water source was associated with  
182 leptospirosis however, results indicated that the source of the water matter since water from  
183 the river showed 4.43 greater chances than chlorinated water (OR=0.20) of being  
184 associated to a positive test. Moreover, the number of years that the farmer had dedicated to  
185 dairy business was significantly associated with cow seropositivity to leptospirosis, i.e.  
186 cows owned by farmers with 6 to15 years of experience had 3.49 more chances to be

187 positives compared to farmers with more than 15 years in the activity. Finally, the animal  
188 breed was also significantly associated to positivity; Jersey and crossbreed showed high  
189 chances of seropositivity to leptospirosis, (odds=1.93, 2.77, respectively). In the univariate  
190 analysis, the diet, as well as, the access of dogs to pasture, and rodent access to cattle feed  
191 showed association with positive results for leptospirosis on MAT (Table 1).

192 As a final model using the multivariable approach, we found that farms that had  
193 dogs with free access to cattle feed showed 1.71 more chances of been seropositives to  
194 *Leptospira* spp. (Table 2). The farms that did not avoid rodent access to feed showed an  
195 odd of 1.54 for positive results on MAT (Table 2).

196 Effect-cause analysis showed significant association between reproduction  
197 problems and positive result to *Leptospira* spp. (MAT). Cows with reproductive problems  
198 were 8% more likely to be MAT positive ( $p=0.01$ ); conversely, the number of times that  
199 this animal had reproductive problems was not significantly associated with positive results  
200 to *Leptospira* spp. ( $p=0.06$ ), but there was a tendency for cows with great history of  
201 reproductive problems to be MAT positives for leptospirosis. While analyzing serogroups  
202 as independent variables, there was also a significant association between reproductive  
203 problem; i.e., serovars Copenhageni and Pomona were less likely to be identify with an  
204 odds of 0.76 (CI 0.62-0.94;  $p=0.01$ ) and 0.86 (0.78-0.94,  $p=0.02$ ), respectively. In the same  
205 way, when the number of reproductive events was linearly related with the identified  
206 serogroup, for every increase in the number of reproductive problem, the chances of been  
207 identified the serogroups Icterohaemorrhagiae and Pomona were less likely to happened,  
208 with an odds of 0.48 (CI 0.24-0.96;  $p=0.03$ ) and 0.62 (0.46-0.85,  $p=0.02$ ), respectively.  
209 Related to these results, there was a trend ( $p=0.07$ ) for cows positives for the Sejroe  
210 serogroup to have reproductive problems.

211

#### 212 **4. DISCUSSION**

213 This study evaluated serologically and epidemiologically, the profile of bovine  
214 leptospirosis in the West region of Santa Catarina state, Brazil. Surprisingly, the  
215 seroprevalence was low with only 6.44% of the animals with titers 1:100 or higher.  
216 According to the literature, titration of 1:50 indicates animal exposure to the etiological  
217 agent, but titers of 1:100 or higher in the MAT is an indicators of disease [29]. MAT is a

218 laboratorial method for diagnosing leptospirosis [30] in herds, but not individually, since it  
219 is serovar-specific, and in those cases, it is necessary to use direct methods, such as PCR  
220 (polymerase chain reaction) [13,31]. Since there is a correlation MAT positive results even  
221 with high titers and urinary PCR, it is valid to assure that MAT is a recommended  
222 diagnostic tool for *Leptospira* spp., but with limitations because it is specific serogroup  
223 [32].

224         Recently, Pasqualotto et al. [33] demonstrated a seroprevalence of 31.67% of  
225 *Leptospira* spp. in the same region; however using a smaller number of animals, in addition  
226 to properties less technificated. On the other hand, Fávero et al. [8], also in Santa Catarina  
227 State and Paim et al. [34] in the Goiás State (Fig. 1), verified low seroprevalences of bovine  
228 leptospirosis (25.2 and 18.9%, respectively), indicating that climatic conditions, herd  
229 management, and animal density contribute to disease dissemination. In Brazil, higher  
230 prevalence rates for *Leptospira* spp. infectious are observed in the Midwest region, such as  
231 in Mato Grosso do Sul state with 98,8% , as well as in the Northeast where the occurrence  
232 of rain, and variations in humidity and climate are linked to higher prevalence of  
233 leptospirosis [35].

234         Considering *Leptospira* spp. infectious worldwide distribution, some Latin  
235 American countries, such as Venezuela, have high prevalence (80.51%) and the  
236 predominance of the Sejroe serogroup (Fig.1) [6]. Lower prevalence was observed in Peru  
237 (2.6%), but the study was conducted during the dry season, which decreases the  
238 environmental conditions for bacterial survival, as well as its transmission [11]. Similar  
239 results were observed in Colombia (16.4 – 60.9%) and Mexico (28.4-52%) [5,36,37,38].  
240 However, 75% of the Chilean herds are positives for leptospirosis, i.e. the disease is widely  
241 spread in dairy farms [39]. The presence of *Leptospira* spp. infected cows on a high density  
242 may contribute to environmental contamination and disease dissemination, since they may  
243 act as reservoirs becoming a source of infection to other animals living in the same  
244 environment [9,40].

245         The serogroups Pomona (3.2%), Sejroe (3.1%) and Icterohaemorrhagiae (0.6%)  
246 were the most predominant in our study. The state of Santa Catarina is known for  
247 intensive breeding of pigs, being common the practice of dairy activity in the same  
248 property. It is known that the pigs are considered hosts of maintenance of the serogroup

249 Pomona, Bratislava and Tarrasovi, allowing the infection of bovines [41]. According to  
250 Mughini Gras et al. [42], cattle can act as reservoirs of serovar Hardjoprajitno (serogroup  
251 Sejroe); and the occurrence of the serogroups Icterohaemorrhagiae and Pomona is linked to  
252 animal contact with different animal species, that acts as reservoirs [10]. Studies  
253 demonstrated a higher frequency of serovar Hardjoprajitno in cows [43], and reported that  
254 brown rat (*Rattus norvegicus*) acts as reservoir for the serovar Copenhageni (serogroup  
255 Icterohaemorrhagiae), the third most prevalent group in this study [44]. However, other  
256 studies reported that serogroup Icterohaemorrhagiae as the most seroreactive in bovines  
257 [10]. Cattle are more often infected by the serovars Pomona, Hardjoprajitno, and  
258 Grippotyphosa in accordance to our findings [45,46]. It is important to emphasize that  
259 serogroup Shermani did not react in serological tests performed in this study, which  
260 disagrees to Silva et al. [14] and Chiebao et al. [23] that found a prevalence of 8.85 and  
261 24% for *Leptospira* spp. in cows from the state of Maranhão and Amazonas (Northern  
262 Brazil), respectively.

263         While studying the risk factors associated with *Leptospira* spp. infection, we found  
264 that animals with access to river water showed more chances to be seropositive  
265 (OD=4.45), as well as properties with more time in the business (6-15 years; OR=3.49).  
266 Indicating that animals with chronic infections and longer time in the property are  
267 contributing factors to the spread and maintenance of leptospirosis in these herds [47]. The  
268 animals usually become infected when young, developing chronic infection as they grow  
269 older, excreting renal leptospire in the environment [46]. These results are linked to  
270 possible water contamination by other animals (domestic or wild) [13] in their farm or  
271 others [43], corroborating with the results obtained by Fracois Barbagelata et al. [48], that  
272 isolated viable *Leptospira* spp. in the water source in Argentina. Serogroups as  
273 Icterohaemorrhagiae and Pomona are excreted by the urinary tract [20] and they may  
274 contribute to disease dissemination [10]. Thus, the presence of viable leptospire in the  
275 environment, added to the presence of others animal acting as reservoirs, in the same  
276 pastoral area, may contribute directly to disease dissemination [43]. Moreover, in adequate  
277 conditions of humidity and temperature, *Leptospira* spp. can survive by years in the  
278 environment [46]. A study conducted by Giraldo de León [49] identified several species of  
279 *Leptospira* in water and sewer sources of swine properties in Colombia, acting as vehicle

280 for bacteria and contributing to disease dissemination. In this way, it is evident that the  
281 association between environmental and climatic conditions exerts an important role for  
282 maintenance of the bacterium in the environment.

283         Considering only the univariate analysis, crossbreed cows are more prone to  
284 infection by leptospirosis, indicating a direct relationship with herd's technification. On the  
285 other hand, seropositivity for leptospirosis is more prevalent in beef cattle herds compared  
286 to milk cattle herds [50,51]. In the multivariate analyses, we observed that dog access  
287 pasture and rodent contact with cattle feed propitiate animal seropositivity. The presence of  
288 dogs is epidemiologically important, especially regarding the predominance of serogroup  
289 Sejroe, Icterohaemorrhagiae and Canicola [10,23,44,52]. Serovar Grippytyphosa is one of  
290 the most common causes of clinical leptospirosis in dogs in Germany [53], and rural North  
291 America [54]. Grippytyphosa is maintained by a number of small rodent species, and the  
292 occurrence of it in dogs is largely dictated by the occurrence of these hosts [54].

293         According to Lins and Lopes [55], food sharing among bovines can be an important  
294 risk factor for infection. It is important to emphasize that this practice is commonly used in  
295 the west of Santa Catarina, since the food is provided in feeders. In this study, farms with  
296 rodents that had contact with cattle feed showed 1.54 more chances to be seropositive for  
297 *Leptospira* spp. According to Garousi et al. [24], milk cattle herds were commonly  
298 seropositives for serogroup Icterohaemorrhagiae, Grippytyphosa and Sejroe.

299         In this study, we observed that cows seropositives for *Leptospira* spp. had 8% more  
300 chances to develop reproductive disorders. It is important to reinforce that infectious to  
301 *Leptospira* spp. has a chronic presentation in bovines, and it can cause severe reproductive  
302 problems such as abortion, stillbirth and low fertility [19,20]. Statistically, there was a  
303 tendency to serovar Hardjoprajitno be involved in the occurrence of reproductive problems,  
304 in accordance to what was observed by Lilenbaum et al. [21], Vasconcellos et al. [50] and  
305 Minero et al. [57]. It occurs because bovines are considered maintenance hosts of the  
306 serovars Hardjoprajitno and Hardjobovis, which are transmitted directly among bovines  
307 being associated with reproductive failure [19,57], suggesting the need of improved  
308 sanitary practices, in order to reduce the occurrence of these problems.

309         *Leptospira* spp. infectious is a low prevalent disease in dairy herds of the West  
310 region of Santa Catarina state. The presence of dogs in cattle pasture, as well as the direct

311 contact of rodents with cattle feed were considered associated factors for leptospirosis in  
312 these herds. As a consequence, these factors highly predispose the occurrence of  
313 reproductive problems in dairy cattle due to the Sejroe serogroup (main the of sorovar  
314 Hardjoprajitno) of *Leptospira interrogans*, leading to disease and economic losses.

315

### 316 **Ethics Committee**

317 The experimental protocol was approved by the Committee of Ethics and Animal  
318 Welfare at the Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), under protocol number  
319 1.25.15.

320

### 321 **REFERENCES**

322 [1] Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).  
323 <https://www.embrapa.br/gado-de-leite>, 2016 (accessed: 10.02.17).

324

325 [2] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Anuário Estatístico.  
326 <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao>, 2015 (accessed: 10.02.17).

327

328 [3] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Anuário Estatístico.  
329 <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao.IBGE/abate-leite-couro-ovos>, setembro 2016 (accessed:  
330 10.02.17).

331

332 [4] P. Gädicke, G. Mont, Factors related to the level of occurrence of bovine abortion in  
333 Chilean dairy herds, Preventive Veterinary Medicine 110 (2013) 183–189.

334

335 [5] C. Méndez, L. Benavides, A. Esquivel, A. Aldama, D. Torres, D. Gavaldón, P.  
336 Meléndez, L. Moles, Pesquisa serológica de *Leptospira* em roedores silvestres, bovinos,  
337 equinos y caninos en el noreste de México, Revista Salud Animal 35 (2013) 25–32.

338

339 [6] F. Gonzalez Gontafalla, S. Rivera Pirela, Characterization of bovine leptospirosis in  
340 Venezuela, brief review of the disease, Revista Electronica de Veterinaria 16 (2015).

341

- 342 [7] F.J. Guitián, F.J. García-Peña, J. Oliveira, M.L. Sanjuána, E. Yusa, Serological study of  
343 the frequency of leptospiral infections among dairy cows in farms with suboptimal  
344 reproductive efficiency in Galicia, Spain, *Veterinary Microbiology* 80 (2001) 275-284.  
345
- 346 [8] M. Fávero, S.R. Pinheiro, S.A. Vasconcellos, Z.M. Morais, F. Ferreira, J.S. Ferreira  
347 Neto, Leptospirose bovina: variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no  
348 período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 estados do Brasil, *Arquivos do Instituto*  
349 *Biológico* 68 (2001) 29–35.  
350
- 351 [9] W. Lilenbaum, G.N. Souza, Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de  
352 Janeiro, Brazil, *Res. Vet. Sci.* 75 (2003) 249-251.  
353
- 354 [10] S.M. Suepaul, C.V. Carrington, M. Campbell, G. Borde, A.A. Adesiyun,  
355 Seroepidemiology of leptospirosis in livestock in Trinidad, *Tropical Anim. Health and*  
356 *Prod.* 43 (2011) 367–375.  
357
- 358 [11] Ch.F. Arias, A.F. Suárez, L.W. Huanca, G.H. Rivera, S.J. Camacho, M.T. Huanca,  
359 Prevalence of bovine leptospirosis at two localities in Puno during the dry season and  
360 determination of risk factors, *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru* 22 (2011)  
361 167-170.  
362
- 363 [12] F. Fornazari, R.C. Da Silva, V.B. Richini-Pereira, H.E. Beserra, M.C. Luvizotto, H.  
364 Langoni, Comparison of conventional PCR, quantitative PCR, bacteriological culture and  
365 the Warthin starry technique to detect *Leptospira* spp. in kidney and liver samples from  
366 naturally infected sheep from Brazil, *J. of Microbiol. Methods* 90 (2012) 321-326.  
367
- 368 [13] B. Adler, A. de la Penã Moctezuma, *Leptospira* and leptospirosis, *Vet. Microbiol.* 140  
369 (2010) 287–296.  
370

- 371 [14] F.J. Silva, W.L.F. Conceição, J.J. Fagliari, R.J.S. Girio, R.A. Dias, M.R. Borba, L.A.  
372 Mathias, Prevalence and risk factors of bovine leptospirosis in the State of Maranhão,  
373 Brazil, *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 32 (2012) 303-312.  
374
- 375 [15] R.T. Salvador, J.M. Beltran, N.S. Abes, C.A. Gutierrez, C.N. Mingala, Prevalence and  
376 risk factors of subclinical mastitis as determined by the California Mastitis Test in water  
377 buffaloes (*Bubalis bubalis*) in Nueva Ecija, Philippines, *J. Dairy Sci.* 95 (2012) 1363–1366.  
378
- 379 [16] M. Picardeau, Diagnosis and epidemiology of leptospirosis, *Médecine et Maladies*  
380 *Infectieuses* 43 (2013) 1–9.  
381
- 382 [17] M. Saito, S.Y. Villanueva, Y. Kawamura, K. Lida, J. Tomida, T. Kanemaru, E. Kohno,  
383 S. Miyahara, A. Umeda, K. Amako, N.G. Gloriani, S. Yoshida, *Leptospira idonei* sp. nov.,  
384 isolated from environmental water, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63 (2013) 2457-2462.  
385
- 386 [18] E.U. Andersen-Ranberg, C. Phipps, P.M. Jensen, Global patterns of leptospira  
387 prevalence in vertebrate reservoir hosts, *Journal of Wildlife Diseases* 52 (2016) 468–477.  
388
- 389 [19] W. Lilenbaum, G. Martins, Leptospirosis in cattle: a challenging scenario for the  
390 understanding of the epidemiology, *Transbound. Emerg. Dis.* 61 (2014) 63–68.  
391
- 392 [20] W.A. Ellis, *Animal Leptospirosis, Microbiology and Immunology* 387 (2015) 99-  
393 137.  
394
- 395 [21] W. Lilenbaum, M.R.C Santos, Leptospirose em reprodução animal: III. Papel do  
396 sorovar Hardjo nas leptospiroses bovinas no Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Lat. Amer.*  
397 *Microbiol.* 37 (1995) 87-92.  
398
- 399 [22] S. Faine, B. Adler, C. Bolin, P. Perolat, *Leptospira and Leptospirosis*, second ed.,  
400 *MedSci*, Melbourne, Austrália, 2000.  
401



- 402 [23] D.P. Chiebao, S.Y.O.B. Valadas, A.H.H. Minervino, V. Castro, A.H.C.N. Romaldini,  
403 A.S. Calhau, R.A.B. de Souza, S.M. Gennari, L.B. Keid, R.M. Soares, Variables  
404 Associated with Infections of Cattle by *Brucella abortus*, *Leptospira* spp. and *Neospora*  
405 spp. in Amazon Region in Brazil, *Transboundary and Emerging Diseases* 62 (2015) e30-  
406 e36.  
407
- 408 [24] M.T. Garoussi, J. Vand-e-Useefee, J. Mehrzad, Seroprevalence of leptospiral infection  
409 in rodents of dairy cattle herds complexes in suburb of mashhad – Iran, *J. Applied Anim.*  
410 *Res.* 30 (2006) 109-111.  
411
- 412 [25] R. Pascoeti, N.M. Soldá, T.R. Sczesny, G. Machado, C.Z. Reginato, G. Camillo, F.F.  
413 Vogel, F.J. Simioni, L.S. Lopes, J.F. Fávero, A.S. da Silva, Parasites in dairy cattle farms in  
414 southern Brazil, *Rev. MVZ Córdoba* 21 (2016) 5304-5315.  
415
- 416 [26] (OIE) Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, Leptospirosis,  
417 World Organization for Animal Health, Paris, 2014.  
418
- 419 [27] P.S. Pinto, H. Libonati, B. Penna, W. Lilenbaum, A systematic review on the  
420 Microscopic Agglutination Test: Seroepidemiology of bovine leptospirosis in Latin  
421 America, *Trop. Anim. Health and Production* 48 (2015) 239-248.  
422
- 423 [28] G. Martins, W. Lilenbaum, The panorama of animal leptospirosis in Rio de Janeiro,  
424 Brazil, regarding the seroepidemiology of the infection in tropical regions, *BMC Veterinary*  
425 *Research* 9 (2013) 237.  
426
- 427 [29] R. Plank, D. Dean, Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of  
428 *Leptospira* spp. in humans, *Microbes and Infection* 2 (2000) 1265-1276.  
429
- 430 [30] (OIE) Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, sexta ed., World  
431 Organization for Animal Health, Paris, 2012.  
432

- 433 [31] D.Y. Otaka, G. Martins, C. Hamond, B. Penna, M.A. Medeiros, W. Lilenbaum,  
434 Serology and PCR for bovine leptospirosis: herd and individual approaches, *Vet. Rec.* 170  
435 (2012) 338.
- 436
- 437 [32] C. Hamond, G. Martins, A.P. Loureiro, C. Pestana, R. Lawson-Ferreira, M.A.  
438 Medeiros, W. Lilenbaum, Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate  
439 diagnosis of leptospirosis in livestock, *Vet. Res. Commun.* 38 (2014) 81–85.
- 440
- 441 [33] W. Pasqualotto, S. Sehnem, C. Winck, Occurrence of Infectious Bovine  
442 Rhinotracheitis (IBR), Bovine Viral Diarrhea (BVD) and Leptospirosis (LEP) in dairy  
443 cattle in the western region of the state of Santa Catarina Brasil, *Revista em Agronegócio e*  
444 *Meio Ambiente* 8 (2015) 249-270.
- 445
- 446 [34] E.R.D.A. Paim, A.Z. Ciuffa, D.O. Gomes, L.M. Rezende, D.M. Silva, B.C. Pires, L.P.  
447 Cuccato, T.F.M. Dos Reis, A.M.C. Lima, Leptospirosis in dairy cattle in Ipameri, state of  
448 Goiás, Brazil, *Semina: Ciências Agrárias* 37 (2016) 1937-1946.
- 449
- 450 [35] A.O. Figueiredo, A.O. Pellegrin, V.S.P. Gonçalves, E.B. Freitas, L.A.R.C. Monteiro,  
451 J.M. de Oliveira, A.L.A.R. Osório, Prevalência e fatores de risco para a leptospirose em  
452 bovinos de Mato Grosso do Sul, *Pesq. Vet. Bras.* 29 (2009) 375-381.
- 453
- 454 [36] A. Geovanny, Z. León, Factores de riesgo asociados a leptospirosis em hatos bovinos  
455 de Pereira, 2002–2005, *Investigaciones Andina*, 11 (2009) 108–117.
- 456
- 457 [37] J.E. Ochoa, A. Sánchez, I. Ruiz, Epidemiología de la leptospirosis en una zona andina  
458 de producción pecuária, *Revista Panamericana de Salud Publica* 7 (2000) 325–331.
- 459
- 460 [38] J.C. Segura-Correa, D. Domínguez-Díaz, R. Avalos-Ramírez, J. Arguez-Sosa,  
461 Intraherd correlation coefficients and design effects for bovine viral diarrhoea, infectious  
462 bovine rhinotracheitis, leptospirosis and neosporosis in cow–calf system herds in North-  
463 eastern Mexico, *Preventive Veterinary Medicine* 96 (2010) 272–275.

- 464 [39] M. Salgado, B. Otto, E. Sandoval, G. Reinhardt, S.A. Boqvist, S. A., Cross sectional  
465 observational study to estimate herd level risk factors for *Leptospira* spp. serovars in small  
466 holder dairy cattle farms in southern Chile, *BMC Veterinary Res.* 10 (2014) 126.  
467
- 468 [40] W.A. Ellis, Leptospirosis as a cause of reproductive failure, *The Veterinary clinics of*  
469 *North America Food Anim. Practice* 10 (1994) 463-478.  
470
- 471 [41] K. Strutzberg-Minder, Routine diagnostics of porcine leptospirosis - An update,  
472 *Praktische Tierarzt* 93 (2012) 1128-1137.  
473
- 474 [42] L. Mughini-Gras, L. Bonfanti, A. Natale, A. Comin, A. Ferronato, E. La Greca, T.  
475 Patregnani, L. Lucchese, S. Marangon, Application of an integrated outbreak management  
476 plan for the control of leptospirosis in dairy cattle herds, *Epidemiology and Infection* 142  
477 (2014) 1172–1181.  
478
- 479 [43] F.C.S. Oliveira, S.S. Azevedo, S.R. Pinheiro, C.S.A. Batista, Z.M. Moraes, G.O.  
480 Souza, A.P. Gonçalves, S.A. Vasconcellos, Risk factors associated with leptospirosis in  
481 cows in the state of Bahia, northeastern Brazil, *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30 (2010).  
482 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2010000500004>.  
483
- 484 [44] R.A. Hartskeert, W.J. Terpstra, Leptospirosis in wild animals, *Vet. Q.* 18 (1996)  
485 S159–S160.  
486
- 487 [45] A. Espí, J.M. Prieto, M. Fernandez, M. Alvarez, Serological prevalence to six  
488 leptospiral serovars in cattle in Asturias (Northern Spain), *Epidemiology & Infection* 124  
489 (2000) 599-602.  
490
- 491 [46] P.N. Levett, Leptospirosis, *Clin. Microbiol. Rev.* 14 (2001) 296-326.  
492

- 493 [47] K. Kirkimbayeva, B. Lozowicka, K. Biyashev, N. Sarsembaeva, G. Kuzembekova, A.  
494 Paritova, Leptospirosis in cattle from markets of Almaty province, Kazakhstan, Bull Vet.  
495 Institute Pulawy 59 (2015) 29-35.  
496
- 497 [48] S. Francois Barbagelata, B. Brihuega Fernández, S. Grune Loffler, V. Gattarello  
498 Marcos, D. Correa Pérez, J. Petrakovsky Melillo, Gualtieri Serragatta, C. M.A. de Luca,  
499 2013. Isolation of *Leptospira borgpetersenii* in water sources in Argentina, Revista Cubana  
500 de Medicina Tropical 65 (2013) 177-184.  
501
- 502 [49] G. Giraldo de León, A. Orrego Uribe, M. Santacruz, E. Yepes, Leptospirosis. The  
503 waters from the swine farm as vehicles of *Leptospira*, at the central coffee growers area of  
504 Colombia, Archivos de Medicina Veterinaria 34 (2002) 79-87.  
505
- 506 [50] S.A. Vasconcellos, O. Barbarini Júnior, O. Umehara, Z.M. Morais, A. Cortez, S.R.  
507 Pinheiro, F. Ferreira, A.C.M. Fávero, J.S. Ferreira Neto, Leptospirose bovina: níveis de  
508 ocorrência e sorotipo predominantes em rebanhos dos estados de Minas Gerais, São Paulo,  
509 Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, no período de janeiro a  
510 abril de 1996, Arquivos Instituto Biológico 64 (1997) 7-15.  
511
- 512 [51] J.M. Sanhueza, C. Heuer, D. West, Contribution of *Leptospira*, *Neospora caninum* and  
513 bovine viral diarrhoea virus to fetal loss of beef cattle in New Zealand, Preventive  
514 Veterinary Medicine 112 (2013) 90-98.  
515
- 516 [52] P.S. Pinto, H. Libonati, W. Lilenbaum, A systematic review of leptospirosis on dogs,  
517 pigs, and horses in Latin America, Trop. Anim. Health and Production 49 (2017) 231–238.  
518
- 519 [53] V. Geisen, C. Stengel, S. Brem, W. Muller, C. Greene, K. Hartmann, Canine  
520 leptospirosis infections – clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira*  
521 serogroups (42 cases), J. Small Anim. Pract. 48 (2007) 324-328.  
522

- 523 [54] G. André-Fontaine, Canine leptospirosis: do we have a problem? *Vet. Microbiol.* 117  
524 (2006) 19–24.  
525
- 526 [55] Z.C. Lins, M.L. Lopes, Isolation of *Leptospira* from wild forest animals in Amazonian  
527 Brazil, *Trans. R. Soc. Tropical Med. Hyg.* 78 (1984) 124-126.  
528
- 529 [56] A.L.B.B. Mineiro, E.E.A. Bezerra, S.A. Vasconcellos, F.A.L. Costa, N.A. Macedo,  
530 Infecção por leptospira em bovinos e sua associação com transtornos reprodutivos e  
531 condições climáticas, *Arquivo Brasileiro Med. Vet. Zootec.* 59 (2007) 1103–1109.  
532
- 533 [57] D.L. Grooms, Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea vírus and  
534 leptospirosis, *Theriagenol.* 66 (2006) 624-628.  
535
- 536 [58] A.A. Oliveira, R.A. Mota, G.C.Pereira, H. Langoni, M.I. Souza, W.A. Navegantes,  
537 M.E. Sá, Seroprevalence of bovine leptospirosis in Garanhuns Municipal District,  
538 Pernambuco State, Brazil, *Onderstepoort J. of Veterinary Res.* 68 (2001) 275–279.  
539
- 540 [59] A.E. Marques, W.V. Rocha, W.M.E.D. de Brito, M.C.S. Fioravanti, I.M. Parreira,  
541 V.D.S. Jayme, Prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. e aspectos epidemiológicos  
542 da infecção em bovinos do Estado de Goiás, *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia 11 (2010)  
543 607-617.  
544
- 545 [60] A.D.M. Aguiar, S.M. Gennari, G.T. Cavalcante, M.B. Labruna, S.A. Vasconcellos,  
546 A.A.R. Rodrigues, Z.M. Moraes, L.M.A. Camargo, Seroprevalence of *Leptospira* spp in  
547 cattle from Monte Negro municipality, western, *Pesq. Vet. Bras.* 26 (2006) 102-104.  
548
- 549 [61] A.P. Lage, R.M.H. Leite, J.A. Thompson, D.A. Bandeira, G.P. Herrmann, E.C.  
550 Moreira, V.S.P. Gonçalves, Serology for *Leptospira* sp. in cattle of the State of Paraíba,  
551 Brazil, *Arquivos do Instituto Biológico* 74 (2007) 185–190.  
552

553 [62] C. Alfaro, Y. Aranguren, A. Clavijo, C. Díaz, Prevalencia serológica de leptospirosis  
554 en ganado doble propósito del noreste de Monagas, Venezuela, *Zootecnia Tropical* 22  
555 (2004) 117-124.

556

557 [63] C.L.R.M. Pimenta, V. Castro, I.J. Clementino, C.J. Alves, L.G. Fernandes, A.W.L.  
558 Brasil, C.S.A.B. Santos, S.S. Azevedo, Bovine leptospirosis in Paraíba State: Prevalence  
559 and risk factors associated with the occurrence of positive herds, *Pesquisa Veterinária*  
560 *Brasileira* 34 (2014) 332-336.

561

562 [64] G.P. Herrmann, R.O. Rodrigues, G. Machado, A.P. Lage, E.C. Moreira, R.C. Leite,  
563 Seroprevalence of leptospirosis in cattle in the southeast and southwest regions of the state  
564 of Rio Grande do Sul, Brazil, *Ciência Anim. Brasileira* 13 (2012) 131-138.

565

566 [65] H. Langoni, L.R. Meireles, S. Gottschalk, K.G. Cabral, A.V. da Silva, Perfil  
567 sorológico da Leptospirose bovina em regiões do Estado de São Paulo, *Arqs. Inst.*  
568 *Biológico, São Paulo* 67 (2000) 37-41.

569

570 [66] J. Van Balen, S.A. Hoest, G. D' Pool, M. Gil, F. Escalona, D. Díaz, Análisis  
571 retrospectivo de las pruebas diagnósticas de leptospirosis bovina procesadas en la unidad de  
572 investigación y diagnóstico de leptospirosis de la Universidad del Zulia, 1998–2001,  
573 *Revista Científica*, 19 (2009) 598–606.

574

575 [67] Y. Hashimoto, J. Alves Dias, R.T. Chideroli, J.C. Alves Barbara, T.B. Brunharo, L.  
576 Hermes Dutra, M.C. Pessôa Silva, E. Eckhardt Muller, J.C. de Freitas, Epidemiological  
577 status of bovine leptospirosis in the State of Paraná, Brazil, *Semina: Ciências Agrárias* 36  
578 (2015) 4341-4356.

579

580

581

582

583

584 **Table 1:** Univariate analysis of risk factors associated to *Leptospira* spp infection in dairy  
 585 cattle, Southern Brazil.

Variables	Frequency %(n)/Median	<i>p</i> – value	OR (IC 95%)
<b>Water source</b>			
Natural	65.08 (809)	-	-
River	8.85 (110)	0.001	4.43 (2.05-13.28)
Lake	18.74 (232)	0.12	1.38 (0.92-2.12)
Chlorinated water	7.32 (91)	<0.001	0.20 (0.13-0.32)
<b>Years of farming</b>			
Up to 5	4.02 (50)	0.12	1.62 (0.84-2.98)
6- 15	27.27 (339)	<0.001	3.49 (1.71-6.92)
> 15	68.70 (854)	-	-
<b>Age (years)</b>	2	0.12	0.86 (0.72-1.04)
<b>Number pregnancy</b>			
From 1 to 2	42.23 (525)	-	-
From 2 to 3	33.70 (419)	0.37	0.86 (0.62-1.19)
From 3 to 4	9.57 (119)	0.30	1.34 (0.78-2.41)
More than 5	11.98 (149)	0.81	1.05 (0.66-1.73)
<b>Diet</b>			
Pasture	1.36 (16)	-	-
Pasture and feed	92.51 (1150)	0.24	0.30 (0.01-1.48)
Concentrate	6.11 (76)	0.06	0.90 (0.004-0.48)
<b>Dogs access to pasture</b>			
Yes	81.74 (1016)	-	-
No	18.26 (227)	0.001	0.54 (0.38-0.76)
<b>Breed</b>			
Holstein	67.34 (837)	-	-
Jersey	18.58 (231)	0.001	1.93 (1.29-3.03)
Mixed	12.23 (152)	<0.001	2.77 (1.61-5.14)
<b>Animal introduction</b>			
Purchased	72.88 (906)	-	-
Replaced	26.79 (333)	0.59	1.09 (0.78-1.49)
<b>Rodents access to cattle food</b>			
Yes	85.35 (1061)	0.01	1.76 (1.12-2.89)
No	14.56 (181)	-	-

587 **Table 2:** Multivariate analysis of risk factors associated to *Leptospira* spp infection in dairy  
 588 cows, Southern Brazil.

Variables	Estimate ( $\beta$ )	<i>p</i> – value	OR (CI: 95%)
<b>Dogs access to pasture</b>			
Yes	11.92	<0.001	1.71 (1.21-2.41)
No	-	-	-
<b>Rodents access to feed</b>			
Yes	3.42	0.05	1.54 (1.00-2.54)
No	-	-	-

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

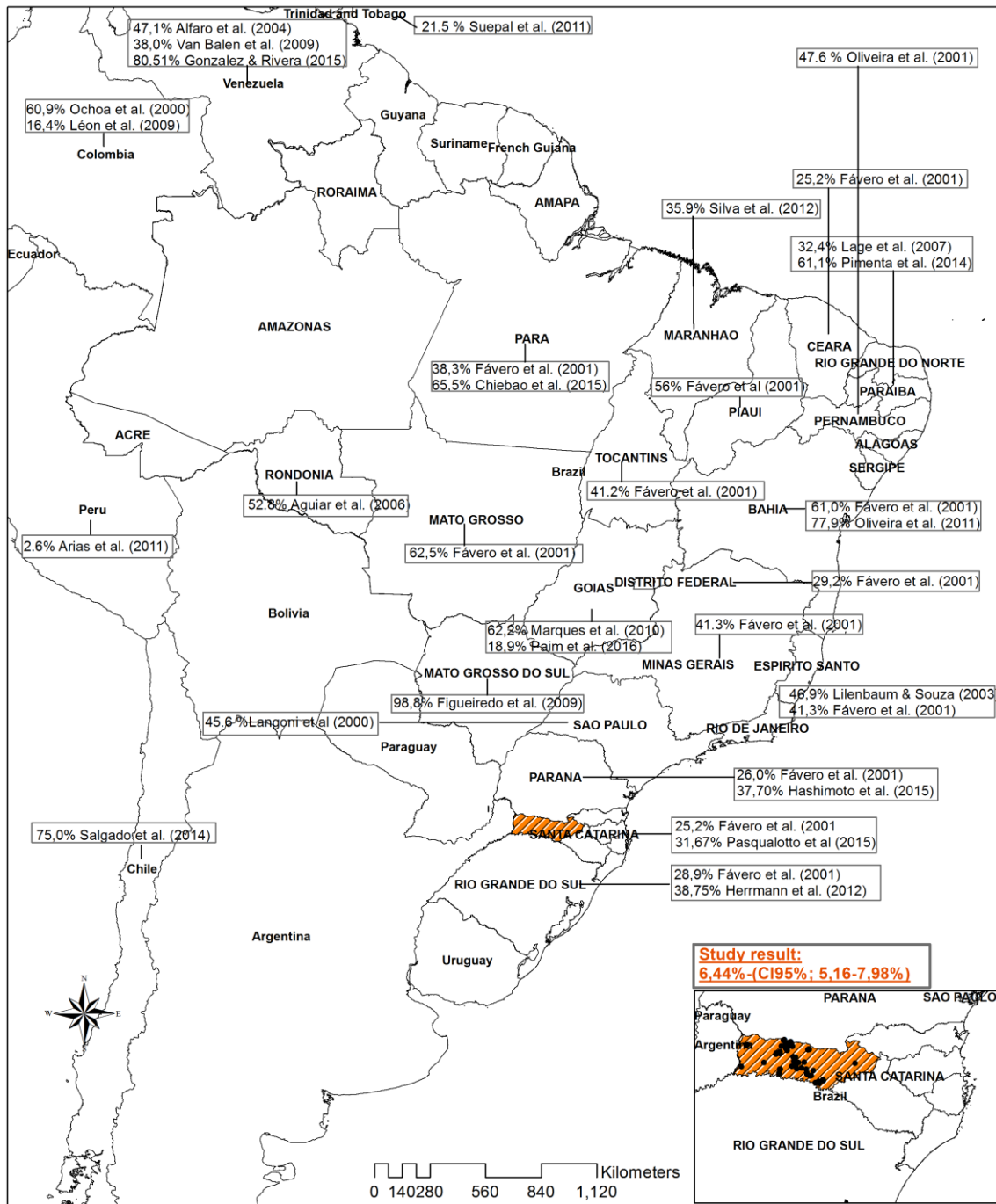
609

610

611

612





615 **Figure 1:** Map of South America showing the prevalence of dairy bovine leptospirosis  
 616 found in many published reports. Also, Brazilian states indicating reports regarding this  
 617 disease in the last 16 years (2000-2016). Santa Catarina state was divided into six regions,  
 618 and the West part is indicated in striped orange in addition to the localization of the studied  
 619 farms (points). Note: Fávero et al. [8], Herrmann et al. [64], Pasqualotto et al. [33],

620 Hashimoto et al. [67], Lilenbaum and Souza [9], Langoni et al. [65], Paim et al. [34],  
621 Figueiredo et al. [35], Marques et al. [59], Silva et al. [14], Oliveira et al. [43], Oliveira et  
622 al. [58], Lage et al. [61], Pimenta et al. [63], Chiebao et al. [23], Aguiar et al. [60],  
623 Gonzalez and Rivera [6], Suepal et al. [10], Arias et al. [11], Geovanny and León [36],  
624 Ochoa et al. [37], Salgado et al. [39], Alfaro et al. [62], Van Balen et al. [66].

## 2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo avaliou a prevalência da neosporose e da leptospirose bovina no Oeste de Santa Catarina, Brasil, direcionando para a bovinocultura de leite. Os fatores de risco para a manutenção da neosporose e os fatores associados com a leptospirose nas propriedades foram identificados e relacionados com a causa-efeito das doenças nos animais. Permitindo assim verificar que ambas as doenças são prevalentes nos bovinos de leite, passando muitas vezes despercebidas pelos proprietários devido à falta de diagnóstico do rebanho.

Estes fatores sugerem a adoção de práticas de manejo dentro da propriedade, dando ênfase ao acesso de outras espécies animais às pastagens dos bovinos e ao contato de cães e roedores com o alimento, uma vez que estes foram identificados como carreadores dos agentes etiológicos de ambas as infecções.

Ficou clara a relação destas doenças com a manifestação de problemas reprodutivos nos bovinos, sendo responsável pelas grandes perdas econômicas no setor, bem como a frequência em que ocorrem.

Mais pesquisas devem ser realizadas a fim de elucidar claramente as medidas de controle e prevenção efetivas para a neosporose e leptospirose, como medidas profiláticas e programas vacinais, a fim de evitar maiores prejuízos para a cadeia produtiva do leite.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADLER, B., DE LA PEÑA, M.A. **Leptospira and Leptospirosis**. *Veterinary Microbiological*. v.27, p. 287-296. Janeiro, 2010. Disponível em < <http://www-sciencedirect-com.ez74.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0378113509001163>> Acesso em: 28 de dezembro de 2016.

AGAMPODI, S.B., et al., Utility of quantitative polymerase chain reaction in leptospirosis diagnosis: association of level of leptospiremia and clinical manifestations in Sri Lanka. **Clinical Infectious Diseases**. v.54, p. 1249–1255. Fevereiro, 2012. Disponível em < <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/cis035>> Acesso em: 28 de dezembro de 2016.

AGUADO-MARTÍNEZ, et al., Usefulness of rNcGRA7- and rNcSAG4-based ELISA tests for distinguishing primo-infection, recrudescence, and chronic bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**. v.157, p. 182-195, Novembro 2008. Disponível em < <http://www-sciencedirect-com.ez74.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0304401708004068>> Acesso em: 10 de setembro de 2016

AGUIAR, D.M., et al., Prevalence of anti-Neospora caninum antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. **Veterinary Parasitology**. v.142, p. 71-77, Novembro 2006. Disponível em < <http://www-sciencedirect-com.ez74.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S030440170600361X>> Acesso em: 10 de setembro de 2016.

AHMED, A., et al. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *leptospira* species in clinical materials. **PLoS One**. v.4, p. e7093. Agosto 2009. Disponível em< <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0007093> > Acesso em: 15 de janeiro de 2017.

ALVAREZ-GARCIA, G., et al., Serological diagnosis of bovine neosporosis: a comparative study of commercially available ELISA tests. **Veterinary Parasitology**. v.198, p. 85–95, Novembro 2013. Disponível em < <http://www-sciencedirect-com.ez74.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S030440171300438X>> Acesso em: 12 de outubro de 2016.

ANDERSON, M.L. Infectious causes of bovine abortion during mid- to late-gestation. **Theriogenology** v.68, p. 474-486, Agosto 2007. Disponível em <<http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.theriogenology.2007.04.001>> Acesso em: 29 de dezembro de 2016.

ANDRE-FONTAINE, G., et al., Comparison of the efficacy of three commercial bacterins in preventing canine leptospirosis. **Veterinary Record**. v.153, p. 165–9, Agosto 2003. Disponível em <<https://wwwscopuscom.ez74.periodicos.capes.gov.br/record/display.uri?eid=2-s2.0-0042975420&origin=resultslist&sort=plf-f&s>> Acesso em: 29 de dezembro de 2016.

ARIAS, CH.F., et al., Prevalence of bovine leptospirosis at two localities in Puno during the dry season and determination of risk factors. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru**. v.22, p. 167-170. Julho 2011. Disponível em <<https://www-scopus-com.ez74.periodicos.capes.gov.br/record/display.uri?eid=2-s2.0-84859511768&origin=resultslist&sort=plf-f&>> Acesso em: 10 de janeiro de 2017.

ASMARE, K., et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* and associated risk factors in intensive or semi-intensively managed dairy and breeding cattle of Ethiopia. **Veterinary Parasitology**. v.193, p. 85-94. março 2013.

BARTHI, A.R., et al., Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**. v.3, p. 757-71, Dezembro 2003. Disponível em <<http://infection.thelancet.com>> Acesso em: 12 de janeiro de 2017.

BIEN, J.; MOSKWA, B.; CABAJ, W. In vitro isolation and identification of the first *Neospora caninum* isolate from European bison (*Bison bonasus bonasus* L.). **Veterinary Parasitology**. v.173, p. 200–205, Outubro 2010. Disponível em <<http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.vetpar.2010.06.038>> Acesso em: 21 de outubro de 2016.

BJERKÅS, I.; DUBEY, J.P. Evidence that *Neospora caninum* is identical to the *Toxoplasma*-like parasite of Norwegian dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica**. V.32, p. 407–410. 1991. Disponível em <<https://wwwncbinlmnihgov.ez74.periodicos.capes.gov.br/pubmed/1814191>> Acesso em: 12 de novembro de 2016.

BJERKÅS, I.; MOHN, S.F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Parasitology Research**. v.70, p. 271–274, Março 1984. Disponível em < DOI: 10.1007/BF00942230 > Acesso em: 20 de novembro de 2016.

BJERKÅS, I.; PRESTHUS, J. Immunohistochemical and ultrastructural characteristics of a cyst-forming sporozoon associated with encephalomyelitis and myositis in dogs. **Acta Pathological et Microbiologica Immunologica Scandinavica**. v.96, p. 445–454, 1988.

BLACKSELL, S.D., et al. Limited diagnostic capacities of two commercial assays for the detection of *Leptospira* Immunoglobulin M antibodies in Laos. **Clinical and Vaccine Immunology**. v.13, p. 1166–1169, Outubro 2006. Disponível em <<http://cvi.asm.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/content/13/10/1166>> Acesso em: 28 de novembro de 2016.

BOLIN, C.A.; PRESCOTT, J.F. Leptospirosis. In: Howard JL, editor, Smith RA, Assoc. editor, **Current veterinary Therapy Food Animal Practice**. 4th ed. WB Saunders Co. 352–8. 1999.

BRICKELL, J.S.; MCGOWAN, M.M.; WATHES, D.C. Association between *Neospora caninum* seropositivity and perinatal mortality in dairy heifers at first calving. **Veterinary Record**. v.167, p. 82–85, 2010. Disponível em<<http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1136/vr.c3583>> Acesso em: 24 de setembro de 2016.

BUXTON, D.; MCALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**. v.18, p. 546–552. Dezembro 2002. Disponível em<[http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S1471-4922\(02\)02414-5](http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S1471-4922(02)02414-5)> Acesso em: 20 de novembro de 2016.

CANTÓN, G.J., et al. Cytokine expression in the placenta of pregnant cattle after inoculation with *Neospora caninum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.161, p. 77–89. Setembro 2014. Disponível em<<http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.vetimm.2014.07.004>> Acesso em: 20 de novembro de 2016.

CARDWELL, J.M., et al. Assessing the impact of tailored biosecurity advice on farmer behaviour and pathogen presence in beef herds in England and Wales. **Preventive Veterinary Medicine**. v.135, p. 9-16. Dezembro 2016. Disponível em<<http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.prevetmed.2016.10.018>> Acesso em: 20 de novembro de 2016.

CERQUEIRA, G.M.; PICARDEAU, M. A century of Leptospirosis strain typing. **Infection Genetic Evolution**. v.9, p. 760-768. Setembro 2009. Disponível em< <http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.meegid.2009.06.009>> Acesso em: 20 de novembro de 2016.

CONRAD, P.A., et al. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.5, p. 572–578. Outubro 1993. Disponível em< <http://journals.sagepub.com.ez74.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1177/104063879300500412>> Acesso em: 20 de novembro de 2016.

CÔRTEZ, J.A. Aspectos epidemiológicos e ecológicos da leptospirose. **Anais 3º Encontro Nacional em Leptospirose**, Rio de Janeiro, p. 53-57. 1993.

CORBELLINI, L.G., et al. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.103, p. 195–202. Janeiro 2002. Disponível em< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S03044401701006008>> Acesso em: 10 de outubro de 2016.

CUMBERLAND, P.; EVERARD, C.O.; LEVETT, P.N. Assessment of the efficacy of an IgM-elisa and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.61, p. 731-734. Novembro 1999. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ez74.periodicos.capes.gov.br/pubmed/10586903>> Acesso em: 3 de fevereiro de 2017.

DARÍO CEDEÑO, Q.; BIBIANA BENAVIDES, B. Seroprevalence and risk factors associated to *Neospora caninum* in dairy cattle herds in the municipality of Pasto, Colombia. **Revista MVZ Cordoba**. v.18, p. 3311-3316. 2003. Disponível em< <https://www-scopus-com.ez74.periodicos.capes.gov.br/record/display.uri?eid=2-s2.0-84879224537&origin=resultslist&sort=plf-f&src>> Acesso em: 20 de novembro de 2016.

DAVISON, H.C.; OTTER, A.; TREES, A.J. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. **International Journal for Parasitology**. v.29, p. 1683–1689. Outubro 1999. Disponível em< [http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0020-7519\(99\)00129-0](http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0020-7519(99)00129-0)> Acesso em: 23 de outubro de 2016.

DE BRITO, T., et al. Detection of leptospirosis antigen (*L. interrogans* serovar copenhageni serogroup Icterohemorrhagiae) by immunoelectron microscopy in the liver and kidney of experimentally infected guinea pigs. **International Journal of Experimental Pathology** v.73, p. 633-642. 1992.

DE LA PENA-MOCTEZUMA, A., et al. Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar hardjo: *Leptospira interrogans* subtype hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* Subtype hardjobovis. **FEMS Microbiology Letters**. v.177, p. 319–26. 1999. Disponível em < [http://onlinelibrary-wiley-com.ez74.periodicos.capes.gov.br/resolve/doi?DOI=10.1016/S0378-1097\(99\)00333-X](http://onlinelibrary-wiley-com.ez74.periodicos.capes.gov.br/resolve/doi?DOI=10.1016/S0378-1097(99)00333-X) > Acesso em: 20 de dezembro de 2016.

DESAKORN, V., et al. Accuracy of a commercial IgM Elisa for the diagnosis of human leptospirosis in Thailand. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.86, p. 524–7. Agosto 2011. Disponível em < <http://www.ajtmh.org/content/86/3/524> > Acesso em: 20 de janeiro de 2017.

DIJKSTRA, T., et al. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. **International Journal for Parasitology**. v.31, p. 209–215. Fevereiro 2001. Disponível em < [http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0020-7519\(00\)00160-0](http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0020-7519(00)00160-0) > Acesso em: 23 de novembro de 2016.

DIJKSTRA, T., et al. 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, p. 747–752. Junho 2001. Disponível em < [http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0020-7519\(01\)00230-2](http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0020-7519(01)00230-2) > Acesso em: 23 de novembro de 2016.

DIKKEN, H.; KMETY, E. Serological typing methods of leptospire. In: Bergan T, Norris J, eds. **Methods in microbiology**. London: Academic Press p. 259–307. 1978. Disponível em < <http://dx.doi.org/10.17765/2176-9168.2015v8n2p249-270> > Acesso em: 23 de janeiro de 2017.

DUBEY, J.P. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**. v.32, p. 929-946. Julho 2002. Disponível em < [http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0020-7519\(02\)00094-2](http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0020-7519(02)00094-2) > Acesso em: 23 de novembro de 2016.



DUBEY, J.P. et al. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v.193, p. 1259–1263. Novembro 1988. Disponível em< <https://www-scopus-com.ez74.periodicos.capes.gov.br/record/display.uri?eid=2-s2.0-0024289279>> Acesso em: 20 de novembro de 2016.

DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**. v.41, p. 1–16. Março 2003. Disponível em< <https://www-ncbi-nlm-nih-gov.ez74.periodicos.capes.gov.br/pubmed/12666725>> Acesso em 23 de novembro de 2016.

DUBEY, J.P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**. v.134, p. 267–289. Maio 2006. Disponível em< <http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.jcpa.2005.11.004>> Acesso em: 23 de novembro de 2016.

DUBEY, J.P., et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v.192, p. 1269–1285. Maio 1988. Disponível em< <https://www-ncbi-nlm-nih-gov.ez74.periodicos.capes.gov.br/pubmed/3391851>> Acesso em 20 de dezembro de 2016.

DUBEY, J.P., et al. Congenital transmission of *Neospora caninum* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Veterinary Parasitology**. v.196, p. 519–522. Setembro 2013. Disponível em< <http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.vetpar.2013.03.004>> Acesso em: 23 de novembro de 2016.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**. v.67, p. 1-59. Dezembro 1996. Disponível em< [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(96\)01035-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(96)01035-7)> Acesso em: 23 de novembro de 2016.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals: the last five years. **Veterinary Parasitology**. v.180, p. 90–108. Agosto 2011. Disponível em< <http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.vetpar.2011.05.031>> Acesso em: 23 de novembro de 2016.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiological Reviews**. v.20, p. 323-367. Abril 2007. Disponível em< <http://cmr.asm.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/content/20/2/323>> Acesso em 23 de novembro de 2016.

DUBEY, J.P., et al. Biologic morphologic, and molecular characterisation of neospora caninum isolates from littermate dogs. **International Journal of Parasitology**. v.34, p. 1157-1167. Setembro 2004. Disponível em< <http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.ijpara.2004.07.005>> Acesso em: 23 de novembro de 2016.

EFFLER, P.V., et al. Evaluation of eight rapid screening tests for acute leptospirosis in Hawaii. **Journal of Clinical Microbiology**. v.40, p. 1464–1469. Abril 2002. Disponível em< <http://jcm.asm.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/content/40/4/1464>> Acesso em 3 de fevereiro de 2017.

ELLIS, W.A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**. v.10, p. 463- 478. Novembro 1994. Disponível em< <https://www-ncbi-nlm-nih-gov.ez74.periodicos.capes.gov.br/pubmed/7728630>> Acesso em: 3 de fevereiro de 2017.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (**EMBRAPA**). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/gado-de-leite>> Acesso em: 03 de fevereiro de 2017.

FAINE, S., et al. *Leptospira* and leptospirosis (2nd edn.), **Medisci, Melbourne, Australia**. 272 p. 1999.

FÁVERO, A.C.M., et al. Leptospirose bovina: variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 estados do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.8, n.2, p. 29–35. Julho/Dezembro 2001. Disponível em< <http://revistas.bvs-vet.org.br/arqib/article/download/25827/26715>> Acesso em: 3 de fevereiro de 2017.

FÁVERO, A.C.M., et al. Serovares de *Leptospiras* prevalentes em exames sorológicos de bubalinos, bovinos, caprinos, equinos, suínos e cães de diversos Estados brasileiros. **Ciência Rural**. v.32, n.4, p. 613-619. 2002. Disponível em< <http://www.scielo.br/pdf/cr/v32n4/a11v32n4.pdf>> Acesso em: 3 de fevereiro de 2017.

FERROGLIO, E., et al. Antibodies to *Neospora caninum* in wild animals from Kenya, East Africa. **Veterinary Parasitology**. v.118, p. 43–49. Dezembro 2003. Disponível em< <http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.vetpar.2003.09.006>> Acesso em: 13 de dezembro de 2016.

FIGUEIREDO, A. O. et al. Prevalência, fatores de risco para a leptospirose em bovinos de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.29, n.5, ISSN 375-381. Maio 2009. Disponível em< <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2009000500003> > Acesso em: 3 de fevereiro de 2017.

GÄDICKE, P., et al. Economic effect bovine abortion syndrome in commercial dairy herds in Southern Chile. **Preventive Veterinary Medicine**. v.97, p. 9-19. Outubro 2013. Disponível em< <http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.prevetmed.2010.07.008>> Acesso em: 3 de fevereiro de 2017.

GIBNEY, E.H., et al. The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death. **International Journal for Parasitology**. v.38, p. 579–588. Abril 2008. Disponível em< <http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.ijpara.2007.09.015>> Acesso em: 13 de dezembro de 2016.

GONDIM, L.F., et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**. v.34, p. 159–161. Fevereiro 2004. Disponível em< <http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.ijpara.2004.01.001>> Acesso em: 13 de novembro de 2016.

GONDIM, L.S.Q., et al. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.168, p. 121–124. Fevereiro 2010. Disponível em< <http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.vetpar.2009.09.055>> Acesso em: 23 de outubro de 2016.

GOODSWEN, S.J., et al. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. **Infection, Genetics and Evolution**. v.13, p. 133–150. janeiro 2013. Disponível em< <http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.meegid.2012.08.012>> Acesso em: 23 de outubro de 2016.

GUIDO, S., et al. Serology-Based Diagnostics for the Control of Bovine Neosporosis. **Trends in Parasitology**. v.32, p. 131-143. Fevereiro 2016. Disponível em< <http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.pt.2015.11.014>> Acesso em: 13 de novembro de 2016.

HEMPHILL, A., et al. A European perspective on *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**. v.30, p. 877–924. Julho 2000. Disponível em< [http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0020-7519\(00\)00072-2](http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0020-7519(00)00072-2)> Acesso em: 23 de novembro de 2016.

HEMPHILL, A., et al. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. **Parasitology**. v.133, p. 261–278. Setembro 2006. Disponível em< <https://doi.org/10.1017/S0031182006000485>> Acesso em: 20 de dezembro de 2016.

HOLLER, L.D. Ruminant abortion diagnostics. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v.28, p. 407-418. Novembro 2012. Disponível em< <http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.cvfa.2012.07.007>> Acesso em: 21 de janeiro de 2017.

HORNOK, S., et al. Canine neosporosis in Hungary: screening for seroconversion of household, herding and stray dogs. **Veterinary Parasitology**. v.137, p. 197–201. Abril 2006. Disponível em< <http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.vetpar.2006.01.030>> Acesso em: 13 de dezembro de 2016.

HOVIND-HOUGEN, K. Determination by means of electron microscopy of morphological criteria of value for classification of some spirochetes, in particular treponemes. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica - Section B: Microbiology and Immunology**. v.84, 41p. 1976.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Anuário Estatístico**. 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Anuário Estatístico**. Setembro 2016. Disponível em< [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao...IBGE/abate-leite-couro-ovos\\_201602caderno](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao...IBGE/abate-leite-couro-ovos_201602caderno)> Acesso em: 3 de fevereiro de 2016.

KASHIWAZAKI, Y., et al. Seroepidemiology of neosporosis in dairy cattle in Uruguay. **Veterinary Parasitology**. v.120, p. 139-144. Fevereiro 2004. Disponível em< <http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.vetpar.2004.01.001>> Acesso em: 21 de dezembro de 2016.

KESHAVARZI, H., et al. Abortion studies in Iranian dairy herds: I. Risk factors for abortion. **Livestock Science**. v.195, p. 45-52. Janeiro 2017. Disponível em< <http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.livsci.2016.11.004>> Acesso em: 3 de fevereiro de 2016.

KING, J.S., et al. Australian dingoes are definitive host of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**. v.40, p. 945–950. Julho 2010. Disponível em< <http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.ijpara.2010.01.008>> Acesso em: 13 de dezembro de 2016.

KUSUM, M., et al. Comparison of leptospiral serovars identification by serology and cultivation in north-eastern region, Thailand. **Journal of the Medical Association of Thailand**. v.88, p. 1098–1102. Agosto 2005. Disponível em< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ez74.periodicos.capes.gov.br/pubmed/16404838>> Acesso em: 15 de janeiro de 2017.

LANGSTON, C.E., et al. Leptospirosis a re-emerging zoonotic disease. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal**. v.33, p. 791-807. Julho 2003. Disponível em< [http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0195-5616\(03\)00026-3](http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0195-5616(03)00026-3)> Acesso em: 30 de janeiro de 2017.

LEVETT, P.N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**. v.14, n.2, p. 296-326. Abril 2001. Disponível em< <http://cmr.asm.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/content/14/2/296>> Acesso em: 20 de dezembro de 2016.

LEVETT, P.N. et al. Surveillance of leptospiral carriage by feral rats in Barbados. **West Indian Medical Journal**. v.47, p. 15–17. Março 1998. Disponível em< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ez74.periodicos.capes.gov.br/pubmed/9619090>> Acesso em: 20 de dezembro de 2016.

LIMMATHUROTSAKUL, D. et al. Fool's gold: why imperfect reference tests are undermining the evaluation of novel diagnostics: a re-evaluation of 5 diagnostic tests for leptospirosis. **Clinical Infection Diseases**. v.55, p. 322–331. Abril 2012. Disponível em< <https://doi.org/10.1093/cid/cis403>> Acesso em: 20 de janeiro de 2017.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **American Journal of Veterinary Research**. v.50, p. 1981-1983. Novembro 1989. Disponível em< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ez74.periodicos.capes.gov.br/pubmed/2694869>> Acesso em: 20 de dezembro de 2016.

LISTA-ALVES, D. et al. Serological evidence of *Neospora caninum* in dual-purpose cattle herds in Venezuela. **Veterinary Parasitology**. v.136, p. 347-349. Março 2006. Disponível em< <http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.vetpar.2005.11.027>> Acesso em: 13 de novembro de 2016.

MATTHIAS, M.A.; LEVETT, P.N. Leptospiral carriage by mice and mongooses on the island of Barbados. **West Indian Medical Journal**. v.51, p. 10–13. 2002. Disponível em< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ez74.periodicos.capes.gov.br/pubmed/12089866>> Acesso em 20 de janeiro de 2017.

MARTIM, L.; PETTIT, A. Sero-diagnostic de la spirochaetose ictero-haemorrhagique. **Bull Mem soc Med Hop Paris**. v. 42, p. 672-5. 1918.

MAYBERRY, C. et al. Reproductive implications of exposure to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in western grey kangaroos (*Macropus fuliginosus ocydromus*). **Journal of Wildlife Diseases**. v.50, p. 364–368. Abril 2014. Disponível em< <http://www.jwildlifedis.org/doi/10.7589/2013-03-064?code=wdas-site>> Acesso em: 20 de dezembro de 2016.

MCALLISTER, M.M. et al. Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.8, p. 355–357. Julho 1996. Disponível em< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ez74.periodicos.capes.gov.br/pubmed/8844580>> Acesso em: 23 de dezembro de 2016.

MCALLISTER, M.M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora Caninum*. **International Journal of Parasitology**. 28, 1473–1478. Setembro 1998. Disponível em< [http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0020-7519\(98\)00138-6](http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0020-7519(98)00138-6)> Acesso em: 18 de novembro de 2016.

MCALLISTER, M.M. Diagnosis and control of Bovine Neosporosis. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**. v.32, p. 443-463. Julho 2016. Disponível em< <http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.cvfa.2016.01.012>> Acesso em: 23 de novembro de 2016.

MCCANN, C.M., et al. Lack of serologic evidence of *Neospora caninum* in humans, England. **Emerging Infectious Diseases**. v.14, p. 978–980. Junho 2008. Disponível em< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ez74.periodicos.capes.gov.br/pubmed/18507920>> Acesso em: 23 de dezembro de 2016.

MAZUZ, M.L., et al. Neosporosis in naturally infected pregnant dairy cattle. **Veterinary Parasitology**. v.20, p. 85-91. Setembro 2014. Disponível em< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440171400346X>> Acesso em: 15 de outubro de 2016.

MERIEN, F., et al. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. **FEMS Microbiology Letters**. v.249, p. 139–147. Janeiro 2006. Disponível em< <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.06.011>> Acesso em: 23 de janeiro de 2017.

MONTE, L.G., et al. Molecular characterization of virulent *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae isolated from *Cavia aperea*. **Acta Tropica**. v.126, p. 164–6. Maio 2013. Disponível em <<http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.actatropica.2013.02.009>> Acesso em: 23 de janeiro de 2017.

MOORE, D.P. Neosporosis in South America. **Veterinary Parasitology**. v.127, p. 87-97. Janeiro 2005. Disponível em <<http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.vetpar.2004.10.001>> Acesso em: 23 de dezembro de 2016.

MOORE, D.P., et al. Risk factors associated with *Neospora caninum* infections in cattle in Argentina. **Veterinary Parasitology**. v.161, p. 122–125. Abril 2009. Disponível em< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ez74.periodicos.capes.gov.br/pubmed/19216028>> Acesso em: 30 de novembro de 2016.

MORÉ, G., et al. Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. **Veterinary Parasitology**. v.160, p. 51–54. Março 2009. Disponível em< <http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.vetpar.2008.10.081>> Acesso em: 20 de novembro de 2016.

NAIMAN, B.M., et al. Protective Killed *Leptospira borgpetersenii* Vaccine Induces Potent Th1 Immunity Comprising Responses by CD4 and  $\gamma\delta$  T Lymphocytes. **Infection and Immunity**. v. 69, p. 7550-7558. Dezembro 2001. Disponível em< <http://iai.asm.org/content/69/12/7550.full.pdf+html>> Acesso em: 3 de fevereiro de 2017.

NEVERAUSKAS, C.E., et al. Prevalence and distribution of *Neospora caninum* in water buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle in the Northern Territory of Australia. **Parasitology International**. v.64, p. 392-396. Outubro 2015. Disponível em<<http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.parint.2015.05.009>> Acesso em: 20 de outubro de 2016.

PARISH, S.M., et al. Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v.191, p. 1599-600. Dezembro 1987. Disponível em< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ez74.periodicos.capes.gov.br/pubmed/3693018>> Acesso em: 20 de outubro de 2016.

PASQUALOTTO, W., et al. Incidência de rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), diarreia viral bovina (BVD) e leptospirose em bovinos leiteiros da região oeste de Santa Catarina – Brasil. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, Maringá (PR). v.8, n.2, p. 249-270, 2015. Disponível em< <http://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/rama/article/view/3034>> Acesso em 3 de fevereiro de 2017.

PASTER, B.J., et al. Phylogenetic analysis of the spirochetes. **Journal of Bacteriology**. v.173, p. 6101-6109. Outubro 1991. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ez74.periodicos.capes.gov.br/pubmed/1917844>> Acesso em: 23 de dezembro de 2016.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecine et Maladies Infectieuses**. v.43, p. 1-9. Janeiro 2013. Disponível em< <http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.medmal.2012.11.005>> Acesso em: 20 de dezembro de 2016.

PULIDO-MEDELLÍN, M.O., et al. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en un Hato Lechero de Boyacá, Colombia. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**. v.27, n.2, p. 355-362. 2016. Disponível em< <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/veterinaria/article/view/11658>> Acesso em: 20 de outubro de 2016.

RADOSTITIS, O.M.. et al. Veterinary medicine, 10th edn. **Saunders, Elsevier**, p.1094–1102. 2007.



REICHEL, M.P., et al. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – the billion dollar question. **International Journal for Parasitology**. v.43, p. 133–142. Fevereiro 2013. Disponível em< <http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.ijpara.2012.10.022>> Acesso em: 20 de dezembro de 2016.

REICHEL, M.P., et al. If control of *Neospora caninum* infection is technically feasible does it make economic sense? **Veterinary Parasitology**. 142, 23–34. Novembro 2006. Disponível em< <http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.vetpar.2006.06.027>> Acesso em: 20 de dezembro de 2016.

RODRIGUEZ, I., et al. Survey of *Neospora caninum* antibodies in dairy and beef cattle from five regions of the United States. **Veterinary Therapeutics**. v.3, p. 396–401. 2002. ISSN: 15283593.

RODRÍGUEZ, A.M., et al. Frequency of *Neospora caninum* infections in beef cow-calf operations under extensive management. **Veterinary Parasitology**. v. 219, p. 40-43. Março 2016. Disponível em< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401716300279>> Acesso em: 10 de outubro de 2016.

ROJO-MONTEJO, S., et al. Isolation and characterization of a bovine isolate of *Neospora caninum* with low virulence. **Veterinary Parasitology**. v.159, p. 7–16. Janeiro 2009. Disponível em< <http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.vetpar.2008.10.009>> Acesso em 23 de outubro de 2016.

ROJO-MONTEJO, S., et al. Effect of vaccination of cattle with the low virulence Nc-Spain 1H isolate of *Neospora caninum* against a heterologous challenge in early and mid-gestation. **Veterinary Research**. v.44, p. 106. Outubro 2013. Disponível em< <http://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/1297-9716-44-106>> Acesso em: 20 de outubro de 2016.

SAITO, M., et al. *Leptospira idonii* sp. nov., isolated from environmental water. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.63, p. 2457-2462. Julho 2013. Disponível em< <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journ>> Acesso em: 4 de janeiro de 2017.

SALGADO, M., et al. Cross sectional observational study to estimate herd level risk factors for *Leptospira* spp. serovars in small holder dairy cattle farms in southern Chile. **BMC Veterinary Research**. v.10, p. 126. Junho 2014. Disponível em< <http://bmcvetres.biomedcentral.com.ez74.periodicos.capes.gov.br/articles/10.1186/1746-6148-10-126>> Acesso: 20 de dezembro de 2016.

SILVA, F.J., et al. Prevalence and risk factors of bovine leptospirosis in the State of Maranhão, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.32, n.4, p. 303-312. Abril 2012. Disponível em< <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012000400006>> Acesso em: 23 de dezembro de 2016.

SILVA, M.I.S., et al. Fatores de riscos associados à infecção por *Neospora caninum* em matrizes bovinas leiteiras em Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**. v.9, n.2, 455–461. 2008. Disponível em<<https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/1203>> Acesso em: 13 de novembro de 2016.

SOUSA, M.E., et al. Seroprevalence and risk factors associated with infection by *Neospora caninum* of dairy cattle in the state of Alagoas, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.32, n.10, p. 1009-1013. 2012. Disponível em< <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012001000011>> Acesso em: 20 de outubro de 2016.

TEIXEIRA, W.C., et al. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* (Apicomplexa: Sarcocystidae) em bovinos leiteiros de propriedades rurais em três microrregiões no estado do Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.30, n.9, p. 729-734. Setembro 2010. Disponível em< <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2010000900004> > Acesso em: 20 de outubro de 2016.

TERPSTRA, W.J., 1992. Typing leptospira from the perspective of a reference laboratory. **Acta Leidensia**. v.60, p. 79–87. Disponível em< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ez74.periodicos.capes.gov.br/pubmed/1485498>> Acesso em: 20 de dezembro de 2016.

THIERMANN, A.B. Experimental leptospiral infections in pregnant cattle with organisms of the Hebdomadis serogroup. **American Journal of Veterinary Research**. v.43, p. 780-784. Maio 1982. Disponível em< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ez74.periodicos.capes.gov.br/pubmed/7091839>> Acesso em: 16 de janeiro de 2017.

THIERMANN, A.B. Leptospirosis: current developments and trends. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v.184, p. 722-725. Março 1984. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ez74.periodicos.capes.gov.br/pubmed/6725107>> Acesso em: 16 de janeiro de 2017.

TREES, A.J., et al. Serological evidence implicating *Neospora* species as a cause of abortion in British cattle. **Veterinary Record**. v.134, p. 405–407. 1994. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ez74.periodicos.capes.gov.br/pubmed/8036769>> Acesso em: 10 de novembro de 2016.

VIJAYACHARI, P., et al. Evaluation of darkground microscopy as a rapid diagnostic procedure in leptospirosis. **Indian Journal Medicine Research**. v.114, p. 54–58. Agosto 2001. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ez74.periodicos.capes.gov.br/pubmed/11785451>> Acesso em: 16 de janeiro de 2017.

WILLIAMS, D.; WINDEN, S.V. Risk factors associated with high bulk milk antibody levels to common pathogens in UK dairies. **Veterinary Record**. v.174, p. 580. Abril 2014. Disponível em <<http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1136/vr.102049>> Acesso em: 20 de outubro de 2016.

WILLIAMS, D.J., et al. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* – how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. **Parasitology**. v.136, p. 1895–1900. Agosto 2009. Disponível em <<https://doi.org/10.1017/S0031182009990588>> Acesso em: 24 de outubro de 2016.

YAEGER, M.J.; HOLLER, L.D. Bacterial causes of bovine infertility and abortion. **Current Therapy in Large Animal Theriogenology** (2nd ed.). p. 389–399. 2007. Disponível em <<http://dx.doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1016/B978-072169323-1.50052-0>> Acesso em: 20 de janeiro de 2017.

## ANEXOS



## CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal da UDESC analisou o(s) projeto(s):

**Protocolo: 1.25.15**

**Título: Toxoplasmose e neosporose em bovinos: identificação de fatores de risco para infecção de rebanho leiteiro do Oeste de Santa Catarina, Brasil.**

**Coordenador/Pesquisador: Aleksandro Schafer da Silva**

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) APROVOU o(s) projeto(s) acima relacionado(s) em seus aspectos éticos e metodológicos, para utilização de animais em pesquisa, de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa no Brasil.

Lages, 02 de outubro de 2015.



Prof. Ubirajara Maciel da Costa  
Coordenador do CETEA/UDESC