

**MARCIO ORIDES DA SILVA**

**PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *Neospora caninum* EM  
MATRIZES SUÍNAS DE REBANHOS COMERCIAIS NO ESTADO DE SANTA  
CATARINA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Barbosa de Moura

**LAGES**

**2017**

Silva, Marcio Orides da

Prevalência de anticorpos contra *Neospora caninum* em matrizes suínas de rebanhos comerciais do estado de Santa Catarina/ Marcio Orides da Silva – Lages, 2017.

Inserir paginas

Orientador: Anderson Barbosa de Moura

Inclui bibliografia.

Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado de

Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2017.

1. *Neospora caninum*. 2. Suínos. 3. Prevalência. I. Silva, Marcio Orides da. II. Moura, Anderson Barbosa de. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título

**MARCIO ORIDES DA SILVA**

**PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *Neospora caninum* EM MATRIZES  
SUÍNAS DE REBANHOS COMERCIAIS NO ESTADO DE SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

**Banca examinadora:**

Orientador: \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Anderson Barbosa de Moura  
Universidade do Estado de Santa Catarina- Lages, SC.

Membro: \_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Silvia Cristina Osaki  
Universidade Federal do Paraná – Campus Palotina - PR

Membro: \_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Rosiléia Marinho de Quadros  
Universidade Planalto Catarinense - Lages, SC.

À minha Mãe.

## AGRADECIMENTOS

Graças a Deus, em minha vida tenho muito a agradecer e a muitas pessoas. A Deus que guia meus passos e fortalece meu espírito no constante desafio de permanecer firme na fé. Aos meus familiares em especial à minha Mãe Almerinda Liz da Silva, que pacientemente legou a mim os valores morais e éticos que conduzem e conduzirão minha vida em qualquer situação.

Aos Professores Anderson Barbosa de Moura e Antônio Pereira de Souza que me orientaram desde a iniciação científica até o mestrado, que acreditaram na minha capacidade e entenderam minhas dificuldades me ajudando a ultrapassar cada obstáculo, e por seus exemplos profissional e ético. Agradeço também à professora Amélia Aparecida Sartor que sempre nos auxiliou no laboratório tanto no aspecto profissional como pessoal.

Ao professor José Cristani e aos bolsistas do setor de Suinocultura, que auxiliaram na colheita das amostras e na execução deste projeto.

Aos meus amigos, que pacientemente me ajudaram a superar todos os obstáculos físicos e pessoais me fazendo acreditar que as dificuldades eram passageiras – e realmente eram. Cito os mais próximos e peço desculpas se esqueci alguém: Alexandre B. Bueno, José A. Broggi, João G. Machado, Romeu R. Thomé, Eduardo C. Correa, e a todos os amigos que fiz em minha vida e que de alguma forma de ajudaram a chegar até aqui. Aos amigos que fiz em anos de convívio no Laboratório de Doenças Parasitárias e Parasitologia, Juliana A. Farias, Marcia S. Lavina, Rodrigo R. Gonzalez e Alessandra Snak.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que me forneceu bolsa de estudos por todo o período de realização do mestrado.

Ao Prof. Ubirajara Maciel da Costa pela cessão do Laboratório de Cultivo Celular do Centro de Diagnóstico em Microbiologia Animal (CEDIMA) do CAV/UDESC.

A todos os que de alguma forma me ajudaram e que por ventura eu tenha omitido agradeço profundamente

Muito Obrigado.

## **RESUMO**

SILVA, M. O. Prevalência de Anticorpos contra *Neospora caninum* em matrizes suínas de rebanhos comerciais no estado de Santa Catarina - Dissertação (Mestrado em Ciência Animal - Área de concentração: Saúde Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2017.

Neosporose é uma doença que acomete ruminantes, equinos, suínos e animais selvagens, causando transtornos reprodutivos e prejuízos econômicos. A importância da infecção em suínos ainda não está totalmente elucidada. O objetivo do presente trabalho foi verificar a prevalência de anticorpos contra *Neospora caninum* e os possíveis fatores de risco associados à infecção em matrizes suínas de rebanhos comerciais no Estado de Santa Catarina, Brasil. Foram colhidas 498 amostras de sangue em propriedades das regiões Oeste (cinco propriedades) e Sul do Estado (quatro propriedades) e aplicado questionário epidemiológico. Após a obtenção do soro, estes foram testados por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), com ponto de corte de 1:50, utilizando taquizoítos da cepa NC1 do agente como antígeno. As amostras positivas foram diluídas em múltiplos de dois até a máxima titulação reativa. As variáveis foram analisadas por meio dos testes exato de Fisher e do Qui quadrado para verificar correlação com a soroprevalência. A prevalência geral foi de 18,9% (94/498), com recíproca de títulos distribuída da seguinte forma: 27 (1:50), 26 (1:100), 22 (1:200), 10 (1:400), 9 (1:800). Das 256 amostras da região Oeste, 80 (31,3%) foram positivas e das 242 amostras da região Sul, 14 (5,8%), foram positivas. Foi observada diferença estatística significativa ( $p<0,01$ ) entre as prevalências observadas nas granjas avaliadas. Contato com cães ( $OR= 3,97$ ), presença de roedores ( $OR= 7,37$ ) e a fonte de água proveniente de “olho d’água” ou mina ( $OR= 2,38$ ) apresentaram correlação estatística positiva ( $p<0,01$ ) com a soroprevalência. A utilização de tela antiaves foi identificada como fator de proteção para a infecção ( $OR= 0,36$ ). A soroprevalência de anticorpos contra *N. caninum* em rebanhos comerciais de matrizes suínas em Santa Catarina foi de 18,9% (94/498), considerada alta em comparação com outros resultados observados no Brasil.

**Palavras-chave:** *Neospora caninum*, soroprevalência, suínos, RIFI

## **ABSTRACT**

SILVA, M. O. Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* in commercial swine herds in the state of Santa Catarina - Dissertation (Animal Science Master's Degree - Area of Concentration: Animal Health) - State University of Santa Catarina. Animal Science Postgraduate Program, Lages, 2017.

Neosporosis is a disease that affects ruminants, horses, swine and wild animals, causing reproductive disorders and economic losses. The importance of infection in pigs has not yet been fully elucidated. The objective of the present study was to verify the prevalence of antibodies against *Neospora caninum* and the possible risk factors associated with infection in swine herds of commercial herds in the State of Santa Catarina, Brazil. A total of 498 blood samples were collected from western (five properties) and southern (four properties) regions and epidemiological questionnaire was used. After obtaining the serum, they were tested by means of the Indirect Immunofluorescence Reaction (IFAT), with a cut-off point of 1:50, using tachyzoites of the NC1 strain of the agent as antigen. The positive samples were diluted in multiples of two until the maximum reactive titre. The variables were analyzed using Fisher and Chi-square tests to verify correlation with seroprevalence. The overall prevalence was 18.9% (94/498), with a reciprocal distribution of the following: 27 (1:50), 26 (1: 100), 22 (1: 200), 10 (1: 400), 9 (1: 800). Of the 256 samples from the Western region, 80 (31.3%) were positive and 242 samples from the South region, 14 (5.8%), were positive. A significant statistical difference ( $p < 0.01$ ) was observed among the prevalences observed in the evaluated farms. Contact with dogs ( $OR=3,97$ ), presence of rodents ( $OR=7,37$ ), and water source ( $OR=2,38$ ) presented a positive statistical correlation ( $p < 0.01$ ) with seroprevalence. The use of anti-bird screen was identified as a protection factor for infection ( $OR=0,36$ ). The seroprevalence of antibodies against *N. caninum* in commercial swine herds in Santa Catarina was 18.9% (94/498), considered high in comparison with other results observed in Brazil

**Key words:** *Neospora caninum*, seroprevalence, swines, RIFI

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

Figura 1. Ciclo de vida do <i>Neospora caninum</i> .....	25
Figura 2. Mapa do estado de Santa Catarina destacando as regiões Oeste e Sul .....	32

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Resultados da pesquisa de anticorpos contra <i>Neospora caninum</i> (RIFI; $\geq 1:50$ ) em matrizes suínas de rebanhos comerciais no estado de Santa Catarina, Brasil.....	34
Tabela 2. Resultado da sorologia (RIFI, $\geq 1:50$ ) para <i>Neospora caninum</i> em matrizes suínas de duas regiões do Estado de Santa Catarina, Brasil.....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABCS – Associação Brasileira dos Produtores de Suínos  
CASAN – Companhia Catarinense de águas e saneamento  
CAV – Centro de Ciências Agroveterinárias  
CEUA Comitê de Ética e Experimentação Animal  
ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática  
HD – Hospedeiro Definitivo  
HI – Hospedeiro Intermediário  
MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento  
NAT – Teste de Aglutinação de *Neospora*  
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase  
RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta  
SEBRAE – Serviço de Apoio a Micro e Pequena Empresa  
UDESC – Universidade do Estado de Santa Catarina  
UPDs – Unidade Produtora de Leitões Desmamados

## **SUMÁRIO**

1 INTRODUÇÃO .....	21
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1 CICLO BIOLÓGICO .....	25
2.2 SINAIS CLÍNICOS E PATOGENIA.....	27
2.3 DIAGNÓSTICO .....	28
2.4 SOROPREVALÊNCIA DA INFECÇÃO EM SUÍNOS .....	29
3 OBJETIVOS .....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	31
4.1 DESCRIÇÃO DAS PROPRIEDADES .....	31
4.2 SOROLOGIA .....	33
4.3 TRATAMENTO ESTATÍSTICO .....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
6 CONCLUSÕES .....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42
ANEXOS .....	47



## 1 INTRODUÇÃO

A suinocultura ocupa lugar de destaque no setor do agronegócio brasileiro, possuindo o sexto maior rebanho comercial de suínos do mundo, com 39 milhões de cabeças, sendo superado pela Rússia (39,7 milhões), Estados Unidos da América (121,4 milhões), União Europeia (265,8 milhões) e China, que lidera este ranking (1,2 trilhão). Em 2015 o plantel de matrizes suínas do Brasil era de 1.720.255, que produziram cerca de 39.263.954 de suínos para abate naquele ano, gerando um produto interno bruto da suinocultura de R\$ 62,576 bilhões. (ABCS; SEBRAE, 2016).

A região Sul, que concentra 60% do plantel de matrizes suínas e 49% do efetivo total de suínos, com 19,9 milhões de cabeças, caracteriza-se por um sistema de produção com um modelo onde predominam pequenos suinocultores familiares integrados ou cooperados, especializados em determinadas fases da produção (ABCS, 2014) sendo responsável por 66% dos abates no país, somando quase 26 milhões de cabeças (ABCS; SEBRAE, 2016).

O estado de Santa Catarina por sua vez possui o maior número de matrizes suínas do Brasil com um rebanho estimado em 420.488, representando 24,4% do total nacional, seguido pelos estados do Rio Grande do Sul (340.416; 19,8 %), Minas Gerais (273.197; 15,9%) e Paraná (264.371; 16%). No estado de Santa Catarina foram abatidos, em 2015, cerca de 10 milhões de animais, 27% do total nacional, número que deixa o Estado em liderança neste setor, seguida pelos estados do Rio Grande do Sul (7,9 milhões) e Paraná (7,7 milhões) (ABCS; SEBRAE, 2016).

No estado de Santa Catarina a região de maior destaque é a oeste, com aproximadamente 69% do rebanho estadual suíno, seguida das regiões sul (18%), Vale do Itajaí (7%), norte (4%) e Serrana (3%). Consolidando assim a suinocultura como principal atividade econômica do agronegócio catarinense com 33% das granjas e 27% da produção de carne suína nacional (MIELE; WAQUIL, 2002).

Destaca-se também o crescimento de 80% do consumo mundial de carne suína entre os anos de 1995 e 2015. Os países que mais consomem carne suína no mundo são: China, União Europeia, Estados Unidos da América, Rússia, Vietnã e Brasil. A posição alcançada pelo Brasil se deu graças a um acréscimo de 113% no consumo entre os anos de 1995 de 2015, totalizando cerca de 15 quilos “per capita” de consumo de carne suína no país (ABCS; SEBRAE. 2016).

Neste contexto é necessário ressaltar a relevância do controle dos fatores que limitam a produção e rentabilidade com destaque às doenças relacionadas ao aparelho reprodutor e de origem infecciosa tais como: vírus, bactérias e protozoários. No ano de 2015 o gasto total com medicamentos e vacinas na suinocultura nacional ficou em torno de R\$610,2 milhões (ABCS; SEBRAE, 2016).

Destaca-se, neste cenário, a importância de enfermidades emergentes como a neosporose, que é um conhecido causador de transtornos reprodutivos em animais domésticos e selvagens (DUBEY, 2003).

Segundo Waladjo et al. (2009) a neosporose é uma doença cuja importância na espécie suína ainda não está claramente estabelecida. Sua ocorrência pode estar relacionada a casos de aborto, natimortos, retorno ao cio e outras desordens reprodutivas, reduzindo a produção comercial, gerando a necessidade de substituição de matrizes, mesmo que clinicamente sadias. No estado de Santa Catarina não existem trabalhos verificando a prevalência da enfermidade nos rebanhos comerciais, portanto não há informação atualizada sobre a circulação do agente nesta espécie. Nesse contexto é que se considera fundamental verificar a prevalência de suínos infectados por este parasito no referido estado.

O objetivo da realização deste trabalho foi o de verificar a prevalência de anticorpos contra *Neospora caninum* em rebanhos de matrizes comerciais de suínos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A neosporose é causada pelo protozoário *Neospora caninum*, pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozea, ordem Eucoccidiida, família Sarcocystidae (DUBEY et al., 2002), subfamília Toxoplasmatinae (ATKINSON et al., 2000; JENKINS et al., 1999).

Bjerkas; Mohn; Presthus (1984) na Noruega, descreveram cistos teciduais de um protozoário semelhante ao *Toxoplasma gondii* no sistema nervoso central de sete cães com encefalomielite, porém sem anticorpos contra *T. gondii*. Os animais eram de três ninhadas diferentes oriundas de uma única cadela. Dubey et al. (1988) nos Estados Unidos, ao analisarem tecidos do sistema nervoso central de 23 cães, também encontraram cistos teciduais de um protozoário similar em 10 dos 23 animais analisados, nomeando-o *N. caninum*. No mesmo ano, Bjerkas e Presthus sugeriram diferenças ultraestruturais entre *N. caninum* e *T. gondii*. Com as informações obtidas até então foi possível diferenciar *N. caninum* de *T. gondii* por meio de três características fundamentais: 1) Sinais clínicos apresentados como paralisia de membros posteriores, que não foi observada em outros animais com manifestação clínica de toxoplasmose; 2) Cistos teciduais do parasito com morfologia diferente do *T. gondii*, a parede dos cistos teciduais descritos por Bjerkas; Mohn; Presthus (1984) e Dubey et al. (1988) possuíam 1 – 4 µm de espessura enquanto *T. gondii* possuí cistos com paredes mais finas e com tamanho igual ou menor que 0,5 µm de largura e são encontrados em diversos órgãos e 3) Anticorpos contra *T. gondii* não estavam presentes nos cães e os parasitos não reagiram a anticorpos contra *T. gondii* através de testes imunoistoquímicos.

McAllister et al. (1998) descreveram os cães como hospedeiros definitivos do *N. caninum*, ao realizar um experimento onde cães foram alimentados com tecidos de ratos contendo cistos teciduais de *N. caninum*. As fezes desses animais foram examinadas por trinta dias através de técnica de flutuação. No terceiro dia, três cães apresentaram oocistos nas fezes, medindo de 10-11µm de diâmetro. Os oocistos esporularam em três dias e continham dois esporocistos cada um com quatro esporozoítos. Basso et al. (2001) relataram o primeiro caso de um cão naturalmente infectado eliminando oocistos de *N. caninum*.

Posteriormente outros canídeos foram descritos como hospedeiros definitivos do agente como o Coiote (*Canis latrans*), o Dingo Australiano (*Canis lupus dingo*), e o Lobo cinzento (*Canis lupus*) (GONDIM et al., 2004; KING et al., 2010; DUBEY et al., 2011).

O *N. caninum* tem sido encontrado parasitando naturalmente bovinos, caprinos, bubalinos, canídeos, raposas, suínos, coiotes cervídeos e camelos. Infecções experimentais têm sido descritas em suínos, leporinos, felinos, canídeos (raposas, dingo e coiote) e roedores (camundongos, ratos e gerbis) (BASSO et al., 2001).

Outras espécies também têm recebido destaque, sendo discutida a importância do parasito em animais silvestres e seu ciclo no meio selvagem, bem como a importância e a extensão dos danos reprodutivos que pode causar em suínos. Mais estudos são necessários para confirmar a atuação deste protozoário como causa de transtornos reprodutivos em suínos e sua relação com o ciclo selvagem do parasito (GONDIM, 2006; WALADJO et al., 2009).

Jensen et al. (1998) descreveram a primeira infecção experimental em suínos, em seis matrizes prenhas, inoculadas com  $2,5 \times 10^6$  taquizoítos de *N. caninum*, da cepa Nc – SweB e observaram, através da reação de imunofluorescência indireta, a soroconversão em todas as fêmeas. As lesões encontradas nas matrizes foram: necrose multifocal granulomatosa no endométrio, hepatite mononuclear e intralobular, necrose focal no baço e miocardite focal mononuclear. Em três fetos de uma das fêmeas analisadas foram encontradas lesões de necrose multifocal hepática em um dos fetos e em dois deles encefalite, hepatite, miocardite mononuclear, nefrite, pneumonia e necrose multifocal cório-alantóica. Com este trabalho, os autores demonstraram a possibilidade da ocorrência da transmissão transplacentária de *N. caninum* em suínos e sua relação com a dose do inóculo e o estágio da gestação em que ocorre a infecção.

Damriyasa et al. (2004) realizaram a primeira descrição de infecção natural por *N. caninum* em suínos domésticos (*Sus scrofa domesticus*) na Alemanha, ao analisar amostras de soro de 2041 suínos de 94 propriedades diferentes, encontrando um suíno soropositivo. O teste utilizado foi o ELISA seguido de confirmação por Immunoblotting.

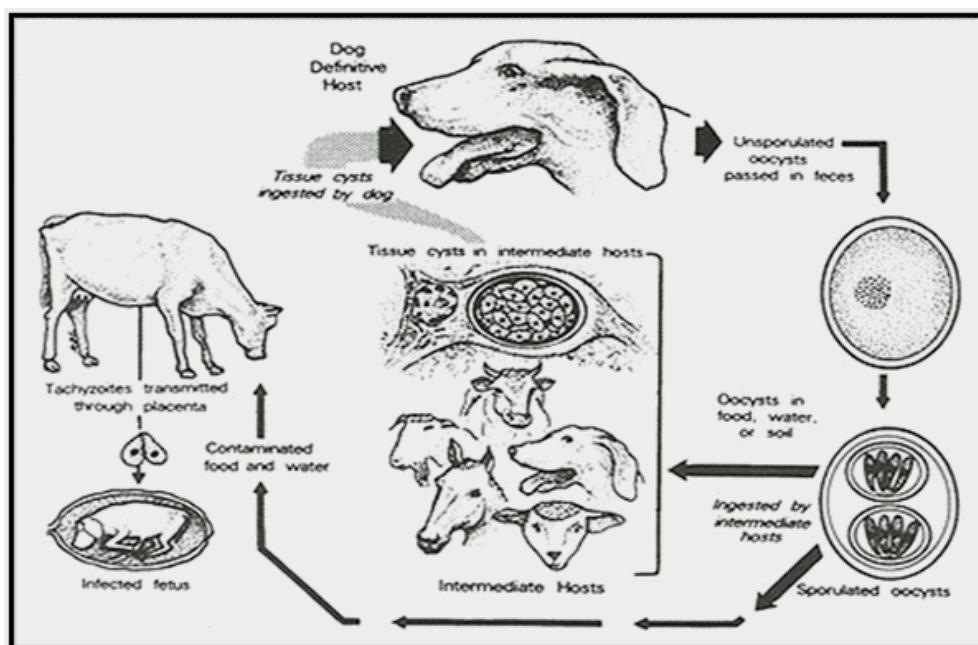
Embora não seja considerada uma zoonose, existem relatos da ocorrência de anticorpos contra o agente em humanos (LOBATO et al., 2006). Experimentos realizados com primatas, inoculados com taquizoítos durante a gestação, demonstraram a transmissão congênita do protozoário. A manifestação clínica da neosporose nesses primatas foi similar à toxoplasmose congênita em seres humanos (BAAR et al., 1991).

## 2.1 CICLO BIOLÓGICO

Como é característica dos membros da família Sarcocystidae, o *N. caninum* apresenta ciclo biológico heteroxeno. No caso do *N. caninum*, seu ciclo é heteroxeno facultativo. Necessita de um hospedeiro definitivo (HD), que são os canídeos, onde ocorre a fase sexuada de reprodução do parasito, após a ingestão de cistos com bradizoítos, e um hospedeiro intermediário (HI), onde ocorre a reprodução assexuada do protozoário (DUBEY; SCHARES, 2011; GONDIM; MINEO; SCHARES, 2017). Atualmente os bovinos são os HI mais pesquisados, devido aos graves prejuízos econômicos advindos de transtornos reprodutivos causados nessa espécie pela neosporose (DUBEY; SCHARES, 2011; REICHEL et al., 2013).

O ciclo de vida dos Sarcocistídeos é complexo e apresenta diferentes estágios de vida em hospedeiros definitivos e intermediários (figura 1) (GONDIM; MINEO; SCHARES, 2017), como oocistos, cistos teciduais (bradizoítos) e taquizoítos (DUBEY et al., 2002).

Figura 1 – ciclo de vida do *Neospora caninum*.



Fonte: Dubey, J. P. 1999. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. J. Am. Vet. Med. Assoc. 214:1160–1163.

Os oocistos são eliminados nas fezes dos canídeos, cerca de quatro a cinco dias após a ingestão dos tecidos contendo cistos do parasito. Apresentam 11,7 µm de tamanho e possuem parede incolor com 0,6 – 0,8 µm de largura. Os oocistos somente adquirem capacidade infectiva após passar pelo processo de esporulação no ambiente, que depende das condições de temperatura e umidade, ocorrendo a partir de 24 horas após sua eliminação.

(MCALLISTER et al., 1998). Os oocistos esporulados contêm dois esporocistos cada um com quatro esporozoítos medindo 6,5 x 2,0 µm (SPEER; DUBEY. 1989; DUBEY et al., 2002) sendo infectivos tanto para carnívoros quanto para herbívoros (DUBEY, 2003). Os cães podem eliminar oocistos mais de uma vez, porém a frequência de eliminação ainda não é conhecida (GONDIM; MCALLISTER; GAO, 2005).

Quando os HIs ingerem os oocistos, ocorre a liberação dos esporozoítos no trato gastrointestinal, que se transformam em taquizoítos e se multiplicam neste local (DUBEY; LINDSAY, 1996).

Os taquizoítos se caracterizam por sua rápida multiplicação por endodiogenia, possuem forma ovoide ou globular, dependendo do seu estágio de divisão, apresentando 3–7x 1,5µm de tamanho (DUBEY et al., 2002). Os taquizoítos que não estão em estágio de divisão têm um tamanho aproximado de 7x 2µm. Possuem a capacidade de invadir ativamente diversos tipos celulares como: células do Sistema Nervoso Central (SNC), macrófagos, fibroblastos, células do endotélio vascular, miócitos, células do epitélio dos túbulos renais e hepatócitos (BJERKÅS; PRESTHUS, 1988; DUBEY et al., 1988; DUBEY et al., 2002) sendo que uma célula pode conter inúmeros taquizoítos localizados no vacúolo parasitóforo no citoplasma da célula ou fora dela (DUBEY et al., 2002). Cada taquizoíto possui núcleo e nucléolo, anel apical, anel polar, roptrias, retículo endotelial rugoso e liso e complexo de Golgi (SPEER; DUBEY, 1989; DUBEY et al., 2002). O tipo de célula em que se multiplicam tem relação com o sinal clínico apresentado pelo animal devido a resposta inflamatória causada por sua multiplicação e a destruição dos tecidos.

Após realizar a multiplicação e invadir cerca de 20 células o taquizoíto passa à forma de bradizoítos para, em seguida, formar o cisto tecidual (MONNEY; HEMPHIL, 2014). Os bradizoítos contidos no interior do cisto tecidual, se multiplicam por endodiogenia, porém mais lentamente. São alongados e possuem praticamente as mesmas organelas existentes nos taquizoítos, porém com um menor número de roptrias e um tamanho aproximado de 8x2µm. Os bradizoítos possuem organelas tipicamente encontradas em outras formas evolutivas similares de coccídeos como pequenos e grandes grânulos densos, roptrias e micronemas. Os cistos teciduais encontram-se principalmente no SNC e na musculatura do HI, e apresentam parede tecidual com aproximadamente 4µm de largura com aparência ondulada e sem projeções (DUBEY et al., 2002).

A transmissão horizontal tem importância epidemiológica no ciclo do *N. caninum*, pois um único canídeo pode eliminar no ambiente cerca de 500.000 oocistos, o que pode infectar um grande números de animais (GONDIM; GAO; MCALLISTER, 2002).

Outra forma de transmissão do protozoário é a vertical, que possui a característica de manter a circulação do agente no rebanho mesmo na ausência do canídeo. São descritos dois tipos de transmissão vertical: a endógena e a exógena. A transmissão endógena é definida pela recrudescência da infecção crônica materna, e a transmissão exógena, ocorre quando a fêmea se infecta durante a gestação. A transmissão vertical pode desencadear o aborto, o nascimento de animais clinicamente sadios, porém cronicamente infectados ou mesmo apresentando sinais clínicos (TREES; WILLIAMS, 2005).

Gondim et al. (2006) ressaltaram a importância do ciclo silvestre do *N. caninum* e sua circulação entre canídeos, roedores e herbívoros silvestres e o risco de contato destes com cães e animais de produção. Esta proximidade tem sido um obstáculo para o controle da doença em animais domésticos.

## 2.2 SINAIS CLÍNICOS E PATOGENIA

Os canídeos normalmente não apresentam sinais clínicos, principalmente quando atuam somente como HD, mas podem comportar-se como hospedeiros intermediários, e também desenvolver a doença. Normalmente os sinais clínicos estão relacionados às lesões causadas pela multiplicação dos taquizoítos (DUBEY et al., 1988). Os principais sinais clínicos apresentados em cães são: diarreia, paresia de membros posteriores, além de sinais neurológicos diversos causados pela encefalomielite (LINDSAY; DUBEY; DUNCAN, 1999).

Em suínos, experimentalmente infectados, foi observada a ocorrência de aborto, natimortalidade, nascimento de animais fracos e animais sadios persistentemente infectados (WALADJO et al., 2009). A principal causa de aborto são as lesões necróticas multifocais fetais e uterinas, causadas pela multiplicação do agente nestes tecidos (JENSEN et al., 1998).

### 2.3 DIAGNÓSTICO

Desde sua descrição em 1988, testes sorológicos vêm sendo desenvolvidos para a detecção de anticorpos contra o agente, sendo ainda possível detectar o parasito por meio de técnicas histológicas e moleculares (ATKINSON et al., 2000).

Os principais métodos sorológicos utilizados são a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Teste de Aglutinação de *Neospora* (NAT), Immunoblotting e Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA). A RIFI é considerada o teste de referência para demonstração de anticorpos contra *N. caninum* (BJÖRKMAN; UGGLA, 1999; ATKINSON et al., 2000). Tanto a RIFI como o ELISA têm apresentado boa especificidade e sensibilidade (CAMILLO et al., 2010).

A pesquisa sorológica de *N. caninum*, associada à ocorrência de problemas reprodutivos, é uma ferramenta importante na definição do possível diagnóstico e controle da incidência do parasito no rebanho (PAZ; LEITE; ROCHA, 2007).

Para a detecção do agente em anexos placentários ou fetos, as técnicas histológicas têm sido uma ferramenta bastante utilizada, sendo que os órgãos de eleição a serem remetidos ao laboratório são cérebro, coração, fígado além de ser recomendado que o material seja enviado juntamente com a placenta e soro sanguíneo da mãe (JENKINS et al., 2002). Atualmente a técnica histológica mais utilizada tem sido a imunohistoquímica, utilizando soro policlonal ou anticorpo monoclonal contra *N. caninum* para localizar e identificar os parasitos (LINDSAY; DUBEY, 2000).

A técnica molecular mais utilizada para diagnóstico é a PCR, que detecta o DNA do protozoário em tecidos de fetos abortados (DUBEY; SCHARES, 2006).

## 2.4 SOROPREVALÊNCIA DA INFECÇÃO EM SUÍNOS

Estudos sobre soroprevalência de anticorpos *N. caninum* em suínos têm sido realizados na Europa, Estados Unidos da América (EUA), Brasil e África. Os valores de prevalência variam de acordo com a região estudada e técnica utilizada, apresentando valores bastante variados.

Damriyasa et al. (2004) na Alemanha, coletaram 2014 amostras em 94 granjas diferentes e detectaram um único animal soropositivo para *N. caninum* através de ELISA e com teste confirmatório de Immunoblotting.

Waladjo et al. (2009), no Senegal, coletaram 60 amostras de matrizes suínas com idade entre cinco e 26 meses, no período de 2006 a 2009, com o objetivo de avaliar as consequências da presença de anticorpos contra *N. caninum* no desempenho reprodutivo. Foi utilizado o teste de ELISA competitivo como método diagnóstico e avaliada a correlação entre a soropositividade, a idade e as características reprodutivas. Dos animais analisados, 58,3% apresentaram soropositividade. O status sorológico das fêmeas apresentou relação ( $P \leq 0,05$ ) com a idade ao primeiro parto e o número anual de partos, bem como a incidência de natimortalidade nas fêmeas soropositivas.

Feitosa et al. (2014) analisando amostras sorológicas de 190 suínos abatidos na região Nordeste do Brasil, detectaram seis animais positivos para *N. caninum*, um coeficiente de 3,2%, por meio da RIFI (1:50).

Azevedo et al. (2010) analisando amostras sorológicas de suínos abatidos em abatedouro público na cidade de Patos, no estado da Paraíba, verificaram uma prevalência de 3,1% (4/130) por meio de RIFI (1:50).

Vários são os estudos recentes acerca do *N. caninum*, principalmente em ruminantes, tanto no âmbito mundial quanto no Brasil. Porém, pouco ainda se sabe de sua ocorrência e prevalência em suínos no Brasil, e no estado de Santa Catarina.

### 3 OBJETIVOS

Geral:

Verificar a prevalência de anticorpos contra *N. caninum* em matrizes suínas de granjas comerciais do estado de Santa Catarina.

Específicos:

Detectar a presença de anticorpos da classe IgG, por meio da RIFI (*cut off* 1:50), contra *N. caninum* em matrizes suínas de rebanhos comerciais no estado de Santa Catarina.

Identificar os possíveis fatores associados à infecção por *N. caninum* em matrizes suínas de rebanhos comerciais do estado de Santa Catarina.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), sob protocolo nº 6769310317, em 29 de Maio de 2017.

Durante os meses de Janeiro a Junho de 2017 foram colhidas 498 amostras de sangue de matrizes suínas de rebanhos comerciais, em nove granjas localizadas em duas das principais regiões produtoras do estado de Santa Catarina (Oeste e Sul).

As granjas amostradas eram todas Unidades Produtoras de Leitões Desmamados (UPDs), vinculadas às agroindústrias. Para serem incluídas na amostra as granjas deviam possuir um rebanho mínimo de 50 matrizes produtivas e não ser Granja de Reprodutores Suínos Certificadas (GRSC).

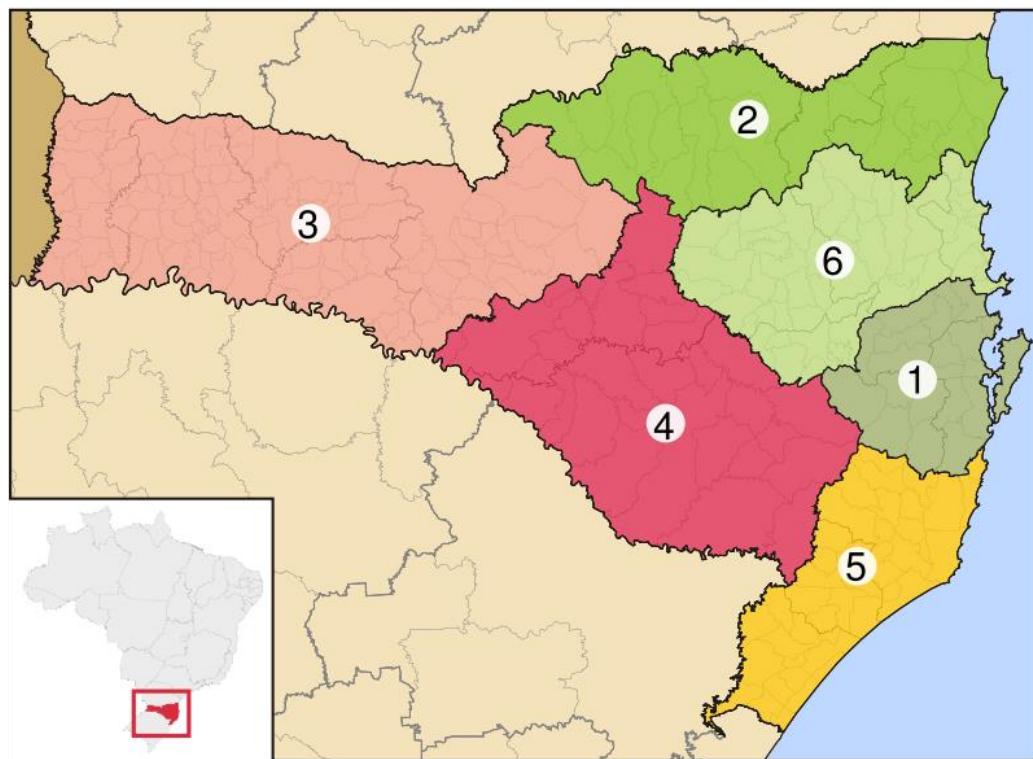
Foram amostradas cinco granjas na região Oeste, e quatro granjas na região Sul, totalizando 256 e 242 amostras, respectivamente. Para determinar o tamanho da amostra foi utilizada a metodologia proposta por Sobestiansky et al. (1998), para uma prevalência esperada de 5% e intervalo de confiança de 95% (Anexo 1). As amostras, colhidas aleatoriamente por venopunção, foram devidamente identificadas, acondicionadas e transportadas ao Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias do CAV/UDESC onde, após obtenção do soro, o mesmo foi armazenado (-20°C) para realização da RIFI.

Durante as coletas foi realizado um questionário epidemiológico Anexo 2 (contato com cães e/ou gatos, presença de roedores, fonte de água, presença de telas antiaves) e também foi avaliado o grau de vulnerabilidade à entrada de patógenos externos de acordo com a Instrução Normativa SDA nº 19 de 15 de fevereiro de 2002 do ministério da Agricultura Pecuária e abastecimento (MAPA), (Anexo 3).

### 4.1 DESCRIÇÃO DAS PROPRIEDADES

Cinco das nove propriedades analisadas localizavam-se na região Oeste do estado de Santa Catarina. As granjas pertencentes a esta região receberam a numeração de 1 a 5 sendo que nas respectivas granjas foram colhidas 53, 52, 51, 51 e 49 amostras sanguíneas.

Figura 2- Mapa demonstrativo do estado de Santa Catarina destacando as regiões Oeste e Sul, números 3 e 5 respectivamente.



Fonte: [https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:SantaCatarina\\_Mesoregions.svg](https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:SantaCatarina_Mesoregions.svg)

As outras quatro propriedades analisadas localizavam-se na região Sul do estado de Santa Catarina. As granjas pertencentes a esta região receberam a numeração de 6 a 9 sendo que nas respectivas granjas foram colhidas 62, 60, 55 e 65 amostras sanguíneas.

Em todas as granjas, no momento da colheita, foi aplicado o questionário epidemiológico bem como o questionário para avaliação do grau de vulnerabilidade de granjas reprodutoras de suínos certificados (GRSC) à entrada de patógenos externos de acordo com a Instrução Normativa SDA nº 19 de 15 de fevereiro de 2002 do ministério da Agricultura Pecuária e abastecimento (MAPA).

#### 4.2 SOROLOGIA

Para a realização RIFI foi utilizado como antígeno taquizoítos da cepa NC1 de *N. caninum*, obtidos por meio de cultivo celular. Os exames (RIFI) foram realizados de acordo com Conrad et al. (1993), utilizando lâminas apropriadas para RIFI, contendo taquizoítos de *N. caninum*. Os soros foram descongelados em temperatura ambiente e, em seguida, diluídos 1:50 em PBS pH 7,2. Os soros diluídos foram incubados com antígeno a 37°C por 30 min. em câmara úmida. Após a incubação, as lâminas eram lavadas em PBS por duas vezes e, mais uma vez em água destilada, e secas à temperatura ambiente. Após a secagem das lâminas, foi aplicada imunoglobulina marcada com isotiocianato de fluoresceína-anti-IgG suíno (conjugado Sigma Chemical®), diluído 1:200 em PBS pH 7,2. As lâminas foram incubadas a 37°C por 30 min. Em seguida, as lâminas eram submetidas ao mesmo processo de lavagem anteriormente descrito, secas, cobertas com glicerina tamponada (pH 7,2) e examinadas por meio do microscópio de luz ultravioleta. Em cada lâmina foram testados soros controles positivo e negativo. Foram considerados positivos os soros que apresentaram reação na diluição 1:50 (cut off), com completa fluorescência da superfície dos taquizoítos de *N. caninum* segundo Paré; Hietala; Thurmond (1995). A titulação de anticorpos das amostras positivas foi realizada em diluições múltiplas, na base dois, até a diluição máxima reativa.

#### 4.3 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados da sorologia e os dados obtidos na aplicação do questionário epidemiológico foram tabulados e submetidos à análise estatística pelos testes exato de Fisher e do qui quadrado ( $P \leq 0,05$ ) (R Core Team, 2017) para identificar possíveis fatores de risco como a presença de cães, felinos, roedores, tipo de fonte de água, presença de tela antiaves, controle de roedores e nível de vulnerabilidade.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A prevalência geral de anticorpos contra *N. caninum* foi de 18,9 % (94/498) e estão descritas na Tabela 1. Das 256 amostras da região Oeste, 80 foram positivas (31,3%), e das 242 amostras analisadas da região Sul, 14 foram positivas na RIFI (5,8%). A recíproca de títulos ficou assim distribuída 27 (1:50), 26 (1:100), 22 (1:200), 10 (1:400), 9 (1:800).

Tabela 1. Resultados da pesquisa de anticorpos contra *Neospora caninum* (RIFI;  $\geq 1:50$ ) em matrizes suínas de rebanhos comerciais no estado de SC, Brasil. Por Granja e por região.

<b>Granja</b>	<b>Região</b>	<b>N</b>	<b>Positivos (n/%)</b>
Granja 1	Oeste	53	16 / 30,1%
Granja 2	Oeste	52	15 / 28,8%
Granja 3	Oeste	51	24 / 47%
Granja 4	Oeste	51	16 / 31,3%
Granja 5	Oeste	49	9 / 18,36%
<b>Sub total</b>	----	<b>256</b>	<b>80 / 31,3%</b>
Granja 6	Sul	62	3 / 4,8%
Granja 7	Sul	60	5 / 8,3%
Granja 8	Sul	55	4 / 7,2%
Granja 9	Sul	65	2 / 3,1%
<b>Sub total</b>	----	<b>242</b>	<b>14 / 5,8%</b>
<b>Total</b>	----	<b>498</b>	<b>94 / 18,9%</b>

Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Embora escassos, estudos de soroprevalência em suínos domésticos e selvagens têm sido realizados nos EUA, Europa, África e Brasil a fim de verificar a presença de anticorpos contra *N. caninum* nos rebanhos comerciais e em animais de vida selvagem para avaliar a extensão de seus danos na suinocultura e a importância do ciclo selvagem nesta espécie.

Waladjo et al. (2009), no Senegal, relataram soropositividade de 58,3% ao analisar amostras de 60 matrizes suínas, por meio da técnica de ELISA e, acompanhando a vida

reprodutiva destas fêmeas pelo período de três anos, encontraram correlação entre a soropositividade para *N. caninum* e a ocorrência de desordens reprodutivas.

Damryiasa et al. (2004) na Alemanha, ao avaliarem 2041 amostras de soros de suínos para *T. gondii* (ELISA e RIFI), *Sarcocystis* spp. (ELISA), e *N. caninum* (ELISA e Immunoblotting), encontraram 19% e 29% dos animais soropositivos para *T. gondii* e *Sarcocystis* spp., respectivamente e apenas um animal soropositivo para *N. caninum*, que teve seu resultado confirmado pela técnica de Immunoblotting.

Feitosa et al. (2014) no Brasil, ao analisarem amostras sorológicas de 190 suínos, por meio da RIFI (1:50), verificaram seis animais positivos, perfazendo 3,2%. Azevedo et al. (2010), analisando amostras obtidas de abatedouro público na cidade de Patos, no estado da Paraíba, verificaram uma prevalência de 3,1% (4/130) através de RIFI com ponto de corte de (1:50).

Em suínos selvagens também tem sido verificada a presença deste protozoário como demonstram Cerqueira-Cézar et al. (2016), em estudo realizado nos Estados Unidos, no qual observaram uma prevalência de 15% (159/1059), por meio da RIFI, com ponto de corte de (1:50), em animais provenientes de 29 estados. Com esse trabalho eles demonstraram a importância do suíno selvagem como reservatório da doença destacando a relevância do agente em animais selvagens.

Ainda nos Estados Unidos, Bevins et al. (2013) ao coletarem amostras sanguíneas de 467 suínos selvagens, oriundos de três estados americanos, encontraram, pelo teste de Imuno Ensaio Enzimático (ELISA), uma prevalência de 15,8% e verificaram correlação estatística significativa entre as variáveis sexo ( $p=0,04$ ) e idade ( $p=0,01$ ) nos suínos selvagens, sendo que as fêmeas eram 1,69 mais suscetíveis à infecção que os machos, e os animais mais velhos tinham 2,1 mais chance de se infectarem que animais mais novos.

Na República Tcheca, Bartová; Sedlack; Literak (2006) em pesquisa sorológica realizada para *T. gondii* e *N. caninum*, em 565 suínos selvagens abatidos por caça, nas diferentes regiões do país, no período de 1999-2005, encontraram 102 amostras positivas para *N. caninum* por meio de teste de cELISA, perfazendo um total de 18,1%. Neste estudo todos os animais eram adultos e não foram coletados dados referentes ao sexo dos animais. Foi detectada diferença estatística entre as regiões analisadas, e encontrada infecção mista por *T. gondii* e *N. caninum* em 38 animais. Nesse mesmo estudo as amostras consideradas positivas por meio do teste de cELISA foram submetidas a técnica da RIFI, ponto de corte de 1:50 e, de 102 amostras positivas no ELISA, 58 foram positivas na RIFI.

Ainda na República Tcheca, Bartová e Sedlak (2011) analisando 551 amostras de fêmeas suínas abatidas, oriundas de oito estados diferentes, verificaram uma prevalência de infecção de 36% (198/551) e de 3% (16/551) para *T. gondii* e *N. caninum*, respectivamente, com infecção mista para *T. gondii* e *N. caninum* em oito animais, por meio de RIFI.

Almería et al. (2007) na Espanha, ao analisarem amostras sorológicas de 1034 animais selvagens, incluindo 298 javalis, por meio de ELISA, e confirmando os positivos pela RIFI, verificaram uma prevalência de 0,3% (1/298) nos javalis, sendo novamente destacada a importância deste animal como reservatório selvagem do agente.

Helmick et al. (2002) na Inglaterra ao analisarem 454 amostras de sangue de fêmeas suínas com histórico de aborto ou consideradas inférteis utilizando o teste de ELISA, seguido de RIFI e teste de ELISA inibitório para as amostras positivas no primeiro teste, verificaram uma soroprevalência de 8,8% (40/454). No entanto ao realizar RIFI e ELISA inibitório nas 40 amostras positivas nenhuma destas apresentou resultado reagente. Tal fato pode ser explicado pela ocorrência de reação cruzada com outros membros na família apicomplexa.

Entre os fatores de risco analisados no presente trabalho, correlação positiva ( $p<0,01$ ) com a soropositividade para *N. caninum* foi observada em relação ao contato com de cães presença de roedores, tipo de fonte de água e o emprego de tela antiaves (Tabela 2).

Com relação à presença de cães, 68,1% (64/94; IC 95% = 2,64 – 6,43), dos animais positivos eram de granjas em que cães estavam presentes na propriedade e entravam em contato com os suínos. Ao contrário, 65,1% dos animais negativos eram de planteis em propriedades que não possuíam cães (Tabela 2). Ainda, os maiores títulos de anticorpos IgG contra *N. caninum* foram observados nas propriedades com presença de cães ( $p<0,01$ ) (Tabela 2). Nas propriedades em que os suínos entravam em contato com cães a chance de infecção demonstrou ser 3,97 vezes maior (OR = 3,97), que nas propriedades em que suínas e cães não mantinham contato.

Paré et al. (1998) ao acompanharem 3059 vacas de leite, em 46 propriedades, verificaram que a presença de cães na propriedade é considerado fator de risco para a infecção pelo protozoário. Segundo Dubey (1999) e Dubey; Schares; Ortega-Mora (2007) cães podem expor os animais ao risco de exposição por defecarem em fontes de alimento e de água que abastecem as granjas. Dijkstra et al. (2001) ressaltaram também que a presença de cães com livre acesso às áreas de parto das fazendas de gado de leite favorece o fechamento do ciclo do protozoário dentro desta, uma vez que a ingestão de anexos fetais pelos canídeos é via de transmissão para *N. caninum*. Barling et al. (2000) acrescentam o fato de que canídeos silvestres ou cães errantes com acesso as propriedades podem oferecer risco de infecção. É

recomendável que se adotem medidas de precaução não só na propriedade como na região para evitar o contato de cães com tecidos fetais contaminados (VANLEEUWEN et al. 2010; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Granjas onde roedores estavam presentes (ou que não possuíam programas de controle de roedores) demonstraram correlação ( $p<0,01$ ) positiva com a soropositividade para *N. caninum*. Dos suínos positivos, 31,3% (80/94 IC 95% = 4,06 – 13,50) tinham contato com roedores, e nas propriedades onde não havia esse contato, somente 5,8% dos animais foram soropositivos para *N. caninum* (Tabela 2). A ausência de programas de controle de roedores ou a presença de roedores nas propriedades analisadas demonstrou ser um fator de risco para a infecção por *N. caninum*, sendo que nas propriedades onde os suínos tinham esse contato os animais tinham 7,37 vezes mais chance ( $OR= 7,37$ ) de apresentarem soropositividade para este agente.

Huang et al. (2004) ao analisarem tecido cerebral de 55 ratos capturados em propriedades leiteiras de Taiwan, verificaram que nove (16,4%) eram positivos para *N. caninum* por meio da técnica de PCR. Hughes et al. (2006), ao analisarem, por meio de PCR, tecido cerebral de camundongos (*Mus domesticus*) e ratazanas (*Rattus norvegicus*), observaram uma prevalência de 3% e 4,4%, respectivamente, para *N. caninum*.

Ferroglio et al. (2007) na Itália ao analisaram por meio de PCR tecido cerebral, rins e tecido muscular de 75 camundongos (*Mus musculus*), 103 ratazanas (*Rattus norvegicus*), e 55 ratos do mato (*Apodemus sylvaticus*), verificaram uma positividade para *N. caninum* nos tecidos de 11/103 camundongos ( 10,5%), 16/75 ratazanas (21,3%) e 2/55 ratos do mato (1,8%).

Dantas et al. (2013), ao analisarem amostras de soro sanguíneo de 476 cães no município de Natal, no estado do Rio Grande Norte, por meio de RIFI, verificaram uma prevalência de 11,5% (55/476) para *N. caninum*. A análise dos fatores de risco associados à infecção revelou que cães que tinham contato com ratos apresentavam 2,34 vezes mais chance de apresentarem soropositividade. A presença de roedores pode representar uma via de transmissão para hospedeiros carnívoros (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007) e, provavelmente, para suínos que possuem hábito alimentar onívoro.

A não utilização de tela de proteção antiaves nas instalações de criação também apresentou correlação ( $p<0,01$ ) com a sorologia (Tabela 2). Nas propriedades com tela, 1,8% (IC 95% = 0,07 – 0,25) dos animais foram considerados positivos enquanto onde não havia este equipamento de proteção, foi observada soropositividade de 31,3% entre as matrizes. Demonstrando que a presença de tela antiaves nas propriedades atuou como fator de proteção contra a infecção por *N. caninum* ( $OR= 0,13$ ). Dubey; Schares; Ortega-Mora (2007) ressaltam

a importância da proteção dos locais de criação para evitar contato com animais infectados. Embora o papel das aves no ciclo biológico do *N. caninum* não esteja completamente elucidado, estudos demonstraram que a presença de pássaros em propriedades de gado de leite pode estar relacionada com o aumento da soroprevalência e com a ocorrência de transtornos reprodutivos associados à neosporose, indicando que aves podem ser HIs e assim, servir de via de transmissão para os canídeos (BARTELS; WOUDA; SCHUKKEN, 1999; OTRANTO et al., 2003). Ainda, com relação aos suínos, que apresentam hábito alimentar onívoro, aves poderiam atuar diretamente como via de transmissão, se contaminadas com o protozoário, quando ingeridas pelos animais.

Nas granjas em que a água consumida pelos animais era proveniente de fontes na propriedade como minas e/ou “olhos d’água”, onde outros animais, inclusive silvestres, podem ter acesso à mesma, observou-se uma prevalência de 30,8% e 2,38 vezes mais chance de infecção para *N. caninum*, ( $IC\ 95\% = 1,44 - 3,91$ ;  $OR = 2,38$ ). Nas propriedades onde as granjas eram servidas por poços artesianos associados com minas e/ou “olhos d’água” foi observada uma prevalência de 23,9%, não sendo observada correlação estatística positiva. Em contrapartida granjas que forneciam água aos seus animais somente por poço artesiano a prevalência foi de 11,2%, apresentaram 0,36 vezes menos chance de soropositividade. Isto pode ser explicado pelo tipo de fonte de água, nas quais outros animais não têm acesso, e pode ter atuado como fator de proteção contra a infecção por *N. caninum*, ( $IC\ 95\% = 0,22 - 0,6$ ;  $OR = 0,36$ ). Nas propriedades que forneciam água do sistema de saneamento municipal 18,36%, dos animais foram positivos (Tabela 2).

Barling et al. (2001) ao analisarem 76 propriedades de criação extensiva de gado no estado do Texas EUA, perceberam um decréscimo no risco de infecção para *N. caninum* em propriedades que possuíam fontes de água e alimentos protegidas do acesso de animais selvagens e Dubey; Schares; Ortega-Mora (2007) salientam que a água consumida pelos animais pode ser contaminada por oocistos e servir de via de transmissão para animais.

Dubey (2004) ao relatar um surto de toxoplasmose aguda, ocorrido no Canadá, cuja via de transmissão identificada foi a água da central de abastecimento do município, contaminada por fezes de felídeos selvagens, ressalta a importância da proteção das fontes de água, pois a infecção por ingestão de oocistos presentes na água é mais severa do que a contaminação por alimentos, visto que a quantidade de oocistos ingeridos é maior que em outros meios de contaminação, mostrando a importância da água como veículo de contaminação. Embora o autor discorra sobre a importância da água como via de transmissão para *T. gondii*, a

similaridade entre o ciclo de vida dos dois protozoários permite a inferência da importância da água como possível via de transmissão para a neosporose também.

Foi observada diferença estatística significativa ( $p<0,01$ ) entre as prevalências observadas nas granjas avaliadas (Tabela 2). Esta diferença entre granjas pode ser relacionada ao tipo de manejo adotado e às características apresentadas por cada propriedade. As granjas com maiores prevalências (1, 2, 3 ,4, 5), apresentavam características em comum como o contato dos suínos com cães, a presença de roedores, a ausência de tela antiaves e o tipo de fonte de água, além de apresentarem maior grau de vulnerabilidade, segundo questionário de Avaliação do Grau de Vulnerabilidade de Granjas (GRSC) À Entrada de Patógenos Externos, conforme Instrução Normativa SDA nº 19 de 15 de fevereiro de 2002 do ministério da Agricultura Pecuária e abastecimento (MAPA). Barling et al. (2000; 2001) ao analisarem propriedades de criação extensiva de gado nos EUA, observaram que propriedades maiores e mais tecnificadas apresentaram uma soroprevalência menor para *N. caninum*, devido as práticas de manejo adotadas que não permitiam acesso de cães de outras propriedades, maior controle das fontes de alimento e de água, controle da origem dos animais e manejo reprodutivo mais apurado.

Tabela 2 - Resultado da sorologia (RIFI,  $\geq 1:50$ ) para *Neospora caninum* em matrizes suínas de duas regiões do Estado de Santa Catarina. Por variável analisada e total.

<b>Variável</b>		<b>Animais</b>		<b>Positivos<sup>1</sup></b>		<b>Positivos<sup>2</sup></b>	
		N	%	N	%	N	%
Contato cães	Sim	205	41,2	64	31,2	64	68,1
	Não	293	58,8	30	10,2	30	31,9
Roedores	Sim	256	51,4	80	31,2	80	85,1
	Não	242	48,6	14	5,8	14	14,9
Tela	Sim	242	48,6	14	5,8	14	14,9
	Não	256	51,4	80	31,2	80	85,1
Origem água	Nascente	104	20,9	32	30,8	32	34
	Artesiano	232	46,6	26	11,2	26	27,6
	Nasc.+Art.	113	22,6	27	23,9	27	28,8
	CASAN <sup>3</sup>	49	9,9	9	18,3	9	9,6
Propriedades	G1	53	10,7	16	30,2	16	17
	G2	52	10,4	15	28,9	15	16
	G3	51	10,2	24	47	24	25,5
	G4	51	10,2	16	31,4	16	17
	G5	49	9,9	9	18,3	9	9,6
	G6	62	12,4	3	4,9	3	3,2
	G7	60	12,0	5	50	5	5,3
	G8	55	11,1	4	7,2	4	4,2
	G9	65	13,1	2	3	2	2,1
<b>Total</b>	-	<b>498</b>	<b>100</b>	<b>94</b>	-	<b>94</b>	<b>100</b>

<sup>1</sup> Relação entre o número total de animais positivos por variável e o número total de animais dentre cada variável.

<sup>2</sup> Relação entre o total de animais positivos dentre cada variável e o número total de animais positivos.

<sup>3</sup> Água fornecida pela Companhia Catarinense de Águas e Saneamento do estado de Santa Catarina

Fonte: Produção do autor, 2017.

## 6 CONCLUSÕES

Através das informações obtidas neste trabalho pode-se concluir que:

- A soroprevalência de anticorpos contra *N. caninum* em rebanhos comerciais de matrizes suínas em Santa Catarina foi de 18,9% (94/498), considerada alta em comparação com outros resultados observados no Brasil.
- O contato dos animais com cães, a presença de roedores, a ausência de tela antiaves e a fonte de água foram identificados como fatores de risco para infecção por *N. caninum* em matrizes suínas de rebanhos comerciais no Estado de Santa Catarina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMERÍA, S. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* in non-carnivorous wildlife of Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 143, n. 1, p. 21-28, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE SUÍNOS; SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO AS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Mapeamento da Suinocultura Brasileira**. Brasília: ABCS; SEBRAE, 2016. 378p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE SUÍNOS. **Produção de Suínos Teoria e Prática**. Brasília: ABCS, 2014. 908p.

ATKINSON, R. et al. Progress in the Serodiagnosis of *Neospora caninum* Infections of Cattle. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 16, n. 3, 2000.

AZEVEDO, S. S. et al. Prevalence of anti *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in swine from northeastern Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 80-84, 2010.

BAAR, B.C. et al. *Neospora*-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure and immunoreactivity. **Journal of Veterinary Diagnosis Investigation**, Columbia, v. 3, n. 1, p. 39-46, 1991.

BARLING, K. S. et al. Spatial associations among density of cattle, abundance of wild canids, and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago. v. 33, n. 9, p. 1361-1365, 2000.

BARLING, K. S. et al. Ranch-management factors associated with antibody seropositivity for *Neospora caninum* in consignments of beef calves in Texas, USA, **Preventive Veterinary Medicine**, local, v. 52, n. 1, p. 53-61, 2001.

BARTELS, C. J. M.; WOUUDA, W.; SCHUKKEN, Y. A. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, n. 2, p. 247-257, 1999.

BARTOVÁ, E.; SEDLACL, K. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs in the Czech Republic. **Parasitology**, v. 138, n. 1-2, p. 1369-1371, 2011.

BARTOVÁ, E.; SEDLACK, K.; LITERAK, I. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in wild boars in the Czech Republic. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 142, n. 1-2, p. 150-153, 2006.

BASSO, W. et al. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 87, n. 3, p. 612-8, 2001.

BEVINS, S. et al. *Neospora caninum* exposure in overlapping population of coyotes (*Canis latrans*) and feral swines (*Sus scrofa*). **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 49, n. 4, p. 1028-1032, 2013.

BJÖRKAS, I.; PRESTHUS, J. Immunohistochemical and ultrastructural characteristics of a cyst-forming sporozoan associated with encephalomyelitis and myositis in dogs. **Acta Pathologica. Microbiologica. Immunologica. Scandinavica**, Copenhagen, v. 96, n. 5, 445–54, 1988.

BJÖRKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, Berlin, v. 70, p. 271-274, 1984.

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

BRASIL. Instrução Normativa nº 19 de 15 de Fevereiro de 2002. Estabelece normas para a certificação de granjas de reprodutores suídeos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 1 de Março de 2002. Disponível em: <[https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/legislacao\\_pnss\\_3ID-3MnF3icSTU.pdf](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/legislacao_pnss_3ID-3MnF3icSTU.pdf)>. Acesso em : 22 de Agosto de 2017.

CAMILLO, G. et al. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos de leite do sudeste do estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 6, p. 1511-1513, 2010.

CERQUEIRA-CÉZAR, C. K. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* in feral swine (*Sus scrofa*) in the United States. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 226, p 35-37, 2016.

CONRAD, P.A. et al. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 5, n. 3, p.572–578, 1993.

DAMRIYASA, I. M. et al. Cross-sectional survey in pig breeding farms in Hesse, Germany: seroprevalence and risk factors of infections with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora caninum* in sows. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 126, n. 3, p. 271-286, 2004.

DANTAS, S. B. A. et al. Ocorrência e fatores de risco associados a infecções por *T. gondii* e *N.caninum* em cães do município de Natal, estado de Rio Grande do Norte, nordeste Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 11, p. 242-248, 2013.

DIJKSTRA, T. M. 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**. New York, v. 31, n. 8, p. 747-752, 2001.

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

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

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis—a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**. v. 126, n. 1-2, p. 57–72, 2004.

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

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

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

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 30, n. 2, p. 323-367, 2007.

DUBEY, J. P. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988.

DUBEY, J. P. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 32, n. 8, p. 929-946, 2002.

DUBEY, J. P. et al. Gray Wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 181, n. 2-4, p. 382-387, 2011.

FEITOSA, T. F. et al. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from northeast Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 202, n. 3-4, p. 305-309, 2014.

FERROGLIO, E. et al. Evidence of *Neospora caninum* DNA in wild rodents. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 148, n.3-4, p.346-349, 2007.

GONDIM, L. F. P.; *Neospora caninum* in wild life. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 2, n. 6, p. 247-252, 2006.

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

GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M. M.; GAO, L. Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 134, n. 1-2, p. 33-39, 2005.

GONDIM, L. F. P.; MINEO J.R.; SCHARES G. Importance of serological cross-reactivity among *Toxoplasma gondii*, *Hammondia* spp., *Neospora* spp., *Sarcocystis* spp. and *Besnoitia besnoiti*. **Parasitology**, Cambridge, v. 144, n. 7, p. 851-869, 2017

GONDIM, L. F. P. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 34, n. 2 p. 159-161, 2004.

- HELMICK, B. et al. Serological investigation of aborted sheep and pigs for infection by *Neospora caninum*. **Research in Veterinary Science**, London, v. 73, n. 2, p. 187-189, 2002.
- HUANG, C. C. et al. Finding of *Neospora caninum* in the wild brownrat (*Rattus norvegicus*). **Veterinary Research**, Paris, v. 35, n. 3, p. 283-290, 2004.
- HUGHES, J. M. et al. The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. **Parasitology**, Cambridge, v. 132, n. 1, p. 29–36. 2006.
- JENKINS, M.C. et al. The relationship of *Hammondia hammondi* and *Sarcocystis* mucosa to other heteroxenous cyst-forming coccidia as inferred by phylogenetic analyses of small subunit ribosomal DNA sequences. **Parasitology**, Cambridge, v. 119, n. 2, p. 135–142 1999.
- JENKINS, M. C. et al. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 5 p. 631-636, 2002.
- JENSEN, L. et al. Experimental porcine neosporosis. **Acta Pathologica microbiologica et immunologica scandinavica**, Copenhagen, v. 106, n. 4, p. 475-482, 1998.
- KING, J. S. et al. Australian dingoes are definitive host of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 40, n. 8, p. 945-950, 2010.
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Canine Neosporosis. **Journal for Veterinary Parasitology**, New York, v. 14, n. 2, p. 327-333, 2000.
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that dogs are definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.82, n. 4, p.327-333, 1999.
- LOBATO, J. et al. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 13, n. 1, p. 84-89, 2006.
- MIELE, M.; WAQUIL, P. D. **Transação entre suinocultura e agroindústria em Santa Catarina**. ed. EMBRAPA: Brasília, 2002, 7 p.
- MCALLISTER, M.M. et al., Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 28, n. 9, p. 1473–1478, 1998.
- MONNEY, T.; HEMPHILL, A. Vaccines against neosporosis: what can we learn from the past studies? **Experimental Parasitology**, v. 140, p. 52-70, 2014.
- OTRANTO, D. L. et al. Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 118, n. 1-2, p. 7-18, 2003.

PARÉ, J.; HIETALA, S.K.; THURMOND, M.C. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, n. 2, p. 273–275, 1995.

PARÉ, J. et al. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. **Journal of the American Veterinary Medical association**, Chicago. v. 213, n. 11, p. 1595-1598, 1998.

PAZ, G. F.; LEITE, R. C.; ROCHA, M. A. Association between seropositivity for *Neospora caninum* and pregnancy rate in bovine receipts submitted to embryo transfer technology. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 5, p. 1323-1325, 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**, New York, v. 43, n. 2, p. 133-142, 2013.

R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em <<https://www.R-project.org/>> Acesso em 18.07.2017

SOBESTIANSKY, J. et al. **Suinocultura Intensiva**: Produção, Manejo e Saúde do Rebanho. Brasília: EMBRAPA, 1998. 388 p.

SPEER, C.A., DUBEY, J.P. Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum*. **Journal of Protozoology**. New York, v. 36, n. 5, p. 458–63. 1989.

TREES, A.J.; WILLIAMS, D.J. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 12, p. 558-561, 2005.

VANLEEUWEN, J. A. et al. Risk factors associated with *Neospora caninum* seropositivity in randomly sampled Canadian dairy cows and herd. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 93, n. 2-3, p. 129-138, 2010.

WALADJO, A. R. et al. *Neospora caninum* antibodies and its consequences for reproductive characteristics in wandering sows from Senegal West Africa. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, Dubai, v. 5, n. 5, p. 263-266, 2009.

## ANEXOS

Anexo 1- Modelo para determinação do número amostral a partir da prevalência estimada, nível de confiança e tamanho do rebanho Segundo Sobestiansky et al., 1998.

**Quadro 2.** Modelo para determinação do número amostral a partir da prevalência estimada, nível de confiança e tamanho do rebanho.

Tam	Taxa de prevalência estimada %																	
	1		5		10		25		50		75							
	Níveis de confiança %																	
Reb	90	95	99	90	95	99	90	95	99	90	95	99	90	95	99	90	95	99
10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	6	7	8	3	4	5	2	3	4
20	20	20	20	19	20	20	14	16	18	7	9	11	4	5	6	2	3	4
30	30	30	30	24	26	29	16	19	23	8	9	13	4	5	7	2	3	4
40	40	40	40	28	31	36	17	21	27	8	10	14	4	5	7	2	3	4
50	50	50	50	30	35	42	18	22	29	8	10	14	4	5	7	2	3	4
60	59	60	60	32	38	47	19	23	31	8	10	15	4	5	7	2	3	4
70	68	70	70	34	40	51	19	24	33	8	10	15	4	5	7	2	3	4
80	76	79	80	35	42	54	20	24	34	8	10	15	4	5	7	2	3	4
90	84	87	90	36	43	57	20	25	35	8	10	15	4	5	7	2	3	4
100	91	96	100	37	45	59	20	25	36	8	10	15	4	5	7	2	3	4
150	118	130	143	39	49	68	21	26	38	8	11	16	4	5	7	2	3	4
200	137	155	180	41	51	73	21	27	40	8	11	16	4	5	7	2	3	4
250	151	175	210	42	53	76	21	27	41	8	11	16	4	5	7	2	3	4
300	161	189	235	42	54	78	22	28	41	8	11	16	4	5	7	2	3	4
400	175	211	273	43	55	81	22	28	42	8	11	16	4	5	7	2	3	4
700	196	243	336	44	57	85	22	28	43	9	11	16	4	5	7	2	3	4
1000	205	258	368	44	57	86	22	28	43	9	11	16	4	5	7	2	3	4
Inf	229	298	458	45	59	90	22	28	44	9	11	17	4	5	7	2	3	4

Tam Reb= tamanho do rebanho, Inf= infinito.

Anexo -2 Questionário epidemiológico aplicado nas granjas avaliadas.

**Questionário Projeto Toxoplasmose Suína**

Protocolo Nº: \_\_\_\_\_

Nº amostras da granja: \_\_\_\_\_

Categorias:	1 - Leitão Lactente	2 - Leitão de Creche	3 - Marrá	4 - Porca	5 Cachaço
-------------	---------------------	----------------------	-----------	-----------	-----------

Nosso Nº	Categoria	Sexo	Presença de gatos	Presença de cães	Fonte de água	Problemas Reprodutivos				Biosseguridade	
						Retorno Cio	Aborto	Natimorto	Mumific.	Tela antipássaros	Controle de roedores
1											
2											
3											
4											
5											
6											
7											
8											
9											
10											
11											
12											
13											
14											
15											
16											
17											
18											
19											
20											
21											
22											
23											
24											
25											
26											
27											
28											
29											
30											

Produtor: \_\_\_\_\_ Localidade: \_\_\_\_\_ Data da coleta: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Anexo 3 – Avaliação do grau de vulnerabilidade de (GRSC) à entrada de patógenos externos.

Variáveis	Critérios	Pontuações	Obtido na granja
1. Distância com a unidade de produção de suínos mais próxima não certificada ou abatedouro de suínos.	Maior de 3,5 km De 1 a 3,5 km De 500 m a 1 km menor de 500m	0 1 2 3	
2. Densidade de rebanhos suínos em um raio de 3,5 Km	1 rebanho 2 a 3 rebanhos 4 ou mais rebanhos	0 1 2	
3. Granjas fornecedoras de suídeos para reposição do plantel.	reposição própria ou por isterectomia 1 fornecedor 2 fornecedores 3 ou mais fornecedores	0 1 2 3	
4. Distância de rodovia que transporta suínos	maior de 500m de 300m a 500m menor de 300m	0 1 2	
5.1 Qualidade do isolamento da granja - cercas	ótima – cerca dupla intercalada com cinturão verde muito boa – cerca de tela afastada pelo menos 50m dos galpões boa – cerca de tela com menos de 50m dos galpões razoável – apenas cerca não telada	0 1 2 3	
5.2 Qualidade do isolamento da granja – cinturão verde	distância entre as instalações e a linha externa do cinturão verde de no mínimo 50m distância entre as instalações e a linha externa do cinturão verde menor que 50 m. não possui cinturão verde	0 1 2	
6. Controle de visitas na granja	ocasional com vazio sanitário de 72 h, sistema de banho com troca de roupas e calçados e banheiro com área suja e limpa.	0	
	ocasional com vazio sanitário de 48 h, sistema de banho com troca de roupas e calçados e banheiro com área suja e limpa.	1	
	ocasional com vazio sanitário de 24 h, sistema de banho com troca de roupas e calçados e banheiro com área suja e limpa.	2	
7. Existência de quarentenário	sim, distante no mínimo 500m com cinturão verde ou não introduz suínos no rebanho. sim, mas com menos de 500m do rebanho ou sem cinturão verde. Introduz os suínos de reposição sem fazer quarentena	0 1 2	
8. Ração fornecida aos animais	não usa farinhas de origem animal usa farinhas de origem animal	0 2	
9. Origem da ração fornecida aos animais	fábrica própria na propriedade fábrica de terceiros	0 1	
10. Transporte do alimento usado na granja	graneleiro ou caminhão que não transporta suínos. caminhão que transporta suínos	0 2	
Pontuação total obtida na granja			