

**PATRÍCIA DE OLIVEIRA ESMERINI**

**Ocorrência e isolamento de *Toxoplasma gondii* e *Neospora* spp.  
em equídeos do Brasil**



**São Paulo  
2012**

**PATRÍCIA DE OLIVEIRA ESMERINI**

**Ocorrência e isolamento de *Toxoplasma gondii* e  
*Neospora* spp. em equídeos do Brasil**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Epidemiologia Experimental Aplicada as Zoonoses da  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da  
Universidade de São Paulo, para obtenção do título de  
Doutor em Ciências**

**Departamento:**

**Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal**

**Área de Concentração:**

**Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses**

**Orientadora:**

**Prof. Dra. Solange Maria Gennari**

**São Paulo  
2012**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da  
Universidade de São Paulo)

T.2466 Esmerini, Patrícia de Oliveira  
FMVZ Ocorrência e isolamento de *Toxoplasma gondii* e *Neospora* spp. em equídeos do Brasil / Patrícia de Oliveira Esmerini. -- 2012.  
89 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Solange Maria Gennari.

1. *Toxoplasma gondii*. 2. *Neospora* spp. 3. Equídeos. 4. Sorologia. 5. Genotipagem.  
6. PCR-RFLP. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

*Comissão de Ética no uso de animais*

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Ocorrência e isolamento de *Toxoplasma gondii* e *Neospora spp.* em eqüídeos", protocolado sob o nº 2257/2011, utilizando 400 (quatrocentos) camundongos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Solange Maria Gennari, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/6/2011.

We certify that the Research "Occurrence and isolation of *Toxoplasma gondii* and *Neospora spp.* em equides", protocol number 2257/2011, utilizing 400 (four hundred) mice, under the responsibility Profa. Dra. Solange Maria Gennari, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 06/22/2011.

São Paulo, 18 de julho de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni  
Presidente



## FOLHA DE AVALIAÇÃO

**Autor:** ESMERINI, Patrícia de Oliveira

**Título:** Ocorrência e isolamento de *Toxoplasma gondii* e *Neospora* spp. em equídeos do Brasil

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências**

**Data:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

**Instituição** \_\_\_\_\_ **Julgamento** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

**Instituição** \_\_\_\_\_ **Julgamento** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

**Instituição** \_\_\_\_\_ **Julgamento** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

**Instituição** \_\_\_\_\_ **Julgamento** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

**Instituição** \_\_\_\_\_ **Julgamento** \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

**"OS DOIS TESTES MAIS DUROS NO CAMINHO ESPIRITUAL SÃO  
A PACIÊNCIA PARA ESPERAR O MOMENTO CERTO E A  
CORAGEM DE NÃO NOS DECEPCIONAR COM O QUE  
ENCONTRAMOS". PAULO COELHO**

**AOS MEUS PAIS, MARCOS E LORI POR TEREM ME DADO A  
OPORTUNIDADE DE REALIZAR ESSE MEU GRANDE SONHO E  
PELO CARINHO NESSA EMPREITADA.**

**AO MEU GRANDE COMPANHEIRO RAFAEL, QUE ESTEVE AO  
MEU LADO DESDE O INÍCIO, SEMPRE COM MUITA PACIÊNCIA,  
CARINHO E AMOR.**

**AO MEU IRMÃO PELO APOIO NESSE MOMENTO.**

**AOS MEUS ANIMAIS QUE SEMPRE FICARAM AO MEU LADO,  
DANDO MUITA ALEGRIA E AMOR NESSE PERÍODO DIFÍCIL.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todas as pessoas que participaram da realização deste trabalho de forma direta e indireta.

À Professora Solange pela paciência, amizade e pela oportunidade de realização deste sonho.

Ao Renato Caravieri pela bondade, amizade e por estar sempre disposto a ajudar.

Ao Sérgio Netto Vitaliano, Aline Diniz Cabral, Maurício C. Horta, Herbert S. Soares, Marcos Gomes Lopes e Eduardo Faria pela ajuda na coleta das amostras.

À Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena pela paciência e lições ensinadas durante este período.

À Eliana Villalobos pela ajuda e paciência para execução das PCRs.

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VPS-FMVZ-USP) pelo acolhimento.

Aos professores do curso da pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses pelos ensinamentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Doutorado.

À Deus por ter me proporcionado tudo isso



“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida. Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um “não”. É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta”.

*Augusto Cury*

## RESUMO

ESMERINI, P. O. **Ocorrência e isolamento de *Toxoplasma gondii* e *Neospora* spp. em equídeos do Brasil.** [Occurrence and Isolation of *Toxoplasma gondii* and *Neospora* spp. in equids from Brazil]. 2013. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

*Neospora caninum* é um parasito intracelular obrigatório, formador de cistos, que acomete vários animais domésticos e silvestres, tendo maior importância nas espécies canina e bovina, nas quais causa problemas nervosos e reprodutivos. Os canídeos do gênero *Canis* são os únicos reconhecidos como hospedeiros definitivos do *N. caninum* até o momento, nos quais ocorre a fase sexuada de multiplicação, resultando na eliminação de oocistos pelas fezes. *Toxoplasma gondii* também é um coccídio responsável por uma das zoonoses de maior importância e ocorrência em todo o mundo. A fase assexuada de desenvolvimento do *T. gondii* ocorre nos mamíferos e aves (hospedeiros intermediários) com formação de cistos teciduais e a fase sexuada de desenvolvimento ocorre no intestino delgado dos hospedeiros definitivos, que são os membros da família *Felidae*. Este estudo teve por objetivo determinar a soroprevalência de anticorpos contra *Neospora* spp. e *T. gondii* em equídeos de diferentes regiões do Brasil e o isolamento e caracterização genética destes coccídios em amostras de tecidos de equídeos. A sorologia para *T. gondii* e *Neospora* spp. foi realizada em 453 amostras de soros por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta com ponto de corte de 50 para *Neospora* spp e 64 para *T. gondii*. Deste total, oito (1,75%) amostras (sete de jumentos e um de cavalo) foram positivas para *Neospora* spp. e 129 (28,47%) amostras (82 jumentos, 32 cavalos e 15 mulas) para *T. gondii*. Para o isolamento do *T. gondii* foram realizados 29 bioensaios em camundongos, sendo 19 de animais soropositivos e 10 de pools

de tecidos de cavalos soronegativos. Por meio dessa prova biológica, foi possível o isolamento em uma amostra de jumento (*Equus asinus*) de Mossoró, RN, ocorrendo a morte dos dois únicos camundongos infectados, no 16º e 17º dia pós-inoculação. A caracterização genotípica do isolado foi realizada pela PCR-RFLP utilizando 12 marcadores genotípicos. A genotipagem dessa amostra evidenciou o genótipo #60 TgCkBr220, já isolado em galinha do Arquipélago de Fernando de Noronha, PE, Brasil. O isolamento de *Neospora* spp em gerbilos não pode ser feito uma vez que não foi possível a obtenção de tecidos dos equídeos soropositivos.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. *Neospora* spp. Equídeos. Sorologia. Genotipagem. PCR-RFLP.

## ABSTRACT

ESMERINI, P. O. **Occurrence and isolation of *Toxoplasma gondii* and *Neospora* spp. in equids from Brazil.** [Ocorrência e isolamento de *Toxoplasma gondii* e *Neospora* spp. em equídeos do Brasil].2013 89 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

*Neospora caninum* is an obligate intracellular parasite, forming cysts that affect many domestic and wild animals, having greater importance in canine and bovine species due neurological and reproductive problems. Canids of the genus *Canis* are recognized as the only definitive hosts of *N. caninum* until the moment in which sexual phase occurs multiplication, resulting in the elimination of oocysts in the feces. *Toxoplasma gondii* is also a coccidian parasite responsible for a zoonotic disease of great importance and occurrence around the world. The asexual developmental stage of *T. gondii* occurs in mammals and birds, the intermediate hosts, resulting in the formation of cysts and the sexual stage occurs in the small intestine of definitive hosts, which are the felids, occurring oocysts formation. This study aimed to determine the seroprevalence of antibodies against *Neospora* spp. and *Toxoplasma gondii* in equids from different regions of Brazil and the isolation and genetic characterization of these parasites from equids tissue. Serology for *T. gondii* and *Neospora* spp. was performed in 453 serum samples by Immunofluorescence Antibody Test (IFAT). Of this total, eight (1.75%) samples (seven of donkeys and one of horse) were positive to *Neospora* spp. antibodies and 129 (28.47%) samples (82 donkeys, 32 horses, 15 mules) were *T. gondii* seropositive. For the isolation of *T. gondii*, bioassay was performed in mice. A sample of one donkey (*Equus asinus*) from Mossoró, RN, was obtained with two of the 20 inoculated mouse infected. The mouse died at day 16<sup>th</sup> and 17<sup>th</sup> post inoculation. The genotypic characterization of



the isolate was performed by PCR-RFLP using 12 genotypic markers. Genotyping showed the genotype #60 TgCkBr220, already described in chickens from Fernando de Noronha, PE, Brazil. Due the impossibility of acquisition of tissue from *Neospora* spp seropositive equids, isolation of this coccidian by gerbil bioassay was not possible to be done.

Keywords: *Toxoplasma gondii*. *Neospora* spp. Equines. Serology. Genotyping. PCR-RFLP.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo Biológico do <i>Neospora caninum</i> .....	23
Figura 2 - Ciclo Biológico do <i>Toxoplasma gondii</i> .....	31
Figura 3 - Mapa do Brasil com a localização dos estados e municípios de procedência das amostras e quantidade amostrada.....	39

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Relação dos estudos de pesquisa de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> realizados no Brasil com equídeos.....	33
Quadro 2 - Número de amostras de soros coletadas de equídeos, por município e estado.....	40
Quadro 3 - Distribuição do número de camundongos por tecidos de equídeos e identificação das espécies analisadas.....	45
Quadro 4 - Sequência de <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR e <i>nested</i> PCR- ITS1 para identificação de protozoários da família Toxoplasmatinae.....	47
Quadro 5 - Informações referentes aos marcadores genéticos e às endonucleases utilizadas na PCR/RFLP.....	51
Quadro 6 - Amostras de referência de <i>Toxoplasma gondii</i> utilizadas como controle positivo da reação de PCR/RFLP.....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de amostras positivas para anticorpos anti- <i>Neospora</i> spp. (RIFI $\geq$ 50) segundo local de procedência, título de anticorpos e espécie examinada.....	56
Tabela 2 - Número de amostras positivas para anticorpos anti- <i>T. gondii</i> (RIFI $\geq$ 64) segundo titulação, local de procedência e espécie examinada .....	58
Tabela 3 - Número de animais examinados e positivos para anticorpos anti- <i>T. gondii</i> e anti- <i>N. caninum</i> por espécie examinada.....	59
Tabela 4 - Genótipos multilocus do isolado da amostra primária de jumento do Brasil obtidos pela PCR/RFLP.....	63



## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Frequência de amostras positivas por espécie animal para anticorpos anti-*Neospora* spp. segundo município de origem dos animais..... 56
- Gráfico 2 - Frequência de amostras positivas para anticorpos anti-*T. gondii* segundo município e espécie animal examinada..... 59
- Gráfico 3 - Frequência de animais positivos para anticorpos anti-*T. gondii* e anti- *Neospora* spp por espécie..... 60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g}$	micrograma
dATP	desoxiadenosina trifosfatada
dCTP	desoxicitidina trifosfatada
dGTP	desoxiguanosina trifosfatada
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
dTTP	desoxitimidina trifosfatada
EDTA	ácido dietilenodiaminotetracético
EPM	Mieloencefalite Protozoária Equina
EUA	Estados Unidos da América
$g$	aceleração da gravidade terrestre
HCl	ácido clorídrico
IgG	Imunoglobulina G
KCl	cloreto de potássio
M	molar
MG	Minas Gerais

MgCl <sub>2</sub>	cloreto de magnésio
min	minutos
mM	milimolar
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	carbonato de cálcio
NaCl	cloreto de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	bicarbonato de sódio
NAT	Neospora Agglutination Test
n-PCR	nested-PCR
P.I.	pós-inoculação
PCR	polymerase chain reaction
pH	potencial hidrogeniônico
RFLP	restriction fragmente length polymorphism
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
rpm	Rotações por minuto
seg	segundos
SNC	Sistema Nervoso Central
TE	tris-HCl + EDTA
v	volume

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
<b>1.1</b>	<b><i>Neospora</i> spp.....</b>	<b>22</b>
<b>1.2</b>	<b><i>Toxoplasma gondii</i>.....</b>	<b>29</b>
<b>1.3</b>	<b>Animais do Estudo.....</b>	<b>34</b>
1.3.1	JUMENTOS.....	34
1.3.2	CAVALOS.....	35
1.3.3	MULAS.....	36
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Animais Amostrados.....</b>	<b>38</b>
<b>3.2</b>	<b>Análise Sorológica.....</b>	<b>40</b>
3.2.1	<i>N. CANINUM</i> .....	40
3.2.2	<i>T. GONDII</i> .....	41
<b>3.3</b>	<b>Isolamento do <i>T. gondii</i>.....</b>	<b>42</b>
3.3.1	BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS.....	42
<b>3.4</b>	<b>Identificação Molecular dos Protozoários.....</b>	<b>46</b>
3.4.1	EXTRAÇÃO DE DNA.....	46
3.4.2	PCR E <i>NESTED</i> -PCR.....	47
<b>3.5</b>	<b>Caracterização Genética dos Isolados de <i>Toxoplasma gondii</i>.....</b>	<b>49</b>
3.5.1	MARCADORES.....	49
3.5.2	PCR E <i>NESTED</i> -PCR.....	49
3.5.3	PCR- RFLP.....	50
<b>3.6</b>	<b>Análise Estatística.....</b>	<b>53</b>
<b>3.7</b>	<b>Fluxograma do delineamento.....</b>	<b>53</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>

<b>4.1</b>	<b>Análise Sorológica.....</b>	<b>55</b>
4.1.1	<i>NEOSPORA</i> SPP.....	55
4.1.2	<i>T. GONDII</i> .....	57
<b>4.2</b>	<b>Isolamento de <i>T. gondii</i>.....</b>	<b>60</b>
<b>4.3</b>	<b>Análise Molecular das Amostras Primárias.....</b>	<b>61</b>
<b>4.4</b>	<b>PCR-RFLP.....</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>70</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>
	<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>84</b>

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 *Neospora spp.*

*Neospora caninum* é um parasito intracelular obrigatório, formador de cistos, pertencente ao filo Apicomplexa, causador da doença conhecida como neosporose. Este coccídio acomete vários animais domésticos e silvestres, tendo maior importância nas espécies canina e bovina (DUBEY et al., 1988a).

Em 1988, foi reconhecido como nova espécie e gênero (DUBEY et al., 1988a), entretanto foi primeiramente encontrado em 1984, na Noruega. Cães foram diagnosticados com uma doença neurológica, com quadro semelhante à toxoplasmose e taquizoítos estavam presentes no cérebro e músculos, anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* não foram detectados no soro destes cães, os quais tampouco responderam ao bioensaio em camundongos (BJERKAS; MOHN; PRESTHUS, 1984).

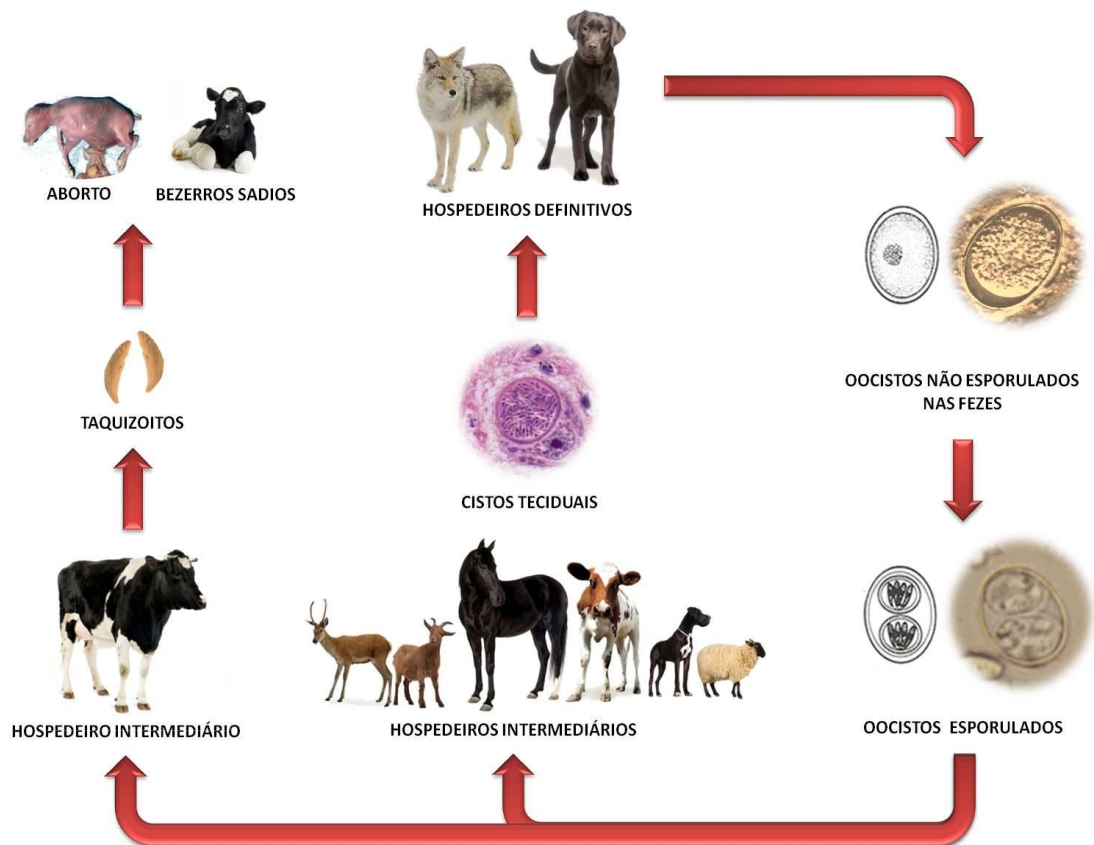
Dubey et al. (1988a) realizaram um estudo retrospectivo (lâminas de tecidos de cães do período de 1948 a 1987), examinando cortes histológicos de 23 cães pela imuno-histoquímica, cuja suspeita da causa da morte era toxoplasmose; em 13 identificou-se *T. gondii* e nos outros dez cortes, foi encontrado um parasito distinta morfológica e antigenicamente de *T. gondii* que foi classificado, posteriormente, como *N. caninum*.

O primeiro isolado desse coccídio foi obtido nos Estados Unidos, em cães (DUBEY et al., 1988b), o que levou o agente a ser nomeado *Neospora caninum*.

Alguns anos mais tarde verificou-se que esse parasito causava, em cães, uma forma clínica mais severa do que a causada pelo *T. gondii* e foram constatadas diferenças estruturais e histopatológicas entre ambos (DUBEY; LINDSAY, 1993).

Os canídeos do gênero *Canis* são os únicos reconhecidos como hospedeiros definitivos do *N. caninum* até o momento, nos quais ocorre a fase sexuada de multiplicação, resultando na eliminação dos oocistos pelas fezes. Estes se infectam ingerindo tecidos de bovinos e de outras espécies que contenham cistos teciduais e via transplacentária (transmissão vertical). Os oocistos eliminados com as fezes contaminam água e alimentos consumidos pelos hospedeiros intermediários, dentre os quais os equinos (MCALLISTER et al., 1998; LINDSAY; DUBEY; DUNCAN, 1999). A figura 1 ilustra o ciclo biológico de *N. caninum*.

Figura 1- Ciclo Biológico de *Neospora caninum*  
Fonte: (SOARES; GENNARI, 2012).<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Figura fornecida por SOARES e GENNARI, em São Paulo, em 2012.

Nos anos posteriores, se deu o desenvolvimento e a padronização de métodos de diagnóstico, os quais viabilizaram a realização de estudos epidemiológicos (PARE; HIETALA; THURMOND, 1995; BJÖRKMAN; UGGLA, 1999).

Embora a ocorrência seja relativamente frequente nas diferentes espécies animais, a patogenicidade do *N. caninum* varia entre as espécies de hospedeiros. Dentre os animais domésticos, os bovinos se destacam por sua maior suscetibilidade e apresentam perdas na esfera reprodutiva como abortamentos, natimortalidade ou nascimento de bezerros aparentemente saudáveis, porém infectados. A infecção também pode ser transmitida da vaca para o bezerro pela via transplacentária e pode ocorrer ao longo de sucessivas gestações disseminando a infecção no rebanho (DUBEY, 1999).

Desde sua descrição, *N. caninum* vem sendo implicado como um dos principais causadores de aborto em bovinos em várias regiões do mundo. O impacto econômico da infecção por esse parasito está relacionado tanto ao valor dos fetos abortados, quanto aos custos indiretos tais como: auxílio profissional, redução da vida produtiva da vaca, alteração no tempo de lactação, possíveis quedas na produção de leite e custos com diagnóstico (THURMOND; HIETALA; BLANCHARD, 1997).

*Neospora caninum* já foi identificado em tecidos de cães, os quais são hospedeiros definitivos e intermediários (DUBEY et al., 1988b), de ovelhas (DUBEY et al., 1990; PENA et al., 2007), de bovinos (ANDERSON et al., 1991; DIJKSTRA et al., 2002), de cabras (BARR et al., 1993), de cervídeos (DUBEY et al., 1996; VIANNA et al., 2005), de equinos (DUBEY et al., 1999), de suínos (AZEVEDO et al., 2010) e de búfalos (RODRIGUES et al., 2004). Em tecidos de galinhas *N. caninum* já foi detectado por métodos moleculares (COSTA et al., 2008).

Dentre os animais domésticos, anticorpos anti-*N. caninum* já foram verificados em gatos (DUBEY et al., 2002; FERROGLIO et al., 2005; BRESCIANI et al., 2007), suínos (HELMICK et al., 2002; DAMRIYASA et al., 2004), ovinos (HELMICK et al.,



2002; HÄSSIG et al., 2003; FIGLIUOLO et al., 2004; VOGEL et al., 2006; ROMANELLI et al., 2007; ROSSI et al., 2011), caprinos (DUBEY et al., 1996; NAGULESWARAN et al., 2004; FIGLIUOLO et al., 2004; CZOPOWICS et al., 2011), búfalos (FUJII et al., 2001; GENNARI et al., 2005), bovinos (MARQUES et al., 2011; XIA et al., 2011; EIRAS et al., 2011) e em equinos (DUBEY et al., 1999; HOANE et al., 2006; LOCATELLI-DITRICH et al., 2006; VILLALOBOS et al., 2006; MORAVEJI et al., 2011).

Em animais silvestres, anticorpos anti-*N. caninum* já foram encontrados em alpacas, lhamas, camelos (HILALI et al., 1998; SADREBAZZAZ et al., 2006), gambás (YAI et al., 2003), capivaras (YAI et al., 2008), raposas (BUXTON et al., 1997) e coiotes (STIEVE et al., 2010) entre outros. Num estudo realizado no Brasil com cervídeos, verificou-se ocorrência de anticorpos significativamente superior nos cervídeos que viviam em locais próximos aos humanos e seus animais domésticos, quando comparados a cervídeos com menor contato com os animais domésticos (TIEMANN et al., 2005). Tal fato reforça a importância do cão na epidemiologia do agente no ambiente silvestre.

Os coiotes (*Canis latrans*) também foram confirmados como hospedeiros definitivos do coccídio, eliminando oocistos em suas fezes (GONDIM et al., 2004). Recentemente, na Austrália, King et al. (2010) verificaram que o cão australiano dingo (*Canis lupus dingo*) é hospedeiro definitivo do *N. caninum* e Dubey et al. (2011), nos Estados Unidos, observaram que lobos cinzentos (*Canis lupus*) eliminaram oocistos desse coccídio. É desconhecido se outros canídeos ou até mesmo outras espécies animais possam atuar como hospedeiros definitivos de *N. caninum*.

Isolados de *N. caninum* em cães foram obtidos nos Estados Unidos (DUBEY et al., 1988b; CUDDON et al., 1992; MARSH et al., 1998), Reino Unido (BARBER et al., 1995), Alemanha (PETERS; WAGNER; SCHARES, 2000), Brasil (GONDIM et al., 2001), Argentina (BASSO et al., 2001) e Portugal (BASSO et al., 2009).

O primeiro estudo para detectar a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em equinos foi realizado por Dubey et al. (1999). Os autores examinaram 296 amostras de soro de equinos destinados ao abate através do NAT (*Neospora* Agglutination Test), com ponto de corte estabelecido na diluição 1:40. A frequência da ocorrência de anticorpos foi de 23,3% (69 positivos) com títulos de 40 (19), 80 (19), 100 (3), 400, (4) e 800 (17).

No Brasil, foram encontrados anticorpos anti-*Neospora* spp. em equinos de diversos estados como: Minas Gerais, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Goiás pelo ELISA (HOANE et al., 2006), em São Paulo (VILLALOBOS et al., 2006) e Paraná (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006), pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) com ponto de corte de 50 e com valores que variaram de 1,6% a 47% de positividade.

Nos Estados Unidos, Marsh et al. (1996,1998) identificaram uma nova espécie de *Neospora* em um cavalo adulto que apresentava severa incoordenação motora, tendo o parasita sido isolado de cérebro e medula espinhal. Essa nova espécie foi denominada *Neospora hughesi* por possuir diferenças estruturais e moleculares em relação a *N. caninum*.

Existem ainda incertezas com relação às consequências da infecção por estes parasitos em equinos. As principais diferenças entre eles é que os bradizoítos de *N. hughesi* parecem ser menores, os oocistos e os hospedeiros definitivos do *N. hughesi* ainda não foram identificados, os antígenos de *N. hughesi* possuem diferentes proteínas das observadas em *N. caninum* (as proteínas de grânulos densos de *N. hughesi* são diferentes das proteínas correspondentes de *N. caninum*) e os parasitos tem um comportamento biologicamente diferente quando inoculados em roedores, isto é, os gerbilos não são suscetíveis a *N. hughesi*, mas são suscetíveis a *N. caninum* (WALSH et al., 2000; DUBEY et al., 2002).

Dubey e Portfield (1986) relataram o primeiro caso de neosporose em feto equino abortado em 1985. Lindsay et al. (1996) observaram uma égua com cegueira

parcial e encontraram um cisto tecidual de *Neospora* spp. no sistema nervoso central (SNC) desse animal.

Em equinos a neosporose pode causar aborto, doenças neonatais, viscerais, e neurológicas. A neosporose foi diagnosticada em cavalos adultos com sinais clínicos semelhantes aos da mieloencefalite protozoária equina (EPM), causada pelo protozoário *Sarcocystis neurona* (MARSH et al., 1996).

Neosporose visceral foi descrita em fêmea da espécie equina da raça Appaloosa com histórico de perda de peso e anemia (GRAY et al., 1996). Foram encontrados taquizoítos em linfonodos mesentéricos e intestino delgado do animal, os quais foram identificados pela imuno-histoquímica.

Daft et al. (1997) diagnosticaram neosporose em uma égua de 19 anos que apresentava paralisia do membro posterior e comportamento anormal. O protozoário foi observado no SNC, medula espinhal e nervos periféricos. O animal apresentou sinais da Doença de Cushing, o que deve ter contribuído para a imunossupressão e reativação de infecção latente por *Neospora* spp.

Doença neurológica causada por *N. hughesi* foi diagnosticada em cavalos adultos nos Estados Unidos. Houve um caso de infecção por *Neospora* em equino da raça quarto de milha com 13 anos de idade, procedente do Alabama, EUA. O animal apresentou ataxia e fraqueza no membro posterior durante cinco meses. Na necropsia nenhuma lesão macroscópica foi evidenciada (CHEADLE et al., 1999).

O primeiro caso de EPM causado pelo *Neospora hughesi* no Canadá foi relatado por Woebeser et al. (2009). O protozoário foi identificado como *N. hughesi*, tendo sido encontrado em lesões inflamatórias de SNC de um equino adulto com 10 anos de idade. O animal apresentou sinais neurológicos como ataxia, dificuldade em erguer-se e foi sacrificado. Nos cortes histológicos de vários órgãos, corados pela hematoxilina-eosina, lesões significantes foram encontradas na porção cervical e SNC, tais como agregado linfocitário multifocal ou circunferencial à massa encefálica. Para confirmação do diagnóstico foi realizada a imuno-histoquímica, sendo positiva para *Neospora* e logo após a PCR para diagnóstico de espécie.

Outro relato de caso de EPM causada por *N. hughesi* foi feito na Califórnia. Em uma mula com enfermidade motora, anormalidades oculares e andar cambaleante observou-se anisocoria, estrabismo, ptose palpebral, déficit do reflexo pupilar, dentre outros. Anormalidades neurológicas incluíam paralisia do nervo facial e atrofia muscular neurogênica. Para confirmação de mieloencefalite pelo *N. hughesi* foram realizados apenas testes sorológicos para a presença de *Sarcocystis neurona* com resultado negativo e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para *N. hughesi* com título de 40, sendo estes considerados positivos (FINNO et al., 2010).

Cheadle et al. (1999) utilizaram a RIFI, com ponto de corte de 50, para determinar a frequência da ocorrência de anticorpos específicos para *N. caninum* nos soros de 536 equinos do Alabama, Estados Unidos, sem sintomatologia clínica e submetidos ao diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina. Anticorpos IgG anti-*Neospora* spp. estavam presentes em 62 (11,5%) animais, com títulos de 1:50 em 35 animais (6,5%), 1:100 em 19 animais (3,5%), 1:200 em 7 animais (1,3%) e 1:600 em um animal (0,2%).

Com o objetivo de verificar a existência de associação entre a presença de anticorpos séricos anti-*Neospora* spp. e histórico recente de falhas reprodutivas em animais da espécie equina, Villalobos et al. (2006) realizaram um estudo com 1106 amostras de soros de equinos. As amostras foram divididas em dois grupos: animais com falhas reprodutivas (500 equinos) e grupo controle sem falhas reprodutivas (606 equinos). Pela RIFI ( $\geq 50$ ) anticorpos anti-*Neospora* spp. foram encontrados em 114 (10,3%) animais sendo 15,4% (77/500) para os com falhas reprodutivas e de 6,1% (37/606) para os controles. Associação entre positividade para *Neospora* spp. e a presença de distúrbios reprodutivos foi observada.

Villalobos et al. (2012) realizaram um estudo de prevalência de anticorpos anti-*Neospora* sp. em 97 cavalos de carroceiros aparentemente saudáveis de Curitiba (25) e São José dos Pinhais (72), Paraná, utilizando a RIFI e encontraram um (4%) e 13 (18%) animais, respectivamente, positivos para esse coccídio.

## 1.2 *Toxoplasma gondii*

As primeiras descrições de *T. gondii* ocorreram quase simultaneamente em diferentes partes do mundo. No Brasil, Splendore (1908) descreveu o parasita em coelhos e, na África, Nicolle e Manceaux (1908) descreveram taquizoítos do parasita em tecidos de um roedor africano, *Ctenodactylus gundi*. Em 1909, Nicolle e Manceaux introduziram o gênero *Toxoplasma*. O nome *Toxoplasma* (toxos = arco; plasma = forma, grego) refere-se a sua forma em lua crescente. Mais de 60 anos depois, em 1970, o conhecimento sobre o ciclo biológico de *T. gondii* foi completado através da descoberta dos estágios sexuais do parasito no intestino delgado de gatos (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970a, b).

O ciclo biológico de *T. gondii* é heteroxeno facultativo. A fase assexuada de desenvolvimento ocorre em vários tecidos dos hospedeiros intermediários (mamíferos e aves), resultando na formação de cistos, e a fase sexuada de desenvolvimento ocorre no intestino delgado dos hospedeiros definitivos (gatos domésticos e outros membros da família *Felidae*), resultando na formação dos oocistos (DUBEY; BEATTIE, 1988; LINDSAY; BLAGBURN; DUBEY, 1997). Há três estágios infectantes que são os taquizoítos livres ou em pseudocistos em diversos órgãos, os bradizoítos nos cistos teciduais e os esporozoítos nos oocistos esporulados. Os três estágios são infectantes para hospedeiros intermediários e definitivos (DUBEY; BEATTIE, 1988).

Nos hospedeiros intermediários, após a infecção com qualquer dos estágios infectantes, há a multiplicação rápida dos taquizoítos por endodiogenia em diferentes tipos de células, culminando na formação dos cistos teciduais. Os cistos contêm bradizoítos, que são estágios que se dividem lentamente, também por endodiogenia, e se localizam predominantemente no cérebro e musculatura cardíaca e esquelética, persistindo por um longo período, provavelmente por toda a

vida do hospedeiro (DUBEY; FRENKEL, 1972; DUBEY; FRENKEL, 1976; DUBEY; BEATTIE, 1988).

Os felinos são considerados as espécies-chave na transmissão de *T. gondii* para o Homem e outras espécies animais por serem os únicos hospedeiros a excretarem os oocistos nas fezes (DUBEY; BEATTIE, 1988). Um único gato pode eliminar até 10 milhões de oocistos, que se tornam infectantes após esporulação no ambiente (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970a; FRENKEL; DUBEY; MILLER, 1970).

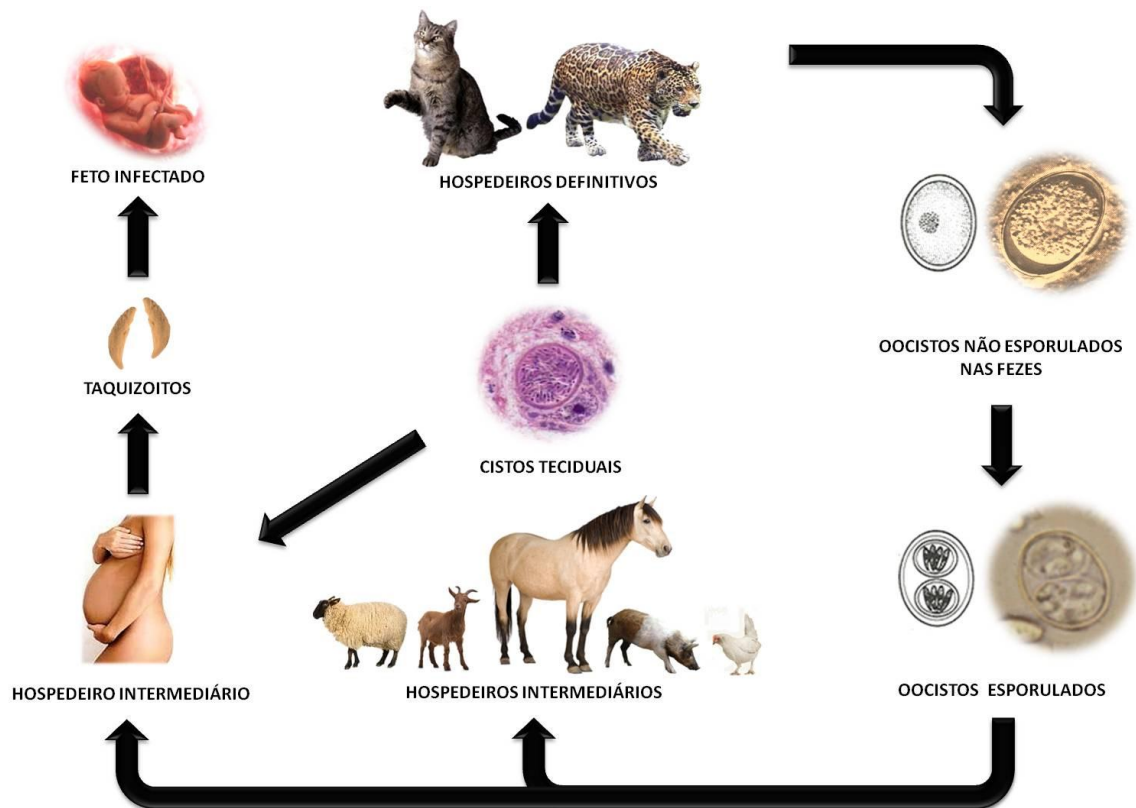
Todos os gatos domésticos são suscetíveis à infecção, independentemente de sexo, idade ou raça (DUBEY; HOOVER; WALLS, 1977) e aqueles com menos de um ano de idade produzem o maior número de oocistos; animais adultos não infectados também eliminam oocistos ao ingerirem cistos, mas a excreção é menor e por um período mais curto (DUBEY; HOOVER; WALLS, 1977; DUBEY; BEATTIE, 1988; LINDSAY; BLAGBURN; DUBEY, 1997).

Os gatos adquirem uma forte imunidade intestinal após a primo-infecção, raramente re-excretando oocistos. Dubey (1995) observou uma nova eliminação em 55% de gatos desafiados seis anos após a infecção primária. Alguns gatos podem eliminar novamente oocistos, mesmo sem reinfecção, quando imunodeprimidos ou infectados com *Isospora* spp (CHESSUM, 1972; DUBEY; FRENKEL, 1974; DUBEY, 1976).

A figura 2 ilustra o ciclo biológico de *T. gondii*.



Figura 2 - Ciclo de Biológico de *Toxoplasma gondii*.  
 Fonte: (SOARES; GENNARI, 2012)<sup>2</sup>.



Os equinos parecem ser uma das espécies mais resistentes no desenvolvimento clínico da toxoplasmose (AL-KHALID; DUBEY, 1979), entretanto, sinais clínicos caracterizados por hiper irritabilidade, incoordenação motora, distúrbios oculares e abortamento já foram relatados (DUBEY; PORTFIELD, 1986; TURNER; SAVVA, 1991).

Dubey, Kerber e Granstrom (1999) afirmaram que não há evidências de que a doença clínica ocorra em equinos, enfatizando que os cistos teciduais do parasito podem persistir no tecido por vários meses.

A prevalência do *T. gondii* em equinos é muito baixa e Dubey et al. (1999) consideram que o risco de contrair infecção através do consumo da carne desses animais seria bastante baixo e esta espécie não teria uma importância

<sup>2</sup> Figura fornecida por Soares e Gennari, em São Paulo, em 2012.

epidemiológica significativa. No entanto, a carne de equinos pode veicular cistos de *T. gondii*, representando assim, um problema de saúde pública. Além disso, constituem uma fonte de infecção para animais de zoológico que são alimentados com esse tipo de carne, em especial os felídeos silvestres que são hospedeiros definitivos do agente, podendo eliminá-lo no meio ambiente por meio das fezes (MENDONÇA et al., 2001).

No Brasil, Macruz et al. (1975) relataram o surgimento, em equinos Puro Sangue Inglês do Estado de São Paulo, de casos clínicos caracterizados por incoordenação motora, andar em círculo, abortamento e irritabilidade excessiva sugerindo tratar-se de toxoplasmose, após a eliminação de outras causas. Foram realizadas provas sorológicas nos soros destes animais revelando 100% de positividade ao teste de Sabin-Feldman. A conclusão dos autores foi de que estes animais estavam acometidos de toxoplasmose recém-introduzida neste rebanho. Vale lembrar que nesse período, outro coccídio responsável por quadro semelhante, *Sarcocystis neurona*, ainda não tinha sido associado a essa doença.

O quadro 1 relaciona os estudos de pesquisa de anticorpos contra *T. gondii* em equinos no Brasil , indicando o teste sorológico e o ponto de corte.



Quadro 1 – Relação dos estudos de pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* realizados no Brasil com equídeos

Referência	Estado (Município)	Amostras Analisadas	% de Positivas	Teste	Ponto de corte
<b>CAVALOS</b>					
Ishizuka; Miguel; Brogliato (1975)	São Paulo (São Paulo)	327	70	RIFI	16
Silva et al. (1981)	Rio Grande do Sul (Porto Alegre)	100	8	IHA	16
Laranjeira; Ishizuka; Hyakutake (1985)	Mato Grosso do Sul	750	32	RIFI	16
Braccini et al. (1992)	Rio Grande do Sul (Porto Alegre)	98	2	IHA	63
Gazêta et al. (1997)	Rio de Janeiro (12 cidades)	430	4,4	RIFI	64
Vidotto et al. (1997)	Paraná (Apucarana)	561	31,5	RIFI	16
Garcia et al. (1999)	Paraná (Jaguapitã)	173	12,1	RIFI	16
Mendonça et al. (2001)	Bahia (Jacobina e Jequié)	124	1,61	RIFI	64
Naves; Ferreira; Costa (2005)	Minas Gerais (Uberlândia)	117	12,8	RIFI	Nc
Villalobos et al. (2005)	São Paulo (Vale do Ribeira)	170	47	RIFI	64
<b>JUMENTOS</b>					
Mendonça et al. (2001)	Bahia (Jacobina e Jequié)	197	1,52	RIFI	64
Oliveira et al. (2012)	Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba e Sergipe	88	43,2	RIFI	64
<b>MULAS</b>					
Mendonça et al. (2001)	Bahia (Jacobina e Jequié)	22	0	RIFI	64
Oliveira et al. (2012) <sup>3</sup>	Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba e Sergipe	395	23,8	RIFI	64

<sup>3</sup> OLIVEIRA, E.; ALBUQUERQUE, P. P. F.; NETO, O. L. S.; FARIA, E. B.; JUNIOR, J. W. P.; MOTA, R. A. Occurrence of Antibodies to *Toxoplasma gondii* in Mules and Donkeys in the Northeast of Brazil. **Journal of Parasitology**, 2012. No prelo

Fora do Brasil estudos de ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em equinos foram realizados na Tunísia com ocorrência de 17,7% de positivos (BOUGHATTAS et al., 2011), Costa Rica com 34% (DANGOUDOUBIYAM et al., 2011), México com 6,1% (ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2012) e Espanha, sendo 10,8% em cavalos, 15% em mulas e 25,6% em jumentos (GARCIA-BOCANEGRA et al., 2012).

Devido ao uso de amostragens distintas, técnicas e pontos de corte diversos, comparações entre valores de ocorrência devem ser feitas com cuidado.

### **1.3 Animais do Estudo**

No Brasil, segundo dados do IBGE de 2010 existiam 1.277.419 mulas, 1.001.587 jumentos e 5.514.253 cavalos.

#### **1.3.1 JUMENTOS**

O jumento (*Equus asinus*) é um mamífero pertencente à família dos Equídeos, podendo ser chamado de jégue ou asno.

Em alguns países se utilizam jumentos para os mesmos serviços que o cavalo e o muar, como montaria, carga e tração, de acordo com seu tipo e as necessidades. No Brasil é mais comum utilizá-los como cargueiros e mais raramente como montaria, principalmente no Nordeste onde são mais numerosos. Sua maior importância está na sua capacidade de hibridar-se com a égua, produzindo o muar.

A carne de jumento é considerada uma das melhores, superando a do cavalo. Nos últimos anos, no Nordeste, grande quantidade de jegues tem sido abatidos para a exportação da carne.

O uso do jumento reprodutor como montaria não é favorável devido a hábitos de empacar, passarinhar e morder, que podem ser hábitos hereditários ou devido a um mau adestramento (TORRES; JARDIM, 1985).

### 1.3.2 CAVALOS

Os cavalos (*Equus caballus*) podem superar os muares em algumas características tais como: podem se reproduzir; são mais pesados e superiores nas provas de tração; são mais rápidos e mais indicados para trabalhos gerais, convivem melhor com outros animais, tanto no trabalho quanto na cocheira.

No Brasil, a produção de carne de equinos, afastados do trabalho e da reprodução, tem aumentado, tendo por destino principal a exportação (TORRES; JARDIM, 1985).

A exportação de cavalos vivos mostrou uma expansão significativa, alcançando 524% entre 1997 e 2009, passando de US\$ 702,8 mil para US\$ 4,4 milhões. O Brasil é o oitavo maior exportador de carne equina. Bélgica, Holanda, Itália, Japão e França são os principais importadores da carne de cavalo brasileira, também consumida nos Estados Unidos ([www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br), 2010).

### 1.3.3 MULAS

As mulas são o cruzamento de jumento com égua e são um grande auxiliar do lavrador brasileiro, na tração de máquinas agrícolas e nos transportes, tanto dentro da propriedade, como fora dela.

Os muares no Brasil são mais usados na tração de carroças, charretes, máquinas agrícolas leves (arados de aiveca, cultivadores, sulcadores, semeadeiras adubadeiras), no transporte de carga sobre o dorso, nas regiões montanhosas e acidentadas, na montaria, podendo fazer etapas de 30 a 40 km/dia, sem esgotar-se.

A densidade do casco, com muralha dura e sola arqueada, habilita-se a suportar bem as batidas e choques contra a pavimentação das ruas e os terrenos pedregosos, o que o torna um importante animal em algumas localidades (TORRES; JARDIM, 1985).

## 2 OBJETIVOS

Este estudo teve por objetivos determinar a soroprevalência de anticorpos contra *Neospora* spp. e *Toxoplasma gondii* em equídeos do Brasil e isolamento e caracterização genética desses coccídios em amostras teciduais de equídeos soropositivos

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

O procedimento experimental foi realizado nos laboratórios do Setor de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) com aprovação da Comissão de Ética da FMVZ-USP nº 2257/2011.

#### **3.1 Animais Amostrados**

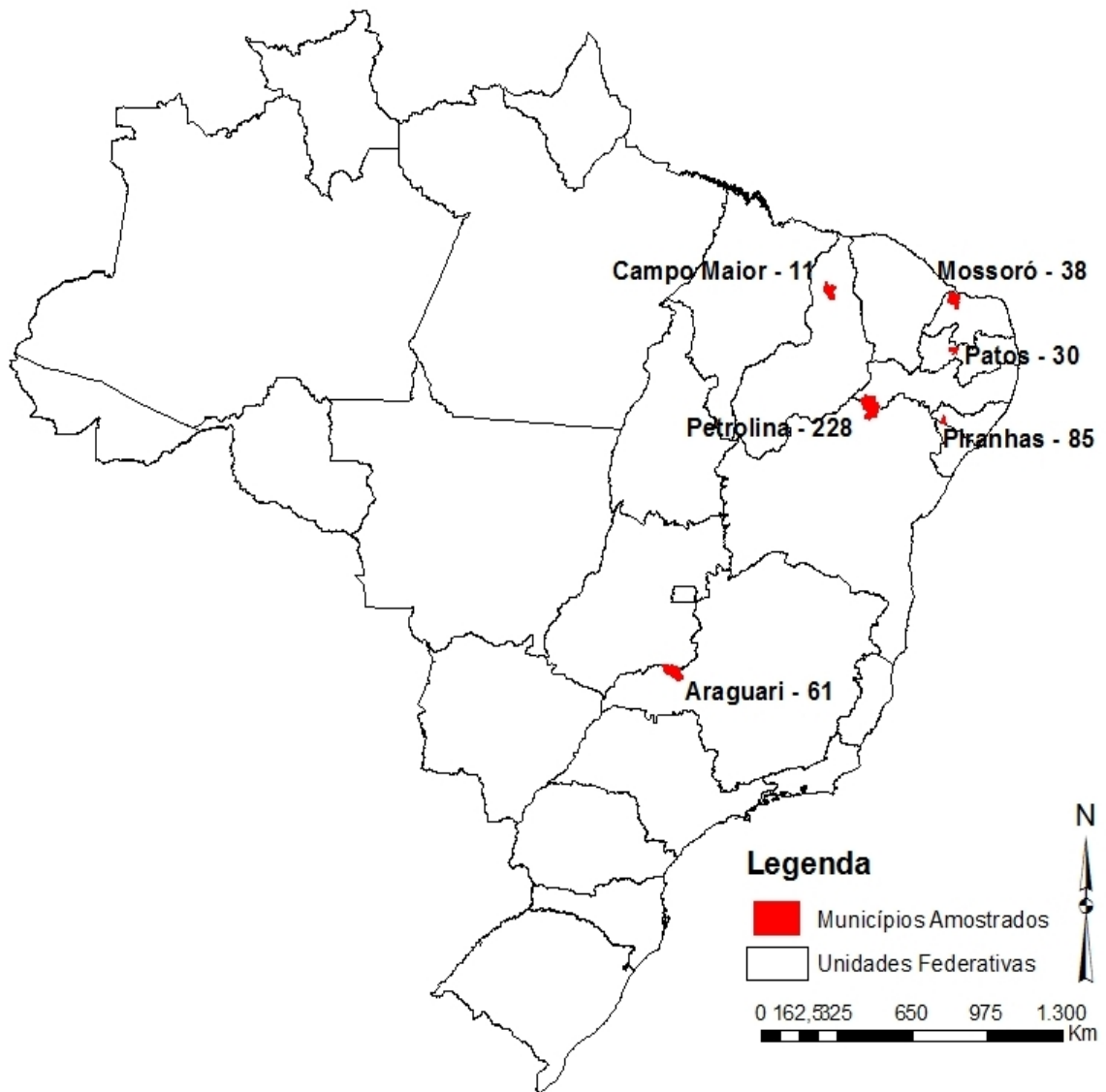
Amostras de sangue foram coletadas utilizando-se seringa, agulha e frascos sem anticoagulante. Foram amostrados equídeos de propriedades rurais de cinco estados da região Nordeste do Brasil, totalizando 392 animais. Também foram amostrados 61 equinos de um frigorífico do município de Araguari, Minas Gerais, sudeste brasileiro. Nesse frigorífico a real procedência dos animais não é conhecida.

As localidades de origem das amostras estão ilustradas na figura 3.

O sangue foi mantido a temperatura ambiente por 6 horas e o soro obtido foi centrifugado a 12000 rpm durante 5 minutos. As amostras foram aliqüotadas e mantidas a -4°C até as análises laboratoriais.

O quadro 2 ilustra a procedência e quantidade de amostras obtidas por espécie animal estudada.

Figura 3- Mapa do Brasil com a localização dos estados e municípios de procedência das amostras e a quantidade amostrada



Quadro 2- Número de amostras de soros coletadas de equídeos, por município e estado

Município	Estado	Número de Amostras			
		Equinos	Jumentos	Mulas	Total
Araguari*	Minas Gerais	61	0	0	61
Campo Maior	Piauí	0	11	0	11
Mossoró	Rio Grande do Norte	0	38	0	38
Patos	Paraíba	0	30	0	30
Petrolina	Pernambuco	57	140	31	228
Piranhas	Alagoas	0	85	0	85
<b>TOTAL</b>		118	304	31	453

\*Animais obtidos do Abatedouro do Município de Araguari (MG), procedência desconhecida.

### 3.2 Análise Sorológica

#### 3.2.1 *N. CANINUM*

Os soros dos equídeos foram analisados utilizando a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), para anticorpos anti-*N. caninum* com ponto de corte de 50 conforme descrito por Dubey et al. (1988b). Os soros foram diluídos a 1:50 em tampão fostato pH 7,2 (0,0084M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,0018M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,147M



NaCl) acrescentado de soro albumina bovina 1%, sendo em seguida distribuídos 20 µL por orifício em lâminas contendo o antígeno específico fixado.

Após 30 minutos de incubação em estufa a 37°C, as lâminas foram lavadas com solução tampão carbonatada pH 9,0 (0,108M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,4M NaHCO<sub>3</sub> e 0,145M NaCl) por três vezes e, em seguida, incubadas com conjugado IgG de coelho anti-IgG equino (KPL- EUA) marcado com isotiocianato de fluoresceína. As lâminas foram novamente incubadas por 30 minutos a 37°C e lavadas como descrito anteriormente. Após a secagem à temperatura ambiente, foi realizada a montagem com lamínula utilizando glicerina tamponada pH 8,0.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio epifluorescente (OLYMPUS BX-FLA, Japão) e foram considerados positivos os soros capazes de determinar fluorescência em todo contorno do antígeno. As amostras positivas foram diluídas na razão dois, para obtenção do título final. Em cada série foram incluídos soros testemunhas de títulos positivo e negativo previamente conhecidos. Os soros também foram diluídos a 1:25, mas a fluorescência ocorreu apenas em região apical, sendo considerados como inespecíficos.

### 3.2.2 *T. GONDII*

Os soros dos equídeos foram analisados para *T. gondii* pela RIFI conforme descrito por Camargo (1964). Os soros dos animais foram diluídos a 1:64 (ISHIZUKA; MIGUEL; BROGLIATO, 1975) em tampão fosfato pH 7,2 acrescentado de soro albumina bovina 1%, sendo em seguida distribuídos 20 µL por orifício em lâminas contendo o antígeno específico fixado.

Após 30 minutos de incubação em estufa a 37°C, as lâminas foram lavadas por três vezes e, em seguida, incubadas com conjugado IgG de coelho anti-IgG equino (KPL- EUA) marcado com isotiocianato de fluoresceína. As lâminas foram novamente incubadas por 30 minutos a 37°C e lavadas como descrito anteriormente. Após a secagem à temperatura ambiente, foi realizada a montagem com lamínula utilizando glicerina tamponada pH 8,0. A leitura foi realizada em microscópio epifluorescente (OLYMPUS BX-FLA, Japão).

Foram considerados positivos os soros capazes de determinar fluorescência em todo contorno do antígeno. As amostras positivas foram diluídas na razão dois, para obtenção do título final. Em cada série foram incluídos soros testemunhas de títulos positivo e negativo previamente conhecidos.

### **3.3 Isolamento do *T. gondii***

#### **3.3.1 BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS**

De alguns dos equídeos positivos à presença de anticorpos anti-*T. gondii* pela RIFI foi possível a obtenção de tecidos e realizou-se o bioensaio em camundongos. Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss, fêmeas, com aproximadamente dois meses de idade, numa tentativa de isolar-se *T. gondii* desses equídeos.

Cada tecido foi homogeneizado individualmente, digerido em pepsina ácida, neutralizado e lavado. Em seguida, o homogenado foi inoculado por via subcutânea nos camundongos conforme descrito por Dubey (1998).

Um fragmento do cérebro dos camundongos que vieram a óbito foi coletado, colocado em lâminas para pesquisa de cistos de *T. gondii*. Um fragmento do pulmão foi colocado em solução fisiológica e analisado para a presença de taquizoítos de *T. gondii*. Os camundongos sobreviventes foram sangrados 60 dias pós-inoculação (P.I.) e anticorpos anti-*T. gondii* foram pesquisados usando a diluição de 1:16 pela RIFI. Os camundongos que não vieram a óbito foram eutanasiados oito semanas P.I. e os cérebros examinados para a presença de cistos como descrito por Dubey e Beattie (1988). Os camundongos foram considerados infectados com *T. gondii* quando taquizoítos ou cistos foram encontrados nos tecidos.

Os tecidos utilizados para o bioensaio em camundongos nem sempre foram os mesmos, pois dependiam das facilidades encontradas durante as necropsias. O quadro 3 apresenta a relação de tecidos examinados por animal amostrado e o número de camundongos inoculados durante o bioensaio.

Devido à dificuldade de obtenção de tecidos de equídeos, 51 equinos procedentes do frigorífico de Araguari, MG, mesmo sendo negativos na RIFI tiveram seus órgãos examinados pelo bioensaio. Nesses animais, utilizou-se um *pool* de tecidos constituído por língua, cérebro e coração. Cada *pool* era formado por cinco equinos e quatro camundongos foram inoculados por *pool* de tecidos, sendo realizados um total de 10 *pools*.

Foram feitos 29 bioensaios ao todo, sendo: 19 de animais soropositivos para *T. gondii* e 10 bioensaios com *pools* de animais soronegativos. Dos 19 bioensaios de equídeos soropositivos, em nove deles 20 camundongos foram inoculados com: cérebro (cinco camundongos), coração (cinco camundongos), língua (cinco camundongos) e diafragma (cinco camundongos) e nos outros 10 bioensaios de *pools* de animais utilizou-se 10 camundongos, com material do cérebro (quatro camundongos), língua (três camundongos) e coração (três camundongos) dos equídeos.

De nenhum dos animais soropositivos para *Neospora* spp. foi possível a obtenção de tecidos, não tendo sido possível a tentativa de isolamento desse coccídio por bioensaio em gerbilos.

Quadro 3- Distribuição do número de camundongos por tecidos de equídeos e identificação das espécies analisadas

<b>Espécie</b>	<b>Município (Estado)</b>	<b>Identificação</b>	<b>Número de camundongos inoculados</b>
<b>Jumentos</b>	Mossoró (RN)	Mo 6	20*
	Patos (PB)	Pa 31	20*
	Patos (PB)	Pa 37	20*
	Patos (PB)	Pa 41	20*
	Piranhas (AL)	Pi 294	20*
	Piranhas (AL)	Pi 295	20*
	Piranhas (AL)	Pi 296	20*
	Piranhas (AL)	Pi 297	20*
	Piranhas (AL)	Pi 298	20*
<b>Cavalos</b>	Araguari (MG)	Ar 379	10 <sup>□</sup>
	Araguari (MG)	Ar 380	10 <sup>□</sup>
	Araguari (MG)	Ar 381	10 <sup>□</sup>
	Araguari (MG)	Ar 382	10 <sup>□</sup>
	Araguari (MG)	Ar 383	10 <sup>□</sup>
	Araguari (MG)	Ar 384	10 <sup>□</sup>
	Araguari (MG)	Ar 385	10 <sup>□</sup>
	Araguari (MG)	Ar 386	10 <sup>□</sup>
	Araguari (MG)	Ar 387	10 <sup>□</sup>
	Araguari (MG)	Ar 388	10 <sup>□</sup>
	Araguari (MG)	Pool 1	4 <sup>◇</sup>
	Araguari (MG)	Pool 2	4 <sup>◇</sup>
	Araguari (MG)	Pool 3	4 <sup>◇</sup>
	Araguari (MG)	Pool 4	4 <sup>◇</sup>
	Araguari (MG)	Pool 5	4 <sup>◇</sup>
	Araguari (MG)	Pool 6	4 <sup>◇</sup>
	Araguari (MG)	Pool 7	4 <sup>◇</sup>
	Araguari (MG)	Pool 8	4 <sup>◇</sup>
	Araguari (MG)	Pool 9	4 <sup>◇</sup>
	Araguari (MG)	Pool 10	4 <sup>◇</sup>

\* Órgãos analisados (nº de camundongos): cérebro (5), diafragma (5), língua (5), coração (5)

□ Órgãos analisados (nº de camundongos): cérebro (4), língua (3), coração (3)

◇ Pools de 5 equídeos- órgãos analisados (nº de camundongos): cérebro/língua/coração (4)

### 3.4 Identificação Molecular dos Protozoários

Para a identificação molecular dos protozoários foi realizada a extração de DNA utilizando o fenol-clorofórmio, PCR, *nested*-PCR. As amostras foram processadas no laboratório de Encefalites do Instituto Biológico da Secretaria do Município de São Paulo.

#### 3.4.1 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído de tecidos dos equídeos submetidos ao bioensaio (amostras primárias) e dos isolados obtidos no modelo camundongo, conforme os seguintes procedimentos:

As etapas de digestão, purificação e precipitação do DNA foram feitas conforme sugerido por Ausubel et al. (1999). Brevemente, uma alíquota de 500µL dos tecidos foram digeridos com proteinase K (20mg/µL), o DNA foi purificado pelo método de fenol-clorofórmio (v/v), precipitado com etanol 70% e finalmente ressuspendido em TE pH 8,0 e estocado a -20°C até a reação de PCR.

### 3.4.2 PCR E NESTED-PCR

A amplificação das sequências do ITS-1 dos protozoários da família *Toxoplasmatinae* foi obtida em duas etapas.

A PCR foi realizada com os *primers* externos JS4 (SLAPETA et al., 2002) e CT2c (SOARES et al., 2011) e na *nested*-PCR com os *primers* internos JS4b e CT2b (SOARES et al., 2011). As sequências senso e antisenso destes *primers* estão apresentadas no quadro 4.

Quadro 4 - Sequência de *primers* utilizados nas reações de PCR e da *nested* PCR- ITS1 para identificação de protozoários da família *Toxoplasmatinae*

<b>Primers</b>	<b>Sequência (5' - 3')</b>
<b>JS4</b>	CGA AAT GGG AAG TTT TGT GAA C
<b>CT2c</b>	CTG CAA TTC ACA TTG CGT TTC GC
<b>JS4b</b>	AGT CGT AAC AAG GTT TCC GTA GG
<b>CT2b</b>	TTG CGC GAG CCA AGA CAT C

Na PCR, 2,5µL de DNA foram diluídos em 22,5µL de mix de PCR, conforme o seguinte protocolo de reação:

- 2,5 µL de tampão de reação (KCl 8mM: tris -HCl 10mM, pH 9,0, Invitrogen®, Estados Unidos)
- 0,5µL da mistura de dNTPs (10mM)
- 1,5 µL do primer JS4 (10µM)
- 1,5 µL do primer CT2c (10µM)
- 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM, Invitrogen®, Estados Unidos)

- 0,15 µL de taq DNA polimerase (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen®, Estados Unidos) (5U/µL)
- Água ultrapura 15,6µL

Os produtos da PCR foram utilizados como *template* numa segunda etapa (*nested- PCR*) utilizando 24,5µL da mesma mistura de reação descrita e 1µL do produto da PCR, com a substituição dos *primers* (JS4b e CT2b).

O ciclo de reação utilizado foi o seguinte:

Desnaturação inicial _____	94°C por 3 min
Desnaturação _____	94°C por 40 seg
Hibridização _____	56°C por 30 seg
Extensão _____	72°C por 30 seg

Este ciclo repetiu-se por 35 vezes a partir da desnaturação até a extensão na PCR e na *nested- PCR*, a 72°C por 5 min.

Controles negativos e positivos (RH- *Toxoplasma gondii*) foram incluídos a cada reação. Os produtos da *nested PCR*- ITS-1 foram analisados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (solução a 0,5 µg/mL) por 30 minutos e documentado sob transiluminação com luz ultravioleta para visualização das bandas. Foi esperado um padrão de banda de 500pb para a família *Toxoplasmatinae*.



### 3.5 Caracterização Genética dos Isolados de *Toxoplasma gondii*

Para a caracterização genética foi realizada a PCR- RFLP do isolado do jumento de Mossoró, RN.

#### 3.5.1 MARCADORES

Foram utilizados 12 marcadores moleculares que permitem distinguir, as linhagens clonais tipo I, tipo II e III. Após a amplificação do DNA, este foi submetido a enzimas de restrição, numa reação de RFLP como descrito por Su, 2006. No quadro 5, podem ser visualizadas as informações referentes aos marcadores utilizados, localização, oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), tamanho dos produtos obtidos e enzimas de restrição.

#### 3.5.2 PCR E NESTED-PCR

As sequências de DNA-alvo foram primeiramente amplificadas por multiplex PCR usando *primers* externos para todos os marcadores, seguido de *nested*- PCR de forma individual, para cada um dos marcadores.

Foi utilizada a seguinte mistura de reagentes na PCR, para uma reação em 25 $\mu$ L: tampão de reação (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0), 200 $\mu$ M de cada nucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,3 $\mu$ M de cada primer, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,75 unidades de *Taq* DNA polimerase e 1,5 $\mu$ L de DNA extraído. Na *nested*- PCR foi utilizada a mesma mistura e 1,5  $\mu$ L da amostra amplificada. A genotipagem dos controles positivos e das amostras de referência utilizados em todas as corridas de PCR pode ser visualizada no Quadro 6. Como controle negativo foi utilizada água ultrapura estéril.

A mistura de reação da PCR foi submetida a uma desnaturação inicial (95°C por 4 min), seguida de 25 ciclos de desnaturação (94°C por 30 seg), hibridização (55°C por 30 seg) e extensão (72°C por 1.5 min). A mistura de reação da *nested*- PCR foi submetida a uma desnaturação inicial (95°C por 4 min), seguida de 35 ciclos de desnaturação (94°C por 30 seg), hibridização (60°C por 1 min) e extensão 72°C por 2 min.

### 3.5.3 PCR-RFLP

A fim de investigar o padrão de RFLP de cada amostra, 3 $\mu$ L de cada produto de *nested*- PCR foram misturados em 17 $\mu$ L de reação de digestão contendo tampão NEB (1x), 0,1mg/ml de BSA, e uma unidade de cada enzima de restrição. As amostras foram incubadas na temperatura indicada pelo fabricante como ideal para cada enzima. Após a incubação, as amostras foram submetidas à análise em gel de agarose a 2,0-3,0%, contendo 0,3 $\mu$ g de brometo de etídeo, em cuba horizontal com solução tampão TBE, pH 8,0 (Tris-borato 0,045M; EDTA 0,001M), juntamente com um marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases, e visualizadas sob luz ultravioleta, utilizando-se um analisador de imagem (Alpha Innotech Corp, San Leandro, CA,USA) .

Quadro 5 - Informações referentes aos marcadores genéticos e às endonucleases utilizadas na PCR/RFLP

Marcador	Nº cromossomo	PCR primers	Tamanho (bp)	Enzimas de Restrição	Digestão enzimática e eletroforese	Referência
c22-8	1b	c22-8F:TCTCTCTACGTG- GACGCC c22-8R:AGGTGCTTG- GATATTCGC	521	<i>BsmAI</i> , <i>MbolI</i>	NEB2, BSA, 37°C 30 min 55°C 30 min 2.5% gel	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
c29-2	III	c29-2F:AGTTCTGCA- GAGTGTGCG c29-2R:TGTCTAGGAAAGAGGCGC	446	<i>HpyCH4IV</i> , <i>RsaI</i>	NEB1, BSA, 37°C 60 min 2.5% gel	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
L358	V	L358-F2:AGGAGGCG- TAGCGCAAGT L358-R2:CCCTCTGGCTGCAGTGTCT	418	<i>HaeIII</i> , <i>NlaIII</i>	NEB4, BSA, 37°C 60 min 2.5% gel	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
PK1	VI	PK1-F:CGCAAAGGGAGA- CAATCAGT PK1-R:TCATCGCT- GAATCTCATTGC	903	<i>AvaI</i> , <i>RsaI</i>	NEB4, BSA, 37°C 60 min 2.5% gel	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
SAG1	VIII	SAG1-F:GTTCTAACCACGCACCCTGAG SAG1-R:AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	390	<i>Sau96I</i> , <i>HaeII</i>	NEB4, BSA, 37°C 60 min 2.5% gel	Grigg et al. (2001)
5'3' SAG2	VIII	SAG2-F:TCTTGTCTCCGAAGTGACTCC SAG2- R:TCAAAGCGTGCATTATCGC	222	<i>HhaI</i>	NEB4, BSA, 37°C 60 min 2.5% gel	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
alt. SAG2	VIII	SAG2Fa:ACCCATCTGCGAA- GAAAACG SAG2-Ra:ATTTC- GACCAGCGGGAGCAC	546	<i>HinfI</i> , <i>TaqI</i>	NEB3, BSA, 37°C 30 min, 65°C 30 min 2.5% gel	Lehmann et al. (2006) Su et al. (2006)
BTUB	IX	SAG2-Fa:ACCCATCTGCGAA- GAAAACG SAG2-Ra:ATTTC- GACCAGCGGGAGCAC	411	<i>BsiEI</i> , <i>TaqI</i>	NEB4, BSA, 60°C 60 min 2.5% gel	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
GRA6	X	GRA6-F1:TTTCCGAG- CAGGTGACCT GRA6- R1x:TCGCCGAAGAGTTGA- CATAG	344	<i>MseI</i>	NEB2, BSA, 37°C 60 min 2.5% gel	Fazaeli et al. (2000) Su et al. (2006)
SAG3	XII	P43S1:CAACTCTCAC- CATTCCACCC-3 P43AS1:GCGCGTTGTTAGA- CAAGACA	311	<i>NciI</i>	NEB4, BSA, 37°C 60 min 2.5% gel	Grigg et al. (2001)
Apico	Plastídeo	P43S1:CAACTCTCAC- CATTCCACCC-3 P43AS1:GCGCGTTGTTAGA- CAAGACA	640	<i>AflI</i> , <i>DdeI</i>	NEB2, BSA, 37°C 60 min 3% gel	Su et al. (2006)
CS3	VIIa	CS3-F:GTGTATCTCCGAGGGGTCT CS3-R:TGTGACTTCTTCGCATCGAC	557	<i>MbolI</i> , <i>NlaIII</i>	NEB4, BSA, 37°C 60 min 2.5% gel	Khan et al. (2005)

Quadro 6 - Amostras de referência de *Toxoplasma gondii* utilizadas como controle positivo da reação de PCR/RFLP

Genótipos de referência	Marcadores genéticos											
	SAG1*	5'3'SAG2 <sup>†</sup>	Alt. SAG2 <sup>§</sup>	SAG3	BTUB	GRA6	C22-8	C29-2	L358	PK1	APICO	CS3
RH88 (tipo I)	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
PTG (tipo II)	II ou III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II
CTG (tipo III)	II ou III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III
TgCgCa1 (Cougar)	I	II	II	III	II	II	II	u-1	I	u-2	I	II
MAS	u-1	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	II
TgCatBr5	I	III	III	III	III	III	I	I	I	u-1	I	II

\*No locus SAG1 Não é possível distinguir entre os tipos II e III

<sup>†</sup>Marcador SAG2 baseado na terminação 5' e 3' do gene (HOWE et al., 1997)

<sup>§</sup>Novo marcador SAG2 baseado na terminação 5' da sequência do gene (SU et al., 2006)

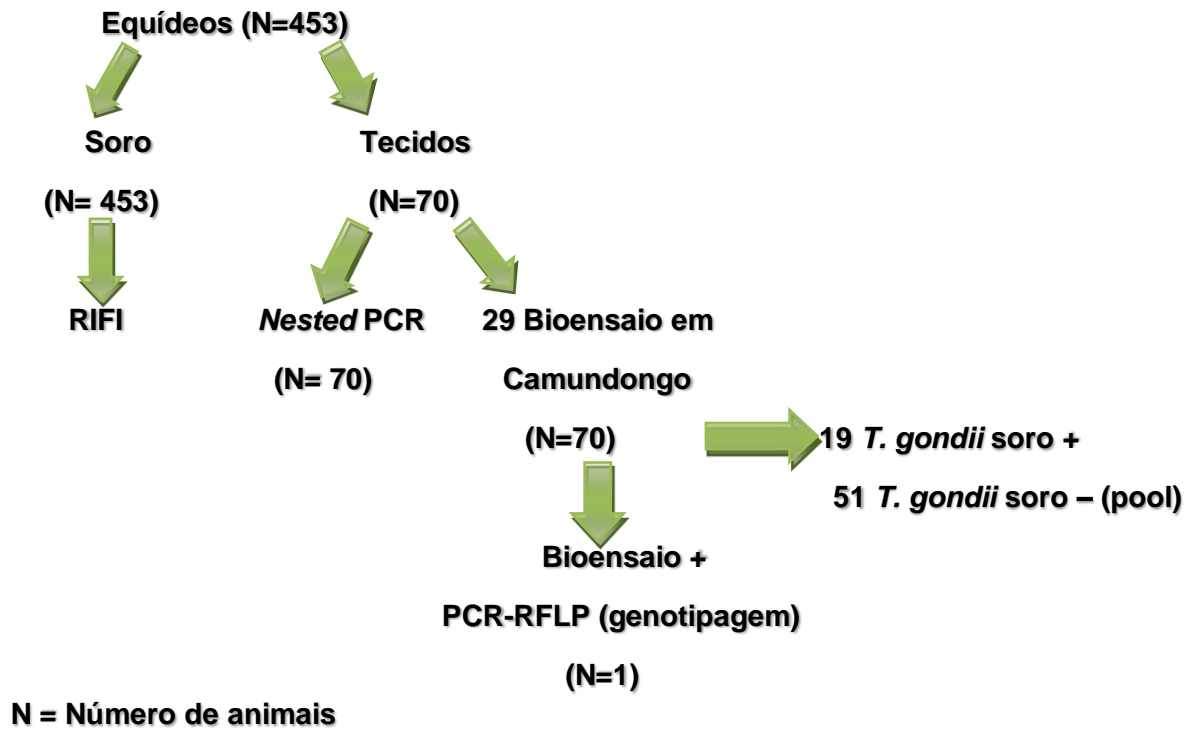
### **3.6 Análise Estatística**

Para testar a presença de associação entre espécie do hospedeiro e a ocorrência de anticorpos contra os parasitos foi realizado o teste do Qui-quadrado. Em relação aos jumentos também foi analisada a associação entre as diferentes localidades amostradas e os valores de ocorrência de *T. gondii* utilizando o mesmo teste. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos.

Os dados coletados foram analisados pelo software IBM SPSS Statistics 19 e o teste de chi quadrado foi realizado para estabelecer diferenças entre ocorrência dos agentes estudados e a espécie animal, com um nível significância  $p < 0,005$ .

### **3.7 Fluxograma do Delineamento**

O fluxograma abaixo ilustra as etapas realizadas no presente estudo.



## 4 RESULTADOS

Os resultados foram divididos em análise sorológica, isolamento de *T. gondii* e análise molecular.

### 4.1 Análise Sorológica

#### 4.1.1 NEOSPORA SPP.

Foram realizadas RIFI para pesquisa de anticorpos anti- *Neospora* spp. em 453 animais, sendo 1,75% (8) deles positivos. Os animais positivos por espécie, local e titulação encontram-se na tabela 1 e gráfico 1.

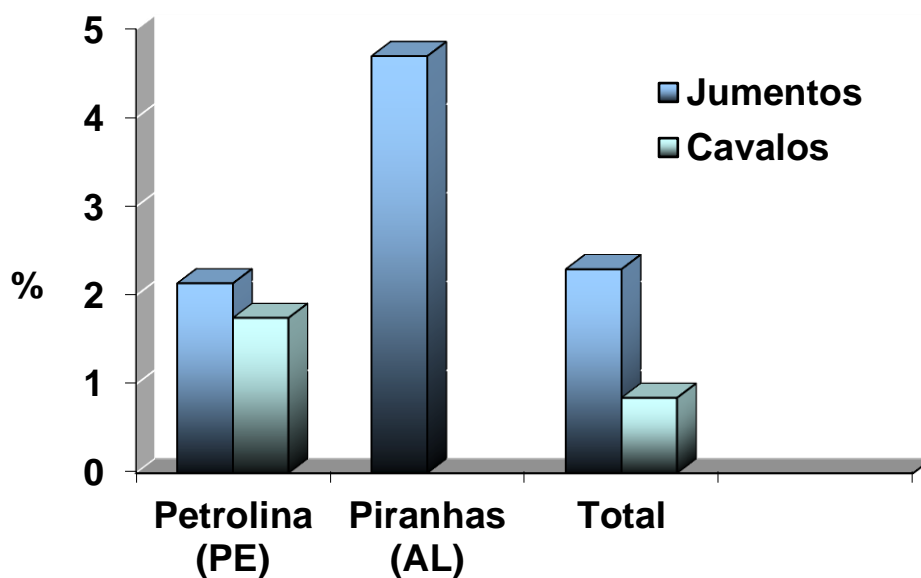
Dos 304 jumentos examinados, sete (2,30%) foram positivos, sendo três de Petrolina, PE e quatro de Piranhas, AL. Dos 118 cavalos somente um (0,85%) animal de Petrolina, PE, apresentou anticorpos anti- *N. caninum*. Nenhuma das 31 mulas examinadas foi positiva a anticorpos contra esse coccídio e nenhum animal foi positivo para *Neospora* spp. nos municípios de Mossoró, Patos, Araguari e Campo Maior. Em três jumentos do município de Petrolina (PE 72, 87, 88) houve positividade para ambos os agentes pesquisados.

A associação entre as espécies de hospedeiros e ocorrência de *N. caninum* não foi possível ser testada devido ao baixo número de positivos.

Tabela 1 - Número de amostras positivas para anticorpos anti- *Neospora* spp. (RIFI  $\geq$  50) segundo local de procedência, título de anticorpos e espécie examinada

ESPÉCIE Município (Estado)	Examinados	Positivos	Ocorrência %	Título	Positivos por título
<b>JUMENTOS</b>					
Petrolina (PE)	140	3	2,14	50	2
				100	1
				400	1
				800	1
Piranhas (AL)	85	4	4,70	50	1
				100	1
				400	1
				800	1
<b>CAVALOS</b>					
Petrolina (PE)	57	1	1,75	50	1

Gráfico 1 - Frequência de amostras positivas por espécie animal para anticorpos anti- *Neospora* spp. segundo município de origem dos animais





#### 4.1.2 *T. GONDII*

Foram realizadas RIFI para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* em 453 animais, sendo 28,47% (129) dos animais positivos.

Dos 304 jumentos examinados, 82 (26,97%) foram soropositivos para anticorpos anti- *T. gondii*. Em relação aos cavalos, 32 (27,11%) dos 118 examinados foram positivos e em relação às mulas, 15 (48,38%) das 31 amostras avaliadas foram positivas. Foi encontrada associação entre a espécie do hospedeiro e a ocorrência de *T. gondii* (Qui-quadrado = 6,478, graus de liberdade = 2, valor de p = 0,039), sendo que as mulas foram mais acometidas que os cavalos e jumentos. A tabela 2 e o gráfico 2 apresentam a ocorrência de anticorpos anti- *T. gondii* por espécie animal e município de origem das amostras.

Em todos os municípios amostrados observou-se a presença de equídeos positivos a anticorpos contra *T. gondii*.

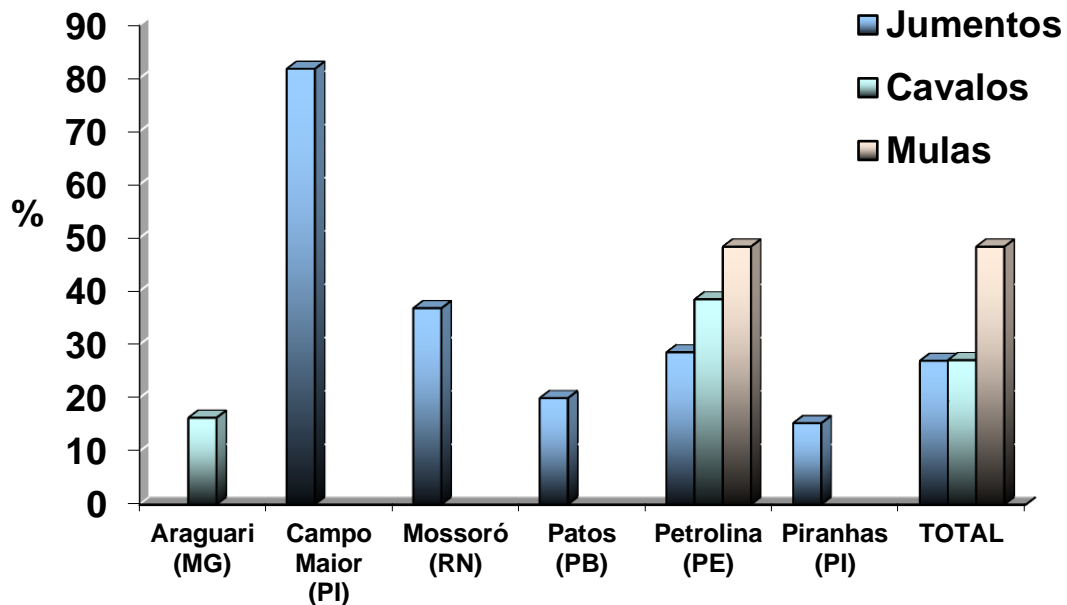
Em relação à ocorrência de anticorpos anti- *T. gondii* nos jumentos, os índices encontrados no Piauí (81,82%) foram superiores aos observados nos outros estados ( $p \leq 0,05$ ) que foram de 15,29% em Alagoas, 20% na Paraíba, 28,57% em Pernambuco e 36,84% no Rio Grande do Norte. Somente o município de Petrolina possuía as três espécies de equídeos e a análise estatística mostra haver associação com a espécie, com ocorrência mais elevada nas mulas ( $p = 0,019$ ).

O resultado da sorologia de todos os animais positivos por sorologia, município, estado e espécie animal tanto para *Neospora* spp. quanto para *T. gondii* encontra-se no Apêndice A.

Tabela 2 - Número de amostras positivas para anticorpos anti- *T. gondi* (RIFI≥64) segundo titulação, local de procedência e espécie examinada

<b>ESPÉCIE</b>	<b>Examinados</b>	<b>Positivos</b>	<b>Ocorrência</b>	<b>Título</b>	<b>Positivos</b>
<b>Município (Estado)</b>			<b>%</b>		<b>por título</b>
<b>JUMENTOS</b>					
Campo Maior (PI)	11	9	81,82	64	9
Mossoró (RN)	38	14	36,84	64	9
				256	5
Patos (PB)	30	6	20,00	64	6
Petrolina (PE)	140	40	28,57	64	30
				256	10
Piranhas (AL)	85	13	15,29	64	6
				256	7
<b>CAVALOS</b>					
Araguari (MG)	61	10	16,30	64	10
Petrolina (PE)	57	22	38,50	64	15
				256	7
<b>MULAS</b>					
Petrolina (PE)	31	15	48,38	64	11
				256	4

Gráfico 2 - Frequência de amostras positivas para anticorpos anti-*T. gondii* segundo município e espécie animal examinada

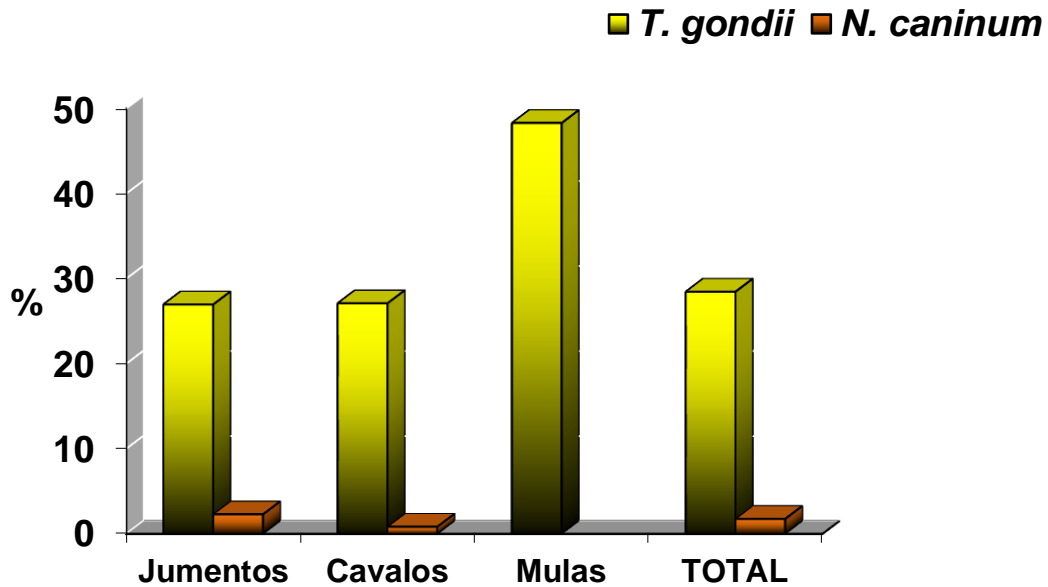


A tabela 3 o gráfico 3 apresentam a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* e anti- *N. caninum* por espécie animal.

Tabela 3- Número de animais examinados e positivos para anticorpos anti- *T. gondii* e anti- *N. caninum* por espécie examinada

Espécie	Examinados	<i>T. gondii</i>		<i>N. caninum</i>	
		Nº Positivos	%	Nº Positivos	%
<b>JUMENTOS</b>	304	82	26,97	7	2,30
<b>CAVALOS</b>	118	32	27,11	1	0,84
<b>MULAS</b>	31	15	48,38	0	0,00
<b>Total</b>	453	129	28,47	8	1,76

Gráfico 3- Frequência de animais positivos para anticorpos anti- *T. gondii* e anti- *Neospora* spp. por espécie



#### 4.2 Isolamento de *T. gondii*

Somente em uma amostra, do jumento de Mossoró (Mo 6), soropositivo a anticorpos anti- *T. gondii* (RIFI= 64), obteve-se isolamento de *T. gondii* pelo bioensaio em camundongos. Amostras teciduais deste animal foram inoculadas em 20 camundongos e desses somente dois, que receberam material da língua, infectaram-se e foram a óbito nos dias 16 e 17 pós-inoculação. Os outros 18 camundongos que não vieram a óbito não apresentaram anticorpos séricos e não se observou o parasita em seus tecidos, indicando que não estavam infectados.

### 4.3 Análise Molecular das Amostras Primárias

Foi realizada a análise molecular de tecidos (amostras primárias) de 70 animais sendo 40 tecidos de cavalos (30 tecidos dos 10 soropositivos e 10 pools de tecidos de 51 soronegativos) e 36 tecidos de nove jumentos soropositivos. Desses animais foram examinadas alíquotas de 500µL de cada amostra, com exceção das amostras do jumento Mo 6 (coração, cérebro, língua e diafragma) que foram examinadas em duplicata, pois mesmo tendo sido isolado *T. gondii* nos camundongos infectados com tecidos desse animal, na *nested*-PCR os tecidos originais foram negativos.

Houve detecção molecular em uma única amostra de cavalo das 40 examinadas e correspondeu ao cavalo Ar 387 abatido no frigorífico de Araguari.

Devido à pequena quantidade de tecido, não foi possível a obtenção de DNA suficiente para realizar o sequenciamento, sem diagnóstico confirmatório desta amostra.

### 4.4 PCR- RFLP

A caracterização genotípica foi realizada em uma amostra isolada em camundongos pelo bioensaio obtida de um jumento de Mossoró, RN.

Por meio da PCR-RFLP, foi possível a caracterização genotípica completa, isto é, a análise dos 12 marcadores, sendo eles SAG1, SAG2, ALT.SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e Cs3.

A genotipagem dessa amostra evidenciou o genótipo #60 TgCkBr220, o qual foi anteriormente descrito por Dubey et al. (2010) em uma galinha de Fernando de Noronha, PE. O resultado da caracterização genotípica do isolado está expresso na Tabela 4.

Tabela 4 - Genótipos multilocus do isolado de jumento do Brasil obtidos pela PCR/RFLP

AMOSTRA	Genótipo pela PCR-RFLP												Espécie	Localização	Referência *
	SAG1	SAG2	ALT. SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	CS3			
Mo6	I	III	III	III	III	III	II	I	III	III	III	III	Jumento ( <i>Equus asinus</i> )	Mossoró-RN	TgCkBr220  Fernando de Noronha - PE

\* Dubey et al. (2010)

## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo 453 jumentos, mulas e cavalos foram examinados e apenas 1,7% desses foram positivos para anticorpos anti- *Neospora* spp. (RIFI  $\geq$ 50).

Não são muitos os estudos de soroprevalência de infecção por *Neospora* spp. em equídeos quando comparados com pesquisas semelhantes feitas em outras espécies de animais domésticos. Mesmo assim a comparação de resultados deve ser feita com atenção devido a diferenças nas amostragens, testes sorológicos, pontos de corte e espécies animais examinadas.

Por espécie animal os resultados do presente estudo indicam uma maior ocorrência nos jumentos (2,3%), seguido pelos equinos (0,85%) e nenhum dos muares examinados foi positivo para *N. caninum*. Esta diferença observada entre as espécies animais não pode ser estatisticamente analisada devido ao baixo número de animais positivos.

Mesmo assim, os valores obtidos estão dentro dos resultados de estudos feitos em diferentes regiões do país, que indicam ocorrência entre 1,6 a 47% para equinos (HOANE et al., 2006; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006; VILLALOBOS et al., 2006, 2012). Fora do país estudos com as espécies estudadas também são poucos e no Alabama, Cheadle et al. (1999) encontraram valores semelhantes aos deste estudo.

Apesar da baixa ocorrência os títulos de anticorpos anti- *N. caninum* variaram de 50 a 800. O único cavalo positivo apresentou título baixo (50), entretanto dentre os jumentos três apresentaram titulação mínima (50) e nos outros três animais títulos de 100, 400 e 800 foram encontrados. Moraveji et al. (2011), no Iran, obtiveram uma soroprevalência de 32% em equinos, com títulos de 80 pelo NAT (*Neospora* Agglutination Test) e Dangoudoubiyam et al. (2011), na Costa Rica, encontraram valores de soroprevalência de 3,5% também em equinos.



Em estudos de pesquisa de anticorpos anti- *Neospora* spp realizados no Brasil (VILLALOBOS et al., 2006) e em outras partes do mundo (DUBEY; PORTFIELD, 1986) os animais tinham histórico de perdas reprodutivas, fato que não é conhecido neste estudo e que pode estar associado à ocorrência deste coccídio.

Conforme demonstrado por Gondim et al. (2009), deve-se suspeitar de um alto percentual de reatividade sorológica cruzada entre *N. caninum* e *N. hughesi*, o que não permite a diferenciação da infecção por estes agentes utilizando-se a RIFI. Dessa forma, embora tenham sido utilizados taquizoítos de *N. caninum* na RIFI, considera-se a ocorrência para o gênero *Neospora* spp. devido à especificidade insuficiente da reação.

Tal qual observado em estudos com outras espécies animais que não os bóvidos, a ocorrência da infecção por *N. caninum* foi baixa, em especial quando comparada a outros coccídios como *T. gondii*, indicando que este parasito deve causar baixo impacto à sanidade dos equídeos.

Em relação a *T. gondii* foram encontrados no total 28,47% de animais positivos, sendo 26,97% dos jumentos, 27,11% dos cavalos e 48,38% das mulas, sendo esta diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) e indicando uma maior ocorrência nos muares.

Num estudo no qual também foi comparada a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em cavalos, jumentos e mulas da região nordeste, do estado da Bahia, utilizando a RIFI ( $\geq 64$ ), os autores encontraram valores de 1,61% e 1,52% para cavalos e jumentos, respectivamente e nenhuma das 22 mulas foram positivas (MENDONÇA et al., 2001). Ainda na região nordeste (Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba e Sergipe) Oliveira et al. (2012) pesquisaram a presença de anticorpos contra *T. gondii* (RIFI  $\geq 64$ ) e encontraram valores estatisticamente superiores nos jumentos (43,2%) quando comparados as mulas (23,8%). Na Espanha, Garcia Bocanegra et al. (2012) observaram 10,8% dos equinos, 15% de muares e 25,6% de jumentos soropositivos a anticorpos contra *T. gondii* utilizando o MAT ( $\geq 25$ ) e esta diferença foi significativa com maior número de jumentos positivos

ao agente. Estas diferenças observadas entre os diferentes estudos com estas espécies de equídeos indicam que estes estão expostos à infecção pelo *T. gondii* e apesar da baixa patogenicidade que este agente parece ter nos equídeos, natural ou experimentalmente infectados (SPOSITO FILHA et al., 1983), vale lembrar que carnes desses animais são consumidas em algumas partes do mundo, podendo funcionar como fonte de infecção de *T. gondii* aos humanos.

Apesar de alguns valores de ocorrência terem sido relativamente altos, seja em mulas como em jumentos, não há na literatura descrição de perdas reprodutivas ou outros sinais clínicos causados pelo *T. gondii* nessas espécies animais, fato que merece maiores estudos.

No presente trabalho amostras de jumentos foram obtidas de cinco Estados da região nordeste e em todos os Estados animais positivos estavam presentes, evidenciando a ampla dispersão do *T. gondii* nessa espécie na região estudada. Todas as mulas do estudo eram provenientes de Petrolina (PE) não dando para avaliar a dispersão de muares positivos na região. Entretanto quando se compara a ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* nos cavalos (38,50%), jumentos (28,57%) e mulas (48,38%) do mesmo município (Petrolina, PE), a ocorrência nos muares também é superior ( $p < 0,005$ ), indicando um maior contato com as fontes de infecção do parasito nos muares. Normalmente os asininos e os muares da região estudada executam as mesmas funções, isto é, principalmente tração, não sendo possível correlacionar essa maior ocorrência nos muares com os hábitos de vida desses animais.

Vários estudos realizados no país encontraram uma ampla variação nos valores de ocorrência, de 2 a 70%, para equinos de variadas regiões e, devido as diferentes técnicas, pontos de corte utilizados e amostragens distintas, comparações devem ser feitas com cautela (ISHIZUKA; MIGUEL. BROGLIATO., 1975; SILVA et al., 1981; LARANJEIRA; ISHIZUJA; HYAKUTAKE, 1985; BRACCINI et al., 1992; GAZÊTA et al., 1997; VIDOTTO et al., 1997; GARCIA et al., 1999; NAVES; FERREIRA; COSTA., 2005; VILLALOBOS et al., 2005).

Neste estudo, equinos só foram amostrados nos estados de Minas Gerais e Pernambuco. O valor de ocorrência de *T. gondii* observado em Petrolina (PE) foi aproximadamente o dobro daquele encontrado em Araguari (MG) e, por serem estes últimos animais de abatedouro e de finalidade zootécnica e procedências exatas desconhecidas, discutir sobre os possíveis fatores que possam ter sido responsáveis por esta maior ocorrência em Petrolina é inviável.

Turner e Savva (1991) afirmaram que *T. gondii* pode causar em equinos encefalomielite caracterizada por hiperirritabilidade, incoordenação motora, distúrbios oculares e abortamento, entretanto parece pouco comum quadros clínicos de toxoplasmose nessas espécies e todos os animais amostrados no presente estudo aparentavam estar saudáveis.

Existem poucos dados a respeito de técnicas de isolamento de *Neospora* spp. e *T. gondii* em animais dessas espécies. Neste estudo não foi possível o isolamento de *Neospora* spp. devido a impossibilidade de obtenção dos tecidos dos animais positivos.

No Egito, Shaapan e Ghazy (2007) isolaram, pelo bioensaio em camundongos e em gatos, *T. gondii* de 79 dos 150 cavalos que teriam seus tecidos utilizados para consumo humano. Al-Khalidi e Dubey (1979) também isolaram *T. gondii* de carne de cavalos americanos que seriam utilizadas para o consumo humano. Outro estudo realizado por Dubey et al. (1999), com equinos do Canadá e Estados Unidos que seriam utilizados para consumo humano, apontou uma ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* de 6,9%.

Na França, três severos casos clínicos de toxoplasmose humana foram relacionados ao consumo de carne equina importada do Canadá ou Brasil (POMARES et al., 2011). Um desses três pacientes morreu com um quadro severo de toxoplasmose. Outra paciente estava grávida quando houve a infecção e a criança nasceu com toxoplasmose congênita. A terceira paciente também era uma gestante e o término da gestação foi recomendado por exames que observaram o feto com sérios problemas. Este apresentava graves alterações no cérebro, fígado e

coração devido à presença de *T. gondii* e a gestante permaneceu sob tratamento contra o parasito por três anos. Todos os três pacientes tinham por hábito a ingestão de carne de equídeos e a análise molecular dos isolados mostrou que todos eram genótipos atípicos, nunca descritos na França ou Europa. Pesquisando o local de compra das carnes equinas observaram que o primeiro paciente, que foi a óbito, ingeriu carne de equino procedente do Canadá e a segunda paciente do Brasil. A procedência da carne ingerida pela terceira paciente não foi determinada.

Estes estudos mostram que a toxoplasmose nessa espécie também pode ser um grave problema de saúde pública, em especial nos países que tem por hábito o consumo de carne desses animais.

Dos bioensaios em camundongos realizados no presente estudo para o isolamento de *T. gondii*, dos 19 animais soropositivos examinados (nove jumentos e 10 cavalos) e do pool de 51 cavalos soronegativos, somente um isolado foi obtido de um jumento do município de Mossoró, RN, que apresentou título de 64 na RIFI. Dois dos cinco camundongos inoculados com tecidos de língua desse jumento tornaram-se positivos a anticorpos anti- *T. gondii* e ambos vieram a óbito, nos dias 16 e 17 pós-inoculação. Este é o primeiro isolado de *T. gondii* obtido a partir de jumentos.

A PCR-RFLP utilizando 12 marcadores indicou que o isolado obtido já havia sido anteriormente descrito por Dubey et al. (2010) no arquipélago de Fernando de Noronha, PE, também região nordeste do Brasil, em uma galinha (#60 TgCkBr220). No bioensaio realizado com a amostra obtida em Fernando de Noronha, todos os três camundongos inoculados se infectaram, entretanto nenhum deles foi a óbito. No presente estudo o mesmo isolado mostrou-se patogênico para camundongos. Vinte camundongos foram inoculados com quatro diferentes tecidos (5-cérebro, 5-diafragma, 5-língua e 5-coração) desse jumento e somente dois se infectaram e vieram a óbito, ambos haviam recebido o mesmo tecido, língua. A baixa infecção observada nos camundongos, associada ao não encontro do DNA de *T. gondii* nos tecidos dos animais pela *nested*-PCR indicam que provavelmente a quantidade de cistos teciduais, quando presente, deve ser baixa.

É difícil inferir sobre patogenicidade de isolados baseado em mortalidade de camundongos usados em bioensaios uma vez que a dose e o estágio do parasito no inóculo é sempre desconhecida. A genotipagem do *locus* CS3 desse isolado revelou o alelo Tipo III, que no caso indicaria não virulência (KHAN et al., 2005; DUBEY et al., 2007; PENA et al., 2008; DUBEY et al., 2010; da SILVA et al., 2011), entretanto neste estudo, apesar do Tipo III estar presente nesse *locus*, houve mortalidade de dois camundongos. Vale lembrar que somente dois dos 20 camundongos inoculados infectaram-se, representando uma baixa taxa de infecção, mas alta letalidade, 100% dos infectados.

Apesar do uso de diferentes formas de analisar a patogenicidade dos isolados, isto é, por mortalidade de camundongos ou marcadores moleculares, a correlação com as manifestações clínicas da doença ainda não são claras e nenhuma metodologia se mostrou totalmente eficiente (FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011).

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir:

- Anticorpos anti-*Neospora* spp estão presentes em jumentos e cavalos de diferentes regiões do Brasil.
- Anticorpos anti- *Toxoplasma gondii* estão presentes em jumentos, mulas e cavalos de diferentes regiões do Brasil.
- Os mueres examinados apresentaram maior ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* quando comparados aos equinos e asininos.
- *Toxoplasma gondii* foi pela primeira vez isolada de um jumento, de Mossoró, RN, e apresentou similaridade a um isolado obtido no Arquipélago de Fernando de Noronha, PE, de uma galinha.

## REFERÊNCIAS

- AL-KHALID, N. W.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infections in horses. **Journal of Parasitology**, v. 65, n. 2, p. 331-334, 1979.
- ALVARADO-ESQUIVEL, C.; RODRÍGUEZ-PEÑA, S.; VILLENA, I.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic horses in Durango state, Mexico. **Journal of Parasitology**, v. 98, n. 5, p. 944-945, 2012.
- ANDERSON, M. L.; BLANCHARD, P. C.; BARR, B. C.; DUBEY, J. P.; HOFFMAN, R. L.; CONRAD, P. A. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 198, n. 2, p. 241–244, 1991.
- AUSUBEL, F.; BRENT, F.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Ed.). Short protocols in molecular biology. 4<sup>th</sup> ed. New York: Wiley, 1999. Sections 2-3 – 2-7.
- AZEVEDO, S. S.; PENA, H. F. J.; ALVES, J. A.; GUIMARÃES FILHO, A. A. M.; OLIVEIRA, R. M.; MAKSIMOV, P.; SCHARES, G.; GENNARI, S. M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in swine from Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 1-5, 2010.
- BARBER, J. S.; HOLMDAHL, O. J. M.; OWEN, M. R.; GUY, F.; UGGLA, A.; TREES, A. J. Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 111, n. 5, p. 563-568, 1995.
- BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; BREITMEYER, R.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M. L.; REYNOLDS, J.; CHAUVET, A. E.; DUBEY, J. P.; ARDANS, A. A. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992). **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 202, n. 1, p. 113-117, 1993.
- BASSO, W.; HERRMANN, D. C.; CONRATHS, F. J.; PANTCHEV, N.; GLOBOKAR VRHOVEC, M.; SCHARES, G. First isolation of *Neospora caninum* from the faeces of a dog from Portugal. **Veterinary Parasitology**, v. 159, n. 2, p. 162-166, 2009.
- BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M. C. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 4, p. 906-907, 2001.

- BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Undetected cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift fuer Parasitenkunde**, v. 70, n. 2, p. 271-274, 1984.
- BJÖRKMANN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p.1497-1507, 1999.
- BOUGHATTAS, S.; BERGAOUI, R.; ESSID, R.; AOUN, K.; BOURATBINE, A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among horses in Tunisia. **Parasitology & Vectors**, v. 4, p. 218, 2011.
- BRACCINI, G. L.; CHAPLIN, E. L.; STOBBE, N. S.; ARAUJO, F. A. P.; SANTOS, N. R. Resultados de exames laboratoriais realizados no setor de protozoologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, nos anos 1986 a 1990. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Brasil)**, v. 20, p. 134-149, 1992.
- BRESCIANI, K. D. S.; GENNARI, S. M.; SERRANO, A. C. M.; RODRIGUES, A. A. R.; UENO, T.; FRANCO, L. G.; PERRI, S. H. V.; AMARANTE, A. F. T. Antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Brazil. **Parasitology Research**, v. 100, n. 2, p. 281-285, 2007.
- BUXTON, D.; MALEY, S. W.; PASTORET, P. P.; BROCHIER, B.; INNES, E. A. Examination of red fox (*Vulpes vulpes*) from Belgium for antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Record**, v.14, n. 12, p. 308-309, 1997.
- CAMARGO, M.E. Improved technique of Indirect Immunofluorescent for serologic diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 6, n. 3, p.117-118, 1964.
- CHEADLE, M. A.; LINDSAY, D. S.; ROWE, S.; DYKSTRA, C. C.; WILLIAMS, M. A.; SPENCER, J. A.; TOIVIO-KINNUKAN, M. A.; LENZ, S. D.; NEWTON, J. C.; ROLSMA, M. D.; BLAGBURN, B. L. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horses from Alabama and characterization of an isolate recovered from a naturally infected horse. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p.1537-1543, 1999.
- CHESSUM, B. S. Reactivation of *Toxoplasma* oocysts production in the cat by infection with *Isospora felis*. **British Veterinary Journal**, v. 128, n. 7, p. xxxiii-xxxvi, 1972.
- COSTA, K. S.; SANTOS, S. L.; UZÊDA, R. S.; PINHEIRO, A. M.; ALMEIDA, M. A. O.; ARAÚJO, F. R.; MCALLISTER, M. M.; GONDIM, L. F. P. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 2, p.157-159, 2008.



CUDDON, P.; LIN, D. S.; BOWMAN, D. D.; LINDSAY, D. S.; MILLER, T. K.; DUNCAN, I. D.; DE LAHUNTA, A.; CUMMINGS, J.; SUTER, M.; COOPER, B.; KING, J. M.; DUBEY, J. P. *Neospora caninum* infection in English Springer Spaniel littermates: diagnostic evaluation and organism isolation. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 6, n. 6, p. 325–332, 1992.

CZOPOWICZ, M.; KABA, J.; SZALUS-JORDANOW, O.; NOWICKI, M.; WITKOWSKI, L.; FRYMUS, T. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in goats in Poland. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 3-4, p. 339-341, 2011.

DAFT, B. M.; BARR, B. C.; COLLINS, N.; SVERLOW, K. *Neospora* encephalomyelitis and polyradiculoneuritis in an aged mare with Cushing's disease. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, n. 3, p. 240-243, 1997.

DAMRIYASA, I. M.; BAUER, C.; EDELHOFER, R.; FAILING, K.; LIND, P.; PETERSEN, E.; SCHARES, G.; TENTER, A. M.; VOLMER, R.; ZAHNER, H. 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**, v. 126, n. 3, p. 271-286, 2004.

DANGOUDOUBIYAM, S.; OLIVEIRA, J. B.; VÍQUEZ, C.; GÓMEZ-GARCÍA, A.; GONZÁLEZ, O.; ROMERO, J. J.; KWOK, O. C. H.; DUBEY, J. P.; HOWE, D. K. Detection of antibodies against *Sarcocystis neurona*, *Neospora* spp., and *Toxoplasma gondii* in horses from Costa Rica. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 3, p. 522-524, 2011.

DA SILVA, R. C.; LANGONI, H.; SU, C.; DA SILVA, A. V. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: new atypical genotypes and the clonal type II strain identified. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1-2, p. 173-177, 2011.

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H. W.; EYSKER, M.; HESSELINK, J. W.; WOUDA, W. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 105, n. 2, p. 99-104, 2002.

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

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

DUBEY, J. P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, v. 74, n. 1, p. 75-77, 1998.

DUBEY, J. P. Reshedding of *Toxoplasma gondii* by chronically infected cats. **Nature**, v. 262, n. 5565, p. 213-214, 1976.

- DUBEY, J. P., HATTEL, A. L.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 10, p. 1259-1263, 1988a.
- DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton: CRC Press, 1988. 220 p.
- DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary and Medical Association**, v. 192, n. 9, p. 1269–1285, 1988b.
- DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **Journal of Protozoology**, v. 19, n. 1, p. 155-177, 1972.
- DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. **Journal of Protozoology**, v. 23, n. 4, p. 537-546, 1976.
- DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Immunity to feline toxoplasmosis: modification by administration of corticosteroids. **Veterinary Pathology**, v. 11, n. 4, p. 350-379, 1974.
- DUBEY, J. P.; HOOVER E. A.; WALLS, K. W. Effect of age and sex on the acquisition of immunity to toxoplasmosis in cats. **Journal of Protozoology**, v. 24, n. 1, p. 184-186, 1977.
- DUBEY, J. P.; JENKIS, M. C.; RAJENDRAN, C.; MISKA, K.; FERREIRA, L. R.; MARTINS, J.; KWOK, O. C. H.; CHOUDHARY, S. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 2-4, p. 382-387, 2011.
- DUBEY, J. P.; KERBER, C. E.; GRANSTROM, D. E. Serologic prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in horses in Brazil. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 215, n. 7, p. 970-972, 1999.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 9, n. 12, p. 452-458, 1993.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; ADAMS, D. S.; GAY, J.; BASZLER, T. V.; BLAGBURN, B. L.; THULLIEZ, P. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. **American Journal Veterinary Research**, v. 57, n. 3, p. 329-326, 1996.
- DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K. Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 56, n. 3, p. 447-456, 1970a.

DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat faeces. **Journal of Experimental Medicine** v. 132, n. 4, p. 636-662, 1970b.

DUBEY, J. P.; PORTFIELD, M. L. *Toxoplasma* like-sporozoa in an aborted equine fetus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 11, n. 1, p. 1312-1313, 1986.

DUBEY, J. P.; RAJENDRAN, C.; COSTA, D. G. C.; FERREIRA, L. R.; KWOK, O. C. H.; QU, D.; SU, C.; MARVULO, M. F. V.; ALVES, L. C.; MOTA, R. A.; SILVA, J. C. R. New *Toxoplasma gondii* Genotyped Isolated from free-range-chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: Unexpected Findings. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 4, p. 709-712, 2010.

DUBEY, J. P.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K.; GAMBLE, H. R. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horses in North America. **Journal of Parasitology**, v. 85, n. 5, p. 968-969, 1999.

DUBEY, J. P.; SUNDAR, N.; GENNARI, S. M.; MINERVINO, A. H. H.; FARIAS, N. A. R.; RUAS, J. L.; DOS SANTOS, T. R. B.; CAVALCANTE, G. T.; KWOK, O. C. H.; SU, V. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 182-188, 2007.

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

DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERSKAS, I.; BJORKMAN, C.; HARTLEY, W. J.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. Fatal congenital *Neospora caninum* infection in a lamb. **Journal of Parasitology**, v. 76, n. 1, p. 127-30, 1990.

EIRAS, C.; ARNAIZ, I.; ALVAREZ-GARCIA, G.; ORTEGA-MORA, L. M.; SANJUÁN, M. L.; YUS, E.; DIÉGUES, F. J. *Neospora caninum* seroprevalence in dairy and beef cattle from the northwest region of Spain, Galicia. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 98, n. 2-3, p. 128-132, 2011.

FAZAELI, A.; CARTER, P. E.; PENNINGTON, T. H. Intergenic spacer (IGS) polymorphism: a new genetic marker for differentiation of *Toxoplasma gondii* strains and *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, v. 86, n. 4, p. 716-723, 2000.

FERROGLIO, E.; GUISO, M.; PASINO, M.; ACOSSATO, A.; TRISCIUOGLIO, A. Antibodies to *Neospora caninum* in stray cats from north Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 131, n. 1-2, p. 31-34, 2005.

FIGLIUOLO, L. P. C.; KASAI, N.; RAGOZO, A. M. A.; DE PAULA, V. S. O.; DIAS, R. A.; SOUZA, S. L. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of anti- *Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 123, n. 3-4, p. 161-166, 2004.

FINNO, C. J.; EATON, J. S.; ALEMAN, M.; HOLLINGSWORTH, S. R. Equine protozoal myeloencephalitis due to *Neospora hughesi* and equine motor neuron disease in a mule. **Veterinary Ophthalmology**, v. 13, n. 4, p. 259-265, 2010.

FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; SUNDAR, N.; DUBEY, J. P.; GRIGG, M. E.; DE OLIVEIRA, F. C. R. Multi-locus DNA sequencing of *Toxoplasma gondii* isolated from Brazilian pigs identifies genetically divergent strains. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1-2, p. 33-39, 2011.

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, v. 167, n. 3919, p. 893-896, 1970.

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

GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; OGAWA, L.; DE OLIVEIRA, R. L. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em suínos, bovinos, ovinos e equinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 29, n. 1, p. 91-97, 1999.

GARCIA-BOCANEGRA, I.; CABEZÓN, O.; ARENAS-MONTES, A.; CARBONERO, A.; DUBEY, J. P.; PEREA, A.; ALMERÍA, S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in equids from Southern Spain. **International Parasitology**, v. 61, n. 3, p. 421-424, 2012.

GAZÊTA, G. S.; DUTRA, A. E. A.; NORBERG, A. N.; SERRA-FEIRE, N. M.; SOUZA, W. J. S.; AMORIM, M.; LOPES, L. M. S. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em soros de equinos do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de parasitologia Veterinária**, v. 6, n. 1. p. 97-99, 1997.

GENNARI, S. M.; Rodrigues, A. A. R.; VIANNA, R. B.; CARDOSO, E. C. Occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the northern region of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 134, n. 1-2, p. 169-171, 2005.

- GONDIM, L. F. P.; LINDSAY, D. S.; MCALLISTER, M. M. Canine and bovine *Neospora caninum* control sera examined for cross-reactivity using *Neospora caninum* and *Neospora hughesi* Indirect Fluorescent Antibody tests. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 86-88, 2009.
- GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 159-161, 2004.
- GONDIM, L. F. P.; PINHEIRO, A. M.; SANTOS, P. O.; JESUS, E. E.; RIBEIRO, M. B.; FERNANDES, H. S.; ALMEIDA, M. A.; FREIRE, S. M.; MEYER, R.; MCALLISTER, M. M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**, v. 101, n. 1, p. 1–7, 2001.
- GRAY, M. L.; HARMON, B. G.; SALES, L.; DUBEY, J. P. Visceral neosporosis in a 10-year-old horse. **Journal of Veterinary Diagnosis Investigation**, v. 8, n. 1, p. 130-133, 1996.
- GRIGG, M. E.; GANATRA, J.; BOOTHROYD, J. C.; MARGOLIS, T. P. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 5, p. 633-639, 2001.
- HÄSSIG, M.; SAGER, H.; REITT, K.; ZIEGLER, D.; STRABEL, D.; GTTSTEIN, B. *Neospora caninum* in sheep: a herd case report. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 3, p. 213–220, 2003.
- HELMICK, B.; OTTER, A.; MCGARRY, J.; BUXTON, D. Serological investigation of aborted sheep and pigs for infection by *Neospora caninum*. **Research Veterinary Science**, v. 73, n. 2, p. 187-189, 2002.
- HILALI, M.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; KWOK, O. C.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from camels from Egypt. **Veterinary Parasitology**, v. 75, n. 2-3, p. 269-271, 1998.
- HOANE, J. S.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; RIBEIRO, M. G.; BORGES, A. S.; YAI, L. E. O.; AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; BONESI, G. L.; HOWE, D. K. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora* spp. infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 2, p. 155-159, 2006.
- HOWE, D.K.; HONORÉ, S.; DEROUIN, F.; SIBLEY, L. D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1411–1414, 1997.

IBGE. PPM 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>, 2009>. Acesso em: 06 de janeiro de 2012.

ISHIZUKA, M. M.; MIGUEL, O.; BROGLIATO, D. F. Avaliação da prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em equinos PSI clinicamente normais. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 12, n. 7, p. 288-292, 1975.

KHAN, A.; TAYLOR, S.; SU, C.; MACKEY, A. J.; BOYLE, J.; COLE, R.; GLOVER, D.; TANG, K.; PAULSEN, I. T.; BERRIMAN, M.; BOOTHROYD, J. C.; PFEFFERKORN, E. R.; DUBEY, J. P.; AJIOKA, J. W.; ROSS, D. S.; WOOTTON, J. C.; SIBLEY, L. D. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 9, p. 2980-2992, 2005.

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

LARANGEIRA, N. L.; ISHIZUKA, M. M.; HYAKUTAKE, S. Prevalência da toxoplasmose equina avaliada pela técnica da imunofluorescência indireta, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Boletim de la Oficina sanitária Panamericana**, v. 99, n. 2, p. 158-162, 1985.

LEHMANN, T.; MARCET, P. L.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E. R.; DUBEY, J. P. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 30, p. 11423–11428, 2006.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; DUBEY, J. P. Feline toxoplasmosis and the importance of the *Toxoplasma gondii* oocyst. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 19, n. 4, p. 448-461, 1997.

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

LINDSAY, D. S.; STEINBERG, H.; DUBIELZIG, R. R.; SEMRAD, S. D.; KONKLE, D. M.; MILLER, P. E.; BLAGBURG, B. L. Central nervous system neosporosis in a foal. **Journal of Veterinary Diagnosis Investigation**, v. 8, n. 4, p. 507-510, 1996.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; DITTRICH, J. R.; RICHARTZ, R. R. T. B.; GASINO JOINEAU, M. E.; JOINEAU, J.; ANTUNES, R. D.; PINCKNEY.; DECONTO, I.; HOFFMANN, D. C. S.; THOMAZ-SOCCOL, V. Investigation of *Neospora* sp. and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Parana State, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 3-4, p. 215–221, 2006.

MACRUZ, R.; LENCI, O.; ISHIZUKA, M. M.; MIGUEL, O. Toxoplasmose em equinos PSI: estudo sorológico. **Revista da faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 12, n. 7, p. 277-287, 1975.

MAPA. Equinos. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>, 2010>. Acesso em: 20 de março de 2012.

MARQUES, F. A. C.; HEADLY, A. S.; PEREIRA, V. F.; TARODA, A.; BARROS, L. D.; CUNHA, I. A. L.; MUNHOZ, K.; BUGNI, F. M.; ZULPO, D. L.; IGARASHI, M.; VIDOTTO, O.; JUNIOPR, J. S. G.; GARCIA, J. L. *Neospora caninum*: evaluation of vertical transmission in slaughtered beef cows (*Bos indicus*). **Parasitology Research**, v. 108, n. 4, p. 1015-1019, 2011.

MARSH, A. E.; BARR, B. C.; MADIGAN, J.; LAKRITZ, J.; NORDHAUSEN, R.; CONRAD, P. A. Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of the American Medical Association**, v. 209, n. 11, p. 1907-1913, 1996.

MARSH, A. E.; BARR, B.C.; PACKHAM, A. E.; CONRAD, P. A. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **Journal of Parasitology**, v. 84, n. 5, p. 983-991, 1998.

MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; MCGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1473-1479, 1998.

MENDONÇA, A. O.; CERQUEIRA, E. J. L.; ARAÚJO, W. N.; MORAES-SILVA, E.; SHIMABUKURO, F. H.; SARKIS, D. T.; SHERLOCH, I.; LANGONI, H. Inquérito sorológico para toxoplasmose em equídeos procedentes de duas regiões do estado da Bahia, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 115-118, 2001.

MORAVEJI, M.; HOSSEINI, M. H.; AMRABADI, O.; RAHIMIAN, A.; NAMAZI, F.; NAMAVARI, M. Seroprevalence of *Neospora* spp. in horses in South of Iran. **Tropical Biomedicine**, v. 28, n. 3, p. 514-517, 2011.

NAGULESWARAN, A.; HEMPHILL, A.; RAJAPAKSE, R. P. V. J.; SAGER, H. Elaboration of a crude antigen ELISA for serodiagnosis of caprine neosporosis: validation of the test by detection of *Neospora caninum*-specific antibodies in goats from Sri Lanka. **Veterinary Parasitology**, v.126, n. 3, p. 257-262, 2004.

NAVES, C. S.; FERREIRA, F. S. R.; COSTA, G. H. N. Soroprevalência da toxoplasmose em equinos da raça Mangalarga Marchador no município de Uberlândia, Minas Gerais. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 11, p. 45-52, 2005.

NICOLLE, M. M. C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academie des Sciences**, Paris, v. 148, p. 369-372, 1909.



NICOLLE, M. M. C.; MANCEAUX, L. Sur une infectivo à corps de Leishmann (ou organisms voisins) du gondi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academie des Sciences**, Paris, v. 147, p. 763-766, 1908.

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**, Columbia, v. 7, n. 2, p. 273-275, 1995.

PENA, H. F. J.; SOARES, R. M.; RAGOZO, A. M. A.; MONTEIRO, R. M.; YAI, L. E. O.; NISHI, S. M.; GENNARI, S. M. Isolation and molecular detection of *Neospora caninum* from naturally infected sheep from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 1-2, p. 61-66, 2007.

PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 5, p. 561-569, 2008.

PETERS, M.; WAGNER, F.; SCHARES, G. Canine neosporosis: clinical and pathological findings and first isolation of *Neospora caninum* in Germany. **Parasitology Research**, v. 86, n. 1, p.1-7, 2000.

POMARES, C.; AJZEMBERG, D.; BORNARD, L.; BERNARDIN, G.; HASSEINE, L.; DARDÉ, M. L.; MARTY, P. Toxoplasmosis and horse meat, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 7, p. 1327-1328, 2011.

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

ROMANELLI, P. R.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O.; MARANA, E. R. M.; OGAWA, L.; DEPAULA, V. S. O.; GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. **Research Veterinary Science**, v. 82, n. 2, p. 202–207, 2007.

ROSSI, G. F.; CABRAL, D. D.; RIBEIRO, D. P.; PAJUABA, A. C. A. M.; CORRÊA, R. R.; MOREIRA, R. Q.; MINEO, T. W. P.; MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O. Evaluation of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Uberlândia, Minas Gerais State, Brazil, by different serological methods. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 3-4, p. 252-259, 2011.

SADREBAZZAZ, A.; HADDADZADEH, H.; SHAYAN, P. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in camels (*Camelus dromedarius*) in Mashhad, Iran. **Parasitology Research**, v. 98, n. 6, p. 600–601, 2006.

SHAAPAN, R. M.; GHAZY, A. A. Isolation of *Toxoplasma gondii* from Horse Meat in Egypt. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 1, p. 174-177, 2007.



SILVA, N. R. S.; CHAPLIN, E. L.; ARAÚJO, F. A. P.; PEREIRA, R. A. P. Prevalência de anticorpos toxoplásmicos em soros de equinos no município de Porto Alegre, RS. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 9, p. 105-107, 1981.

SLAPETA, J. P.; KOPUDELA, B.; VOTYPKA, J.; MODRY, D.; HOREJS, R.; LUKES, J. Coprodiagnosis of *Hammondia heydorni* in dogs by PCR based amplification of ITS-1 rRNA: differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*. **Veterinary Journal**, v. 163, n. 2, p. 147-154, 2002.

SOARES, R. M.; LOPES, E. G.; KEID, L. B.; SERCUNDES, M. K.; MARTINS, J.; RICHTZENHAIN, L. J. Identification of *Hammondia heydorni* oocysts by hemingnested-PCR (Hn PCR-AP 10) based on the *Hammondia heydorni* RAPD fragment AP 10. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1-2, p. 168-172, 2011.

SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita de'conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malatti che ricorda in molti punti il kala-azar dell'umo. Nota preliminaire pel. **Revista da Sociedade Scientifica**, São Paulo, v. 3, p. 109-112, 1908.

SPOSITO FILHA, E.; AMARAL, V.; MACRUZ, R.; REBOUÇAS, M. M.; SANTOS, S. M.; BORGIO, F. Infecção Experimental de Equinos com Taquizoítos de *Toxoplasma gondii*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 1, n. 1, p. 51-54, 1992.

STIEVE, E.; BECKMEN, K.; KANIA, S.; WIDNER, A.; PATTON, S. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibody prevalence in Alaska wildlife. **Journal of Wildlife diseases**, v. 46, n. 2, p. 348-355, 2010.

SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 7, p. 841-848, 2006.

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

TIEMANN, J. C. H.; SOUZA, S. L. P.; RODRIGUES, A. A. R.; DUARTE, J. M. B.; GENNARI, S. M. Environmental effect on the occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in pampas-deer (*Ozotoceros bezoarticus*). **Veterinary Parasitology**, v. 134, n. 1-2, p. 73-76, 2005.

TORRES, A. P.; JARDIM, W. R. Criação do cavalo e de outros equídeos. 3. ed. São Paulo: Nobel, 1985. p. 431-479.

TURNER, C. B.; SAVVA, D. Detection of *Toxoplasma gondii* in equine eyes. **Veterinary Record**, v. 129, n. 6, p. 128, 1991.

- VIANNA, M. C. B.; SREEKUMAR, C.; MISKA, K. B.; HILL, D. E.; DUBEY, J. P. Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 3-4, p. 253-257, 2005.
- VIDOTTO, O.; KANO, F. S.; FREIRE, R. L.; MITSUKA, R.; OGAWA, L.; BANESI, G.; NAVARRO, I. T.; FRANCISCON, F. S. G. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em eqüinos procedentes de quatro estados (SP, PR, MS e MT) abatidos em Apucarana, PR. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 18, n. 1, p. 9-13, 1997.
- VILLALOBOS, E. M. C.; FURMAN, K. E.; LARA, M. C. C. S. H.; CUNHA, E. M. S.; FINGER, M. A.; BUSCH, A. P. B.; BARROS FILHO, I. R.; DECONTO, I.; DORNBUSCH, P. T.; BIONDO, A. W. Detection of *Neospora* spp. Antibodies in cart horses from urban areas of Curitiba, Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 68-70, 2012.
- VILLALOBOS, E. M. C.; LARA, M. C. C. S. H. L.; CUNHA, E. M. S.; SOARES, R. M. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em soro de equídeos oriundos de propriedades da região do vale do Ribeira, Estado de São Paulo e abatidos em matadouro no Estado do Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 24, 2005.
- VILLALOBOS, E. M. C.; UENO, T. E. H.; DE SOUZA, S. L. P.; CUNHA, E. M. S.; LARA, M. C. C. S. H.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M. Association between the presence of serum antibodies against *Neospora* spp. and fetal loss in equines. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3-4, p. 372-375, 2006.
- VOGEL, F. S. F.; ARENHAR, S.; BAUERMAN, F. V. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e Bubalinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1948-1951, 2006.
- WALSH, C. P.; DUNCAN, R. H.; ZAJAC, A. M.; BLAGBURN, B. L.; LINDSAY, D. S. *Neospora hughesi*: experimental infections in mice, gerbils and dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 92, n. 2, p. 119-128, 2000.
- WOBESER, B. K.; GODSON, D. L.; REJKMANEK, D.; DOWLING, P. Equine protozoal myeloencephalitis caused by *Neospora hughesi* in an adult horse in Saskatchewan. **Canadian Veterinary Journal**, v. 50, n. 8, p. 851-853, 2009.
- XIA, H. Y.; ZHOU, D. H.; JIA, K.; ZENG, X. B.; ZHANG, D. W.; SHE, L. X.; LIN, R. Q.; YUAN, Z. G.; LI, S. J.; ZHU, X. Q. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cattle of Southern China. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 172-173, 2011.

YAI, L. E. O.; CAÑÓN-FRANCO, W. A.; GERALDI, V. C.; SUMMA, M. E.; CAMARGO, M. C.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) from the city of São Paulo, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 4, p. 870-871, 2003.

YAI, L. E. O.; RAGOZO, A. M. A.; CAÑÓN-FRANCO, W. A.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo State, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 3, p. 766, 2008.

## APÊNDICES

### Apêndice A- Sorologia para *Neospora* spp. e *Toxoplasma gondii* dos animais por espécie, estado e município

ESPÉCIE	ESTADO	MUNICÍPIO	Nº USP	<i>T. gondii</i>	<i>Neospora. spp.</i>		
<b>JUMENTOS</b>	Rio Grande do Norte	Mossoró	Mo 2	64	N		
			Mo 3	64	N		
			Mo 4	256	N		
			Mo 5	64	N		
			Mo 6	64	N		
			Mo 7	64	N		
			Mo 9	256	N		
			Mo 10	64	N		
			Paraíba	Patos	Pa 27	64	N
					Pa 31	64	N
Pa 30	64	N					
Pa 31	64	N					
Pa 37	64	N					
Pa 41	64	N					
Rio Grande do Norte	Mossoró	Mo 44	64	N			
		Mo 45	256	N			
		Mo 46	64	N			
		Mo 49	64	N			
		Mo 50	256	N			
		Mo 61	256	N			

---

Pernambuco	Petrolina			
		Pe 67	64	N
		Pe 69	64	N
		Pe 71	64	N
		Pe 72	64	50
		Pe 77	64	N
		Pe 78	64	N
		Pe 80	64	N
		Pe 81	256	N
		Pe 83	64	N
		Pe 84	64	N
		Pe 85	64	N
		Pe 86	256	N
		Pe 87	64	50
		Pe 88	64	100
		Pe 89	64	N
		Pe 90	64	N
		Pe 91	256	N
		Pe 92	64	N
		Pe 93	256	N
		Pe 94	256	N
		Pe 95	256	N
		Pe 96	64	N
		Pe 97	64	N
		Pe 98	64	N
		Pe 99	64	N
		Pe 100	64	N
		Pe 101	64	N

Pe 104	64	N
Pe 105	256	N
Pe 106	256	N
Pe 107	64	N
Pe 108	256	N
Pe 109	256	N
Pe 110	64	N
Pe 111	64	N
Pe 112	64	N
Pe 113	64	N
Pe 114	64	N
Pe 115	64	N
Pe 116	64	N

---

Alagoas	Piranhas	Pir 205	256	N
		Pir 206	64	N
		Pir 207	N	50
		Pir 208	N	100
		Pir 233	N	400
		Pir 240	256	N
		Pir 241	N	800
		Pir 245	64	N
		Pir 251	256	N
		Pir 257	64	N
		Pir 259	64	N
		Pir 276	64	N
		Pir 294	256	N

			Pir 295	256	N
			Pir 296	256	N
			Pir 297	64	N
			Pir 298	256	N
<hr/>					
	Piauí	Campo Maior	Cm 441	64	N
			Cm 443	64	N
			Cm 444	64	N
			Cm 445	64	N
			Cm 446	64	N
			Cm 447	64	N
			Cm 448	64	N
			Cm 449	64	N
			Cm 450	64	N
<hr/>					
<b>EQUINOS</b>	Pernambuco	Petrolina	Pe 118	64	N
			Pe 119	64	N
			Pe 120	256	N
			Pe 121	256	N
			Pe 122	64	N
			Pe 123	64	N
			Pe 124	256	N
			Pe 125	256	N
			Pe 129	64	N
			Pe 130	64	N
			Pe 131	N	50
			Pe 136	256	N
			Pe 138	64	N

	Pe 139	64	N
	Pe 140	256	N
	Pe 146	64	N
	Pe 147	64	N
	Pe 150	256	N
	Pe 151	64	N
	Pe 152	64	N
	Pe 153	64	N
	Pe 154	64	N
	Pe- 155	64	N
	Ar 379	64	N
	Ar 380	64	N
	Ar 381	64	N
	Ar 382	64	N
	Ar 383	64	N
	Ar 384	64	N
	Ar 385	64	N
	Ar 386	64	N
	Ar 387	64	N
	Ar 388	64	N
<b>MULAS</b>	Pe 156	64	N
	Pe 157	256	N
	Pe 158	64	N
	Pe 159	64	N
	Pe 160	256	N
	Pe 161	64	N
	Pe 162	64	N



Pe 163	64	N
Pe 164	64	N
Pe 165	64	N
Pe 166	256	N
Pe 167	256	N
Pe 168	64	N
Pe 169	64	N
Pe 183	64	N
Pe 184	N	50

---