ALDO FRANCISCO ALVES NETO

**Avaliação da viabilidade de oocistos
esporulados de *Neospora caninum* a
diferentes condições de temperatura e ação
de desinfetantes**

São Paulo
2009

ALDO FRANCISCO ALVES NETO

Avaliação da viabilidade de oocistos esporulados de *Neospora caninum* a diferentes condições de temperatura e ação de desinfetantes

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Solange Maria Gennari

São Paulo
2009

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.2178
FMVZ

Alves Neto, Aldo Francisco

Avaliação da viabilidade de oocistos esporulados de *Neospora caninum* a diferentes condições de temperatura e ação de desinfetantes / Aldo Francisco Alves Neto. – 2009.
68 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2009.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientadora: Profa. Dra. Solange Maria Gennari.

1. Coccidiose. 2. Controle. 3. Desinfetantes. 4. *Neospora caninum*. 5. Oocistos.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Avaliação da resistência de oocistos esporulados de *Neospora caninum* a diferentes condições de temperatura e ação de desinfetantes”, protocolado sob o nº1187/2007, utilizando 02 (dois) cães, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Solange Maria Gennari, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 19/09/07.

We certify that the Research “Evaluation of *Neospora caninum* sporulated oocyst resistance to different temperature condition and disinfectant action”, protocol number 1187/2007, utilizing 02 (two) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Solange Maria Gennari, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 09/19/07.

São Paulo, 19 de setembro de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ALVES NETO, Aldo Francisco

Título: Avaliação da viabilidade de oocistos esporulados de *Neospora caninum*
a diferentes condições de temperatura e ação de desinfetantes

Dissertação 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 Mestre em
Ciências

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta Dissertação a todos meus familiares, meu pai Aldo Francisco Alves Filho, minha mãe Maria Emilia Maia de Carvalho F. Alves, meu irmão Lucas de Carvalho Francisco Alves, minha avó Zélia Maia de Carvalho, minha namorada Deborah Pelosi Sessa.

Meu querido irmão João Pedro de Carvalho Francisco Alves, sempre foi e sempre será meu melhor amigo, onde você estiver... *in memorian*.

Minhas tias Maria Zélia de Carvalho Zuccolo e Maria Paula Maia de Carvalho e meu tio José Eduardo Franco Zuccolo.

Dedico também a todos parasitologistas vivos e falecidos, que além de tratar os animais e o homem contra moléstias causadas por parasitas, vem cada vez mais aumentando o controle nas populações animais, diminuindo perdas econômicas como uso de programas estratégicos e manejo correto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a minha orientadora, Professora **Solange Maria Gennari**, por contribuir com minha formação acadêmica, desde a época de estágio extra curricular, ao lado do Professor **Marcelo Bahia Labruna** e **Rodrigo Martins Soares**. Obrigada por me abrirem portas para novos horizontes.

À Doutora **Sandra M. Nishi**, por toda sua contribuição, atenção, paciência e ensinamentos, desde momentos pré-ingresso no mestrado, contribuindo inclusive na elaboração do projeto.

Aos funcionários do departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, tanto de São Paulo quanto de Pirassununga, **Renato, Hilda, Pedrinho, Sr. Antonio, João e José Roberto (Ni)** pelos ótimos momentos de convívio e por toda ajuda cedida por cada um.

Aos colegas e hoje amigos, de momentos de Congresso, bem como disciplinas de Pós Graduação principalmente no *Campus* de Pirassununga, **Andreas, Alex e Guilherme**.

Agradeço também a **Patrícia, Luciana e Guacyara**.

À Doutora **Aline Aparecida Rezende Rodrigues** por toda sua contribuição ao longo do desenvolvimento do experimento.

Ao pessoal do Departamento de Patologia Animal, desta Faculdade, pelo fornecimento do local para manutenção dos gerbilos, em especial ao **Fernando**, por toda sua contribuição e boa vontade.

Ao Instituto Butantan, especialmente ao pessoal do Biotério Central, local este que forneceu todos os gerbilos utilizados no estudo.

A Doutora **Liria** do Instituto Biológico pelo fornecimento de taquizoítos para a obtenção de controle positivo para realização da reação de imunofluorescência indireta.

Ao Professor Dr **David Driemeier** e sua orientada **Nadia Antoniassi**, pela realização da Imunohistoquímica.

Ao Dr **Gereon Schares** pela realização do *Western Blotting*.

A bibliotecária **Elza** e **Fátima** por toda atenção e contribuição em todo desenvolvimento na digitação do trabalho.

Ao meu grande amigo **Rodrigo M. Yamanaka** por todo o auxílio na formatação e ilustrações utilizadas na obra.

Ao Dr. **JP Dubey**, por sua indicação e sua idéia para a condução deste experimento.

Ao Prof. Dr. **Vicente Borelli**, além de abrir porta para novos horizontes, auxiliou em meu ingresso no mestrado, com a carta de recomendação.

Aos professores e queridos amigos da Universidade Paulista **João Paulo Boccia, Marcelo F. de Souza Castro, Caio Biasi Mauro, Arlindo Saran Netto, Roberto de Andrade Bordin, Maria Paula M. Okumura, Antonio Espindola Filho, Kleber da C. Peixoto Junior, Reinaldo B. Orsi, Carlos Henrique Maciel Brunner**, por toda amizade, conselho e auxílios.

Ao Professor Dr. e amigo **Silvio Luis Pereira de Souza**, apesar de pouco contato em laboratório, mas, sempre contribuiu com conhecimentos vastos em parasitologia.

Ao Professor Dr. **José Antonio Jerez**, por toda sua contribuição em didática, desde meu ingresso como professor.

A todos meus alunos da Universidade Paulista, pelo interesse nos assuntos ministrados e pela percepção dos mesmos pela importância desses conteúdos para a atuação de um Médico Veterinário. Em especial a aluna e ex-estagiária do laboratório **Simoni Ciola**, por toda ajuda e atenção atribuída.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP) pelo apoio financeiro a este Projeto de Pesquisa.

À **Fort Dodge** pela contribuição no fornecimento da vacina utilizada aos cães.

A todos os docentes, funcionários e pós-graduandos deste Departamento.

RESUMO

ALVES NETO, A. F. **Avaliação da viabilidade de oocistos esporulados de *Neospora caninum* a diferentes condições de temperatura e ação de desinfetantes.** [Evaluation of the viability of sporulated oocysts of *Neospora caninum* under different temperature and disinfectants treatments]. 2009. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Neospora caninum é um parasita Apicomplexa que causa doença neuromuscular em cães e abortamento em bovinos. Cães e coiotes são as únicas espécies reconhecidas como hospedeiros definitivos, nas quais ocorre a fase sexuada do ciclo evolutivo do *N. caninum*, com eliminação de oocistos através das fezes, os quais esporulam no ambiente e tornam-se infectantes. Apesar da importância dos oocistos como fonte de infecção para várias espécies de hospedeiros, a viabilidade e resistência desses oocistos a tratamentos físicos e químicos ainda são desconhecidas. Este estudo teve por objetivo avaliar a viabilidade de oocistos esporulados de *N. caninum* após tratamentos com diferentes desinfetantes, temperaturas e tempos de exposição. Três cães foram alimentados com tecido cerebral de búfalos soropositivos para anticorpos anti-*N.caninum* pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI ≥ 100) para a obtenção de oocistos. Desses, somente um cão eliminou oocistos tipo *Neospora-Hammondia* sendo confirmado serem de *N. caninum* por bioensaio em gerbilos e por métodos moleculares (PCR-RFLP). Os oocistos esporulados foram purificados e 11 alíquotas contendo aproximadamente 3000 oocistos por alíquota constituíram cada um dos tratamentos, sendo estes: Formol 10% por 1h; Amônia 10% por 1h; Álcool 70% por 1h; Álcool absoluto por 1h; Iodo 2% por 1h; Hipoclorito de sódio 10% por 1h; Temperatura ambiente, controle; -20°C por 6h; 4°C por 6h; 60°C por 1m e 100°C por 1m. Os tratamentos químicos foram todos realizados à temperatura ambiente. Após tratamento os oocistos foram divididos em alíquotas com 1000 oocistos cada e estas foram administradas, via oral, a gerbilos (1000 oocistos por gerbilo) sendo cada grupo experimental constituídos por três animais. Depois de 63 dias os gerbilos foram sacrificados

e colheu-se sangue para a pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* (RIFI e *western blotting*) e tecidos para a pesquisa de cistos em esfregaço direto de cérebro e DNA do parasito (PCR em tempo real), além de pesquisa do agente por técnicas histopatológicas e imuno-histoquímica. Considerou-se eficaz o tratamento que confirmou a inviabilidade dos oocistos por resultados negativos em todas as cinco provas realizadas. Dos tratamentos realizados mostrou-se eficaz o uso de calor a 100°C por 1 minuto e do hipoclorito de sódio a 10% por 1 hora, podendo ser estes indicados para o controle dessas formas no ambiente.

Palavras Chave: Coccidiose. Controle. Desinfetantes. *Neospora caninum*. Oocistos.

ABSTRACT

ALVES NETO, A. F. **Evaluation of the viability of sporulated oocysts of *Neospora caninum* under different temperature and disinfectants treatments.** [Avaliação da viabilidade de oocistos esporulados de *Neospora caninum* a diferentes condições de temperatura e ação de desinfetantes]. 2009. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Neospora caninum is an Apicomplexan parasite that causes neuromuscular disorders in dogs and abortion in cattle. Dogs and coyotes are the only species identified as definitive hosts. The sexual phase of the *N. caninum* life cycle occurs within the host, and results in the shedding of oocysts in the feces that will sporulate in the environment and become infective. Despite their relevance as a source of infection for a number of different hosts, the resistance and viability of such oocysts to physical and chemical treatments are yet to be known. The purpose of this study was to assess the viability of *N. caninum* sporulated oocysts after exposure to treatments using different disinfectants, temperatures and periods of time. For acquisition of the oocysts, three dogs were fed brain tissue from buffaloes positive for antibodies to *N. caninum* by an indirect fluorescent antibody test (IFAT ≥ 100). Only one of the dogs excreted *Neospora-Hammondia* type oocysts. Such oocysts were confirmed to be *N. caninum* by bioassay in gerbils and molecular methods (PCR-RFLP). The sporulated oocysts were purified and 11 doses with approximately 3,000 oocysts each were treated as follows: 10% formaldehyde (formol) for 1 h; 10% ammonia for 1 h; 70% alcohol for 1 h; absolute alcohol for 1 h; 2% iodine for 1 h; 10% sodium hypochlorite for 1 h; Room temperature, control; -20°C for 6 h; 4°C for 6 h; 60°C for 1 min, and 100°C for 1 min. All chemical treatments were performed at room temperature. After treatment, the oocysts were divided into doses of 1,000 oocysts each and administered into three gerbils (*Meriones unguiculatus*) orally (1,000 oocysts per gerbil) per treatment. The gerbils were euthanized after 63 days. Blood samples were taken to be tested for the presence of *N. caninum* antibodies (IFAT and Western blotting analysis), and tissues samples to be tested for the presence of cysts by brain smear technique

and detection of the parasite DNA (real-time PCR), and the identification of the parasite by immunohistochemical and histopathological examinations. In order to be considered an effective treatment, negative results should be observed in the gerbils of all five evaluations conducted. Out of the treatments carried out in this study, exposures to a temperature of 100°C for 1 min and to a 10% sodium hypochlorite solution for 1 h were effective.

Key Words: Coccidiosis. Control. Disinfectants. *Neospora caninum*. Oocysts.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Resultado da PCR-RFLP com as enzimas de restrição: (A) KPN1 e (B) STUI. São Paulo, 2008..... 44
- Figura 2 - (A) Fotomicrografia de corte histológico demonstrando foco de inflamação granulomatosa cerebral, composto por macrófagos e linfócitos. Objetiva de 10X, coloração de HE. (B) Fotomicrografia de corte histológico com reação de imuno-histoquímica, utilizando anticorpo anti- *N. caninum*. Demonstrando a marcação positiva (em marrom) no interior de células inflamatórias. Objetiva de 40X, reação de IHQ..... 47
- Figura 3 - Análise do soro dos gerbilos dos diferentes tratamentos (linhas 1 a 30) e dos controles sem tratamento (linhas 31 a 33) pelo *Western Blotting*, utilizando antígeno purificado p38 (NcSRS2) de *Neospora caninum*..... 50
- Figura 4 - Análise dos soros dos gerbilos dos diferentes tratamentos (linhas 1 a 30) e dos controles sem tratamento (linhas 31 a 33) pelo *Western Blotting*, utilizando antígeno total de *N. caninum*..... 51

LISTA DE HISTOGRAMA

Histograma 1 - Ilustração das etapas do experimento.....	30

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Tratamentos e tempos utilizados nos oocistos de <i>Neospora caninum</i> (3000 oocistos por tratamento) - São Paulo – 2008.....	36
Quadro 2 -	Grupo, tratamento experimental dos oocistos de <i>N. caninum</i> e identificação dos gerbilos experimentais - São Paulo – 2008.....	38
Quadro 3 -	Resultados do bioensaio em cães para obtenção de oocistos de <i>N. caninum</i> - São Paulo – 2008.....	43
Quadro 4 -	Resultados da pesquisa de cistos no cérebro, presença de anticorpos anti- <i>N.caninum</i> pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI ≥ 100), pelo western blotting (WB) e da PCR em Tempo Real nos gerbilos dos diferentes tratamentos - São Paulo – 2008.....	49

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	ácido desoxirribonucleico
dpi	dias pós ingestão
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	grama
<i>g</i>	gravidade terrestre
h	hora
H.h.	<i>Hammondia heydorni</i>
HSP	heat shock protein – proteína do choque térmico
IFN- γ	interferon gama
IgG	imunoglobulina G
IS	imunossuprimidos
Kg	kilograma
M	molar
m	minuto
mg	miligrama
mL	mililitro
NaCl	cloreto de sódio
NC	<i>Neospora caninum</i>
nm	nanômetro
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
PM	peso molecular
p/v	peso/volume
RIFI	reação de imunofluorescência indireta
RFLP	restriction fragment length polymorphism – “polimorfismo dos fragmentos gerados por enzimas de restrição”
SDS	dodecil sulfato de sódio
TBE	tampão Tris-Borato-EDTA

TE	tampão Tris-EDTA
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
USP	Universidade de São Paulo
VPT	Departamento de Patologia
WB	western blotting

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	OBJETIVO.....	29
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1	OBTENÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Neospora caninum</i>	30
3.1.1	Seleção dos búfalos.....	30
3.1.1.1	<i>Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....</i>	<i>32</i>
3.1.2	Bioensaio em cães.....	32
3.1.3	Purificação dos oocistos.....	33
3.2	IDENTIFICAÇÃO DOS OOCISTOS.....	33
3.2.1	Polymerase Chain Reaction Coupled With Restriction Fragment Length Polymorphism – PCR – RFLP.....	34
3.2.2	Bioensaio em gerbilo.....	35
3.3	TRATAMENTO DOS OOCISTOS.....	36
3.3.1	Viabilidade dos oocistos.....	37
3.4	PROCESSAMENTO DO SORO E DOS TECIDOS DOS GERBILOS.....	39
3.4.1	Pesquisa de cistos de <i>N. caninum</i>.....	39
3.4.2	RIFI do soro dos gerbilos.....	39
3.4.3	Western Blotting - W B.....	39
3.4.3.1	<i>Cepas de <i>N. caninum</i>.....</i>	<i>40</i>
3.4.3.2	<i>Purificação dos antígenos de superfície.....</i>	<i>40</i>
3.4.4	Exame Histopatológico e Imuno-histoquímica.....	41
3.4.5	PCR em Tempo Real.....	41
4	RESULTADOS.....	43
4.1	IDENTIFICAÇÃO DOS OOCISTOS PELA PCR – RFLP.....	43
4.2	EFICÁCIA DOS TRATAMENTOS QUÍMICOS E FÍSICOS.....	44

4.2.1	Pesquisa de cistos.....	45
4.2.2	PCR - Tempo Real.....	45
4.2.3	RIFI – Gerbilos.....	45
4.2.4	Histopatologia e Imuno-histoquímica.....	46
4.2.5	Western Blotting.....	48
5	DISCUSSÃO.....	52
6	CONCLUSÕES.....	57
	REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

O protozoário *Neospora caninum* é um parasito coccídeo formador de cistos que causa a doença conhecida por neosporose, que acomete uma série de animais domésticos e silvestres, com maior importância na espécie bovina e canina.

Em 1984, na Noruega, uma ninhada de cães apresentou uma doença neurológica semelhante àquela causada por *Toxoplasma gondii*, contudo, anticorpos anti-*T. gondii* não foram identificados no soro destes cães (BJERKAS; MOHN; PRESTHUS, 1984). Posteriormente, em 1988 nos Estados Unidos, outros cães com sintomas e histórico clínico semelhante permitiram a descrição do novo agente que foi denominado de *N. caninum* (DUBEY et al., 1988a). Nos anos seguintes se deu o desenvolvimento e a padronização de métodos específicos de diagnóstico que permitiram a realização de estudos epidemiológicos (PARE; HIETALA; THURMOND, 1995; BJÖRKMAN; UGGLA, 1999).

Embora de ocorrência relativamente frequente na natureza, o grau de patogenicidade do agente varia de acordo com a espécie do hospedeiro. Entre os animais domésticos, os bovinos se destacam por sua maior suscetibilidade, apresentando 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 e desta forma, perpetuar a infecção no rebanho. Segundo alguns autores a infecção pelo *N. caninum* é uma das principais causas de abortamentos nesta espécie (BARR et al., 1993; BJÖRKMAN et al., 1996; DUBEY; LINDSAY, 1996; BUXTON; MCALLISTER; DUBEY, 2002).

O ciclo de vida do parasita é heteroxênico, envolvendo de um lado um hospedeiro definitivo carnívoro e de outro lado um hospedeiro intermediário herbívoro. Em 1998 o cão doméstico foi identificado como hospedeiro definitivo do *N. caninum* sendo observados oocistos nas fezes após infecção experimental (MCALLISTER et al., 1998). Mais recentemente comprovou-se que os coiotes (*Canis latrans*) também são capazes de eliminar oocistos nas fezes (GONDIM et al., 2004a).

A partir de estudos sorológicos e isolamento do parasito sabe-se que a infecção por *N. caninum* está disseminada em várias espécies animais e ocorre de

forma endêmica em diferentes regiões do mundo. No Brasil, valores de ocorrência descritos em revisão de Gennari (2004) variam de 6,8 a 67,8% nos rebanhos bovinos, 36,5 a 70,9% nos bubalinos, de 3,3 a 100% nos caprinos, de 0,0 a 30% nos ovinos e de 4,3 a 58,9% na população de cães.

Além dos animais domésticos, a infecção também ocorre na fauna silvestre, afetando várias outras espécies de herbívoros, carnívoros e roedores (DUBEY; LINDSAY, 1996; CAÑÓN-FRANCO et al., 2003; TIEMANN et al., 2005a; VOGEL et al., 2006; DUBEY et al., 2007; YAI et al., 2008).

Em relação à fauna silvestre, um estudo realizado no Brasil com cervídeos demonstrou ocorrência significativamente superior nos cervídeos que viviam em regiões próximas aos humanos e seus animais domésticos, quando comparados a cervídeos com menor contato com animais domésticos, indicando que na epidemiologia do agente, mesmo no ambiente silvestre, os animais domésticos podem ter importância (TIEMANN et al., 2005b).

No Brasil, tentativas de infectar outros canídeos (cachorro-do-mato, *Cerdocyon thous*) com cistos foram realizadas, entretanto os animais não eliminaram oocistos de *N. caninum* pelas fezes, não confirmando a participação destes no ciclo do parasito como hospedeiros definitivos (SOARES et al., 2009). Entretanto, estudo de Wapenaar et al. (2006), no Canadá, com coiotes e raposas observaram a eliminação de oocistos de *N. caninum* em 0,7% e 1,1% dos animais, respectivamente e a confirmação do gênero do oocisto foi feita exclusivamente por técnicas moleculares (PCR).

A eficiência da cadeia de transmissão envolvendo o cão doméstico e os bovinos é mostrada na infecção experimental em cães. Cães que ingeriram uma mistura com diferentes tecidos de bovinos eliminaram uma quantidade maior de oocistos que aqueles que ingeriram tecidos de roedores experimentalmente infectados (GONDIM et al., 2002).

Oocistos de *N. caninum* foram detectados nas fezes de cães após a ingestão de tecidos de bovinos (DIJKSTRA et al., 2002), bubalinos (RODRIGUES et al., 2004), ovinos (PENA et al., 2007) e cervídeos (GONDIM et al., 2004b; VIANNA et al., 2005). Em tecidos de galinhas *N. caninum* já foi detectado por métodos moleculares por Costa et al. (2008), entretanto o agente ainda não foi isolado nesta espécie animal.

Do ponto de vista epidemiológico a importância do hospedeiro definitivo no ambiente rural pode ser destacada pela maior ocorrência de cães soropositivos neste ambiente quando comparado aos cães que vivem nos centros urbanos (BARBER et al., 1997; SAWADA et al., 1998; WOUDA et al., 1999; BASSO et al., 2001; PATITUCCI et al., 2001; GENNARI et al., 2002; KIM et al., 2003; FERNANDES et al., 2004; JESUS et al., 2006; FERROGLIO et al., 2007; MALMASI et al., 2007; PARADIES et al., 2007; COLLANTES-FERNANDES et al., 2008; MORAES et al., 2008; SHARMA et al., 2008) e pela forte associação entre a presença de cães nas propriedades e a maior soroprevalência de *N. caninum* nos rebanhos (PARÉ et al., 1998; WOUDA et al., 1999; DIJKSTRA et al., 2002; GUIMARÃES et al., 2004; CORBELLINI et al., 2006). Em algumas propriedades, a maior ocorrência de anticorpos anti-*N.caninum* em vacas mais idosas em relação às mais jovens é um forte indicador de infecção pós-natal (GUIMARÃES et al., 2004), reforçando a importância do cão na epidemiologia do agente.

O ciclo entero-epitelial do *N. caninum*, no intestino dos hospedeiros definitivos, ainda não foi elucidado (DUBEY, 2002). A forma de resistência no ambiente é o oocisto. Ao exame microscópico, os oocistos de *N. caninum* são morfologicamente similares aos de *Hammondia heydorni*, que também são eliminados pelas fezes dos cães. Os oocistos medem 11,7 x 11,3 µm e apresentam, após esporulação, formato esférico a subsférico com dois esporocistos alongados que mensuram 7,0 – 8,0 µm x 2,0 – 3,0 µm e cada esporocisto possui quatro esporozoítas (LINDSAY; UPTON; DUBEY, 1999). A diferenciação entre estes dois gêneros de coccídeos pode ser feita por meio de ensaios biológicos em gerbilos ou camundongos com supressão do gene IFN-γ, nos quais *N. caninum* se desenvolve e *H. heydorni* não se estabelece. Também se pode realizar cultura em células ou análises moleculares como a PCR que diferencia os dois agentes, podendo posteriormente ser feito o sequenciamento (DUBEY; LINDSAY, 2000; BASSO et al., 2001; SCHARES et al., 2005; MONTEIRO et al., 2007).

Os oocistos quando excretados pelo hospedeiro definitivo irão esporular no ambiente entre 24 a 72 horas, dependendo de condições de umidade, temperatura e oxigenação. Os cães eliminam os oocistos ao redor do quinto dia pós ingestão de tecidos de animais experimentalmente ou naturalmente infectados. O número de oocistos eliminados, o período pré-patente e a duração da eliminação variam bastante (GONDIM et al., 2002).

Em infecções experimentais com cistos teciduais observou-se que a eliminação de oocistos pelos cães variou de sete a 26 dias (GONDIM et al., 2002; RODRIGUES et al., 2004; CAVALCANTE et al., 2008), com eliminação de quantidades maiores de oocistos por filhotes quando comparados a cães adultos (GONDIM; MCALLISTER; GAO, 2005). É possível também que um cão volte a eliminar oocistos após reinfecção ou até mesmo espontaneamente sem que ocorra uma nova infecção, entretanto a quantidade eliminada é ainda menor que aquela observada na primo-infecção (GONDIM et al., 2002; MCGARRY et al., 2003; GONDIM; MCALLISTER; GAO, 2005).

Oocistos eliminados por cães foram infectantes para bezerros (DE MAREZ et al., 1999; GONDIM et al., 2002) e a ocorrência de transmissão vertical com abortamentos já foi observada após a ingestão de oocistos esporulados por vacas gestantes (GONDIM et al., 2004b).

São poucos os relatos referentes à frequência de eliminação de oocistos por cães naturalmente infectados assim como informações sobre a contaminação do ambiente por oocistos de *N. caninum*. Esta carência de informação se deve à dificuldade de encontro dos oocistos em fezes de cães em condições naturais (BASSO et al., 2001; MCGARRY et al., 2003).

A frequência de ocorrência de oocistos similares aos de *N. caninum* em cães domiciliados na Alemanha foi de 47 em 24 mil amostras de fezes examinadas, representando 0,2% do total. Destas 47 amostras positivas, somente sete foram confirmadas como *N. caninum* por métodos moleculares (SCHARES et al., 2005), indicando ser bastante raro o encontro de cães naturalmente infectados eliminando oocistos.

Recentemente, Funada et al. (2007), em cães de São Paulo, SP, encontraram ocorrência de 0,4% (sete amostras) de oocistos tipo *Neospora-Hammondia*, em um total de 1755 amostras fecais examinadas. Entretanto neste estudo a confirmação do gênero do parasito não foi realizada e, provavelmente, muitos desses oocistos não pertenciam ao gênero *Neospora* spp, indicando ser a ocorrência deste gênero inferior ao valor encontrado.

Diferentemente do que é observado na infecção pelo *T. gondii* em gatos e pelas espécies de *Hammondia* spp. em cães e gatos, a quantidade de oocistos de *N. caninum* observados nas fezes dos cães natural ou experimentalmente infectados é bastante variável e geralmente muito baixa (SCHARES et al., 2005).

Embora a transmissão vertical seja apontada como a principal via de transmissão do agente na ocorrência de casos endêmicos, suspeita-se que a infecção horizontal, por meio da ingestão de oocistos esporulados contaminando água e alimento esteja ligado aos surtos epidêmicos de abortamentos por *N. caninum* em bovinos (MCALLISTER et al., 1996; THURMOND et al., 1997).

O uso do gerbilo (*Meriones unguiculatus*) como modelo experimental para infecção pelo *N. caninum* foi testado por diversos autores, utilizando taquizoítos por via peritoneal (CUDDON et al., 1992; GONDIM et al., 1999) e cistos, por via oral (DUBEY e LINDSAY, 2000; GONDIM et al., 2001; BASSO et al., 2001.). Trees et al., (2002) observaram que esta espécie de roedor pode se infectar pela ingestão de um único oocisto. O gerbilo é facilmente disponível em biotérios, sem necessidades especiais para sua criação, sendo um modelo muito interessante de infecção experimental em estudos com *N. caninum*. Kang et al. (2009) caracterizaram as lesões e suas distribuições em gerbilos infectados experimentalmente com *N. caninum* via intraperitoneal e confirmaram ser este um bom modelo de infecção, com o encontro do parasito em diferentes tecidos, a partir do oitavo dia pós-infecção.

Os oocistos de coccídeos possuem a parede celular extremamente resistente, tendo grande capacidade de proteger os esporozoítos (forma infectante) de diversos métodos de desinfecção utilizados (BELLI; SMITH; FERGUSON, 2006). Após a esporulação, os oocistos são bastante resistentes às condições adversas do meio ambiente, como baixa umidade, desinfetantes químicos ou mesmo exposição ao calor (DUBEY; BEATTIE, 1988), sendo estes uma eficiente forma de manutenção do agente no ambiente.

Na literatura a resistência dos oocistos de *T. gondii* às diversas condições ambientais e frente à ação de desinfetantes e temperaturas já foi documentada, mas não existem publicações quanto a este aspecto em relação a oocistos de *N. caninum*.

Desinfetantes utilizados no controle de agentes infecciosos e parasitários pertencem a diferentes grupos como: compostos fenólicos, compostos iodados, compostos álcoois, compostos de amônia quaternária, compostos clorados e aldeídos.

O fenol é um dos mais antigos germicidas, sua eficácia foi demonstrada por Lister em 1867 (PINHEIRO, 2001). São considerados estáveis e não são inativados pelo sabão, nem pela matéria orgânica, sendo muito utilizados em tratamentos de

superfícies com contaminação fecal. Entretanto, são corrosivos e irritantes de mucosas (SPAULDING; CUNDY; TURNER, 1977).

A atividade dos compostos iodados, para alguns agentes bacterianos, pode ser alterada quando estes produtos são diluídos em água alcalina ou na presença de matéria orgânica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1984). O álcool etílico e isopropílico são excelentes agentes bactericidas e seu efeito pode ser potencializado quando adicionados com iodo e formaldeído, entretanto são inativados na presença de matéria orgânica (RUBIN, 1983).

Os compostos de amônia quaternária são agentes surfactantes catiônicos e utilizados como desinfetantes sendo bastante ativos contra alguns agentes infecciosos. A atividade da amônia quaternária é afetada pela presença de matéria orgânica e o produto atua melhor quando diluído em água de pH alcalino (LINTON; HUGO; RUSSELL, 1987).

Os compostos clorados incluem o cloro, os hipocloritos, as cloraminas e o ácido cloroisocianúrico e seus derivados. São desinfetantes muito utilizados na agropecuária e fatores como: pH, temperatura e concentração do produto, avaliado em teor de cloro ativo, além da presença de matéria orgânica, podem influenciar na atividade destes produtos (PINHEIRO, 2001).

Estruturalmente os oocistos de *N. caninum* e *T. gondii* são bastante parecidos (LINDSAY; UPTON; DUBEY, 1999). Após a esporulação os oocistos de *T. gondii* são muito resistentes à exposição ao calor, umidade e diversos agentes químicos e, portanto, considerados uma importante forma de contaminação ambiental (DUBEY; BEATTIE, 1988). Existem relatos de oocistos de *T. gondii* que se mantiveram infectantes por 18 meses à temperatura ambiente, 54 meses em água a 4°C (FRENKEL et al., 1975) e por pelo menos seis meses em água do mar (LINDSAY et al., 2003).

Dubey (1998) estudou o efeito da temperatura sobre oocistos de *T. gondii*. Nesse estudo oocistos esporulados foram tratados por diferentes tempos e temperaturas que variaram de -10°C a 70°C. Não se observou perda de efetividade em oocistos mantidos a 30°C por até 107 dias. Oocistos mantidos a 35°C foram efetivos por 32 dias, mas não por 62 dias; a 40°C foram infectantes por nove dias, mas não por 28 dias; a 45°C foram infectantes por um dia, mas não por dois dias; a 50°C por 1 hora, mas não por 2 horas. Já quando a temperatura utilizada foi de 55°C e 60°C os oocistos tornaram-se inviáveis em 2 e 1 minuto, respectivamente.

Quando mantidos a 4°C os oocistos permaneceram infectantes por 54 meses e também não perderam a infectividade quando mantidos por 106 dias a -5°C e -10°C e por até 13 meses quando mantidos a 0°C, indicando uma grande resistência dos oocistos de *T. gondii* a uma gama de temperaturas utilizadas.

Oocistos de *T. gondii* sobrevivem melhor em ambientes de média temperatura (55°C) e têm sobrevida melhor em ambientes quentes e úmidos. Quando submetidos à dessecação, em condições experimentais, os oocistos se mantiveram viáveis por 18 dias em umidade relativa de 80% e por dois dias a 0% de umidade (DUBEY; BEATTIE, 1988).

Uzeda et al. (2007) estudaram a viabilidade de oocistos de *N. caninum* que haviam sido mantidos por 46 meses em solução de ácido sulfúrico a 2% através de inoculação em gerbilos com doses de 400 e 1200 oocistos. Observaram que apesar de se manterem morfológicamente intactos, os oocistos não eram mais infectantes. É importante ressaltar que oocistos de *T. gondii* se mantiveram infectantes por vários dias quando mantidos na mesma solução de ácido sulfúrico 2% a 4° C (DUMETRE; DARDE, 2003).

Em revisão de Dubey e Beattie (1988) o efeito de desinfetantes sobre oocistos de *T. gondii* indicou viabilidade a formalina 10% por 24 horas; ácido sulfúrico 63% por 30 minutos; etanol 95% e 20% por 1 hora e sete dias, respectivamente; hidróxido de sódio 6% por 24 horas; amônia 5,5% por 1 hora e tintura de iodo a 2% e 7% por 3 horas e 10 minutos, respectivamente.

Hipoclorito de sódio e ozônio não foram efetivos na inativação de oocistos de *T. gondii*, mesmo quando usados em alta concentração. Hipoclorito de sódio foi utilizado em concentração 50 vezes maior que a usual (0,2 a 2,0 mg/L) e o ozônio em concentração seis vezes maior que a usual (0,1 a 1,0 mg/L). No mesmo estudo, utilizando-se raios ultravioleta pulsantes e contínuos, sob uma dose de exposição de 1000 mJ/ cm² podem aumentar a inativação de oocistos de *T. gondii* em tratamentos de água, entretanto, o nível de turbidez da água não foi testado (WAINWRIGHT et al., 2007).

Dubey et al. (2002b) estudaram o efeito de temperaturas e desinfetantes sobre esporocistos de *Sarcocystis neurona*. Esporocistos tratados a 50°C por 60 minutos e 55°C por 5 minutos apresentaram-se viáveis, enquanto aqueles aquecidos a 55°C por 15 minutos e 60°C ou mais por 1 minuto já se tornaram inviáveis. No mesmo estudo o uso de hipoclorito de sódio (10, 20 e 100%), clorexidina a 2%, betadine a

1%, o-benzil-p-clorofenol a 5%, fenol a 12,56%, cloridrato de benzil amônia a 6% e formalina a 10% não foram efetivos para inviabilizar os esporocistos. Hidróxido de amônia (29,5% de amônia) por 1 hora matou os esporocistos, entretanto, o mesmo desinfetante na diluição de 2,95% de amônia por 6 horas não os inativou. Os autores indicam o tratamento com altas temperaturas como o mais eficaz para o controle de formas infectantes de *S. neurona* no ambiente.

Outro importante protozoário agente de zoonose é o *Cryptosporidium parvum*. A resistência de oocistos deste agente foi analisada por métodos físicos (ação solar durante 12 horas). Os oocistos foram testados diluídos em água com diferentes níveis de turbidez (0, 5, 100, 300 NTU). A viabilidade dos oocistos foi de 11,54%, 25,96%, 41,50% e 52,80% respectivamente, mostrando que a medida que aumenta a turbidez da água, menor a intensidade de luz sobre os oocistos, consequentemente, menor o efeito sobre os mesmos (GOMEZ-COUSO et al., 2009). Confirmando esta observação, a exposição solar direta por 12 horas foi eficaz na diminuição da viabilidade de *C. parvum* de 98% para 0,3% (ROCHELLE et al., 2005; MENDEZ-HERMIDA et al., 2005).

Para a inativação *in vitro* de oocistos não esporulados de *Eimeria tenella*, diversas soluções microbicidas foram utilizadas, apresentando melhores resultados soluções de formol a 37% associado à dodecilbenzeno sulfonato de sódio 12% (redução de 79,49% na viabilidade dos oocistos), ortodichlorobenzene 60% + xilol 30% (redução de 75,59%) e hipoclorito de sódio a 2% (redução de 65,56%), todos em período de exposição de 30 minutos (GUIMARÃES JUNIOR et al., 2007).

2 OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo a avaliação da resistência e da viabilidade de oocistos esporulados de *N. caninum* a diferentes condições de temperatura, desinfetantes e tempos de tratamentos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste estudo primeiramente foi necessária a obtenção de oocistos de *N. caninum*, que foi feita por bioensaio em cães. A identidade destes foi confirmada por bioprova em gerbilo e por métodos moleculares e somente após esta etapa o estudo referente à viabilidade de oocistos de *N. caninum* a tratamentos químicos e físicos teve início. O histograma 1 ilustra as etapas do estudo.

3.1 OBTENÇÃO DE OOCISTOS DE *Neospora caninum*

Oocistos foram obtidos através de bioensaio em cães alimentados com cérebro de búfalos soropositivos para anticorpos anti-*N. caninum*.

3.1.1 Seleção dos búfalos

Três búfalos (*Bubalus bubalis*) soropositivos para anticorpos anti-*N. caninum* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI ≥ 100) foram abatidos na Fazenda Experimental do *Campus* Administrativo da Universidade de São Paulo (USP) em Pirassununga. Quando do abate, os cérebros foram removidos e conservados refrigerados, individualmente e utilizados como inóculo para alimentar cães com o objetivo de se obter oocistos de *N. caninum*.

Histograma 1 – Ilustração das etapas do experimento

3.1.1.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

O soro dos búfalos foi analisado através da RIFI, para verificar a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* conforme descrito por Dubey et al. (1988b).

Os soros a serem testados e os controles (negativo e positivo) foram diluídos em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,2 estéril (0,0084M Na₂HPO₄, 0,0018M NaH₂PO₄, 0,147M NaCl) acrescentado de soro albumina bovina 1% (p/v) em placas de 96 poços na diluição de 1:100 e distribuídos em lâminas para RIFI contendo o antígeno fixado (taquizoítos de *N. caninum* cepa Nc-1). Depois de 30 minutos de incubação em estufa a 37°C, as lâminas foram lavadas com PBS pH 7,2 por três vezes e, em seguida, incubadas com o conjugado IgG de coelho anti-IgG bovino marcado com isotiocianato de fluoresceína (SIGMA F-7887, EUA) e a leitura foi feita em microscópio epifluorescente (OLYMPUS BX60-FLA, EUA). Foram considerados positivos soros com títulos ≥ 100 .

3.1.2 Bioensaio em cães

Três cães (*Canis familiaris*), sendo dois machos e uma fêmea, com idade aproximada de dois meses, nascidos no canil da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) - USP foram utilizados no bioensaio para obtenção de oocistos de *N. caninum*. Antes do início da infecção os cães foram vacinados contra parvovirose, influenza, corona vírus, leptospirose e cinomose (Duramune® Max5CvK – Fort Dogde, Brasil) e permaneceram alojados em baias individuais, recebendo ração comercial apropriada para filhotes e água *ad libitum* durante todo o período experimental.

Os cães foram mantidos em jejum e posteriormente alimentados com os cérebros dos bubalinos previamente selecionados, recebendo um cérebro por cão num intervalo de dois dias consecutivos. Os cães ingeriram os cérebros sem deixar sobras e vômitos não foram observados após a ingestão dos inóculos.

Três a quatro dias depois da infecção, os dois cães machos foram imunossuprimidos com acetato de metilprednisolona 80mg (Depo-Medrol®, Pfizer,

Brasil), via intramuscular segundo protocolo descrito por Lindsay; Dubey; Duncan (1999).

3.1.3 Obtenção e purificação dos oocistos

Cinco dias após a ingestão do tecido cerebral, o total de fezes eliminado por cada um dos cães, a cada dia, foi examinado para pesquisa de oocistos tipo *Neospora-Hammondia* pela técnica de centrífugo-flutuação em solução de sacarose (GONDIM; GAO; MCALLISTER, 2002).

As amostras positivas foram misturadas a solução de dicromato de potássio a 2%, acondicionadas em frascos e mantidos em estufa a 27°C durante 14 dias para esporulação. Posteriormente, os oocistos esporulados foram mantidos a 4°C e purificados antes do preparo dos inóculos. O excesso de dicromato de potássio foi retirado com três lavagens sucessivas com água destilada e centrifugação. O material purificado foi homogeneizado e a quantidade de oocistos foi determinada por contagem em câmara de Neubauer, sendo a leitura feita em triplicata. Considerou-se o valor médio para o preparo dos inóculos. Os oocistos foram mantidos a 4°C por no máximo 87 dias, período compreendido entre a eliminação dos oocistos pelos cães até o tratamento dos oocistos e inoculação nos gerbilos.

3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS OOCISTOS

Os oocistos foram identificados primeiramente através de microscopia pelo exame das fezes e, devido à semelhança com *H. heydorni*, estes tiveram seu diagnóstico confirmado por métodos moleculares (PCR- RFLP) e biológicos (bioensaio em gerbilo).

3.2.1 Reação em cadeia pela polimerase seguida de restrição enzimática - PCR– RFLP

Ao observar os oocistos nas lâminas, estes foram lavados com 1 mL de tampão de TE (Tris-HCl 1 M, EDTA 0,5 M, pH 8) em placas de Petri estéreis. Foram então transferidos para microtubos de 1,5 mL e centrifugados a 12.000g por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e repetiu-se o mesmo processo. Após a última lavagem, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em 500 µL de tampão de lise (Tris-HCl 1 M, EDTA 0,5 M, NaCl 5 M, SDS 10%). A suspensão de oocistos foi submetida a três ciclos consecutivos de congelamento-descongelamento para melhor rompimento dos oocistos e, em seguida foi adicionada proteinase K na concentração de 20µg/µL e incubado por um período de 12 horas a 37°C. A extração de DNA foi realizada usando uma mistura de fenol-clorofórmio e etanol para a precipitação (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS 1989).

Os oocistos foram submetidos a PCR-RFLP usando *primers* Hsp400F (5'-GAA GAG GTT TCA GCC ATG GTG-3') e Hsp400R (5'-GGT TCT TGC GCT TGA AGT CCT-3') capazes de amplificarem 400pb e que codificam o gene Hsp70 (*heat shock protein*). O ciclo usado foi 94°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 50 segundos, 56°C por 50 segundos e 72°C por 50 segundos com extensão final de 72°C por 5 minutos (MONTEIRO et al., 2007). As enzimas de restrição utilizadas foram *StuI* e *KpnI*, conforme Monteiro et al. (2008) com *StuI* clivando os produtos de PCR dos oocistos de *N. caninum* e com a formação de duas bandas (150+250pb) e *KpnI* que cliva *H. heydorni* (136+264pb). A reação de restrição foi realizada a 37°C por 1 hora conforme instruções do fabricante.

Em cada corrida de PCR foram incluídos controles positivos (DNA de oocistos de *N. caninum* e de *H. heydorni*) e controles negativos (água ultrapura).

A análise dos produtos amplificados foi realizada através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 2,5% (p/v) em cuba horizontal com tampão de corrida TBE 0,5 x (0,045 M de Tris-borato e 0,001 M de EDTA, pH 8,0). Foram analisadas alíquotas de 10 µL da amostra amplificada, sendo que o gel foi imerso em solução de brometo de etídeo durante 15 minutos e posteriormente observado em transiluminador ultravioleta para a visualização das bandas. Essas bandas foram comparadas com o padrão de peso molecular que possuía fragmentos múltiplos de

100 pares de bases. O registro da imagem foi realizado através do AlphaImager HP Imaging System® (Alpha Innotech, EUA).

3.2.2 Bioensaio em gerbilo

Gerbilos provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan, sendo 12 fêmeas e 21 machos, foram utilizados no teste de viabilidade dos oocistos antes (grupo controle) e após os diferentes tratamentos químicos e físicos terem sido aplicados. Os gerbilos foram divididos em 11 grupos de três animais cada, com cada grupo correspondente a um diferente tratamento e um grupo controle (oocistos não tratados e mantidos a temperatura ambiente).

Os gerbilos permaneceram em caixas no biotério do Departamento de Patologia (VPT-FMVZ-USP). Em cada caixa foi mantido um grupo experimental (três animais), durante o período de 63 dias, recebendo ração apropriada e água *ad libitum*, sendo os animais observados diariamente e as caixas higienizadas semanalmente.

Paralelamente, quatro gerbilos fêmeas foram utilizadas em infecção experimental com taquizoítos de *N. caninum*, cepa NC-1, para obtenção de soro hiperimune para controle positivo durante a RIFI. Taquizoítos de *N. caninum* foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Viroses do Instituto Biológico de São Paulo. Dois gerbilos foram inoculados com 50 taquizoítos, um gerbilo recebeu 16 taquizoítos e o último gerbilo recebeu 650 taquizoítos mortos, todos pela via intraperitoneal. Um mês após a inoculação, os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (10mg/ Kg, Anasedan®, Vetbrands, Brasil) e cloridrato de quetamina (100mg/ Kg, Vetaset®, Fort Dodge, Brasil) via intraperitoneal, o sangue foi coletado e o soro obtido foi titulado através da RIFI. Após a coleta de sangue, os animais foram eutanasiados com 0,3 mL/ Kg de uma formulação comercial de embutamida, mebezônio e tetracáína (T61®, Intervet, Brasil) e amostras de tecidos foram obtidas para análises.

3.3 TRATAMENTO DOS OOCISTOS

Cada gerbilo recebeu um inóculo constituído por 1000 oocistos de *N. caninum* conforme apresentado no quadro 1.

Grupo	Tratamentos	Tempo
1	Álcool absoluto	1 hora
2	- 20° C	6 horas
3	4° C	6 horas
4	60° C	1 minuto
5	100° C	1 minuto
6	Formol a 10%	1 hora
7	Amônia a 10%	1 hora
8	Iodo a 2%	1 hora
9	Hipoclorito de sódio a 10%	1 hora
10	Álcool a 70%	1 hora
11	Temperatura ambiente	controle

Quadro 1 - Tratamentos e tempos utilizados nos oocistos de *N. caninum* (3000 oocistos por tratamento) - São Paulo - 2008

Para os tratamentos químicos (desinfetantes) os 3000 oocistos, presentes em 475 µL da solução de oocistos e antibiótico-antimicótico (Invitrogen Corporation, EUA), foram colocados em tubos cônicos de 50 mL e adicionou-se 10 mL dos desinfetantes a serem testados, previamente diluídos, quando necessário, e deixou-se pelo tempo programado e à temperatura ambiente (24°C). Depois de tratados, os oocistos foram lavados com solução fisiológica por sucessivas vezes por centrifugação para remoção dos desinfetantes.

Os tratamentos físicos foram feitos em microtubos (tipo *ependorf*), e os oocistos estavam em 475 µL de solução fisiológica, em freezer (-20°C) ou estufas com as temperaturas a serem testadas pré-estabelecidas (4°C, 60°C e 100°C).

3.3.1 Viabilidade dos oocistos

Logo após os tratamentos os inóculos foram preparados de forma a conter 1000 oocistos por inóculo e administrados aos gerbilos, via oral, com auxílio de uma sonda esofágica. O quadro 2 apresenta a relação dos grupos experimentais, os respectivos tratamentos e a identificação dos gerbilos.

Após um período de 63 dias, os animais foram anestesiados, via intra peritoneal, com 0,015 mL de xilazina a 2% (Kensol®, Konig, Brasil) associado a 0,03 mL de quetamina a 10% (Vetaset®, Fort Dodge, Brasil). Depois da anestesia, coletou-se 1,0 mL de sangue intracardíaco e obteve-se o soro que foi aliquotado e mantido a - 4°C até o uso.

Depois da coleta do sangue, os gerbilos foram sacrificados com 0,2 mL de T61® (Intervet, Brasil) e necropsiados para a retirada do cérebro, coração, musculatura esquelética (coxa), fígado e baço. Metade de cada tecido foi colocada em frasco com formol tamponado (100 mL de formaldeído 40%, 900 mL de H₂O destilada, 4g de NaH₂PO₄, 6,5g de Na₂HPO₄) e enviado para diagnóstico histopatológico e imunohistoquímico. O restante de cada tecido foi colocado em microtubos e congelado para posterior realização da PCR em tempo real. Com o cérebro também foi realizado esfregaço e exame direto, para a pesquisa de cistos de *N. caninum*.

GRUPO	TRATAMENTO DOS OOCISTOS	Nº. DO GERBILO	SEXO
1	Álcool absoluto 1h	1	Fêmea
1	Álcool absoluto 1h	2	Fêmea
1	Álcool absoluto 1h	3	Fêmea
2	-20°C 6h	4	Fêmea
2	-20°C 6h	5	Fêmea
2	-20°C 6h	6	Fêmea
3	+4°C 6h	7	Macho
3	+4°C 6h	8	Macho
3	+4°C 6h	9	Macho
4	+60°C 1min	10	Macho
4	+60°C 1min	11	Macho
4	+60°C 1min	12	Macho
5	+100°C 1min	13	Macho
5	+100°C 1min	14	Macho
5	+100°C 1min	15	Macho
6	Formol 10% 1h	16	Fêmea
6	Formol 10% 1h	17	Fêmea
6	Formol 10% 1h	18	Fêmea
7	Amônia 10% 1h	19	Fêmea
7	Amônia 10% 1h	20	Fêmea
7	Amônia 10% 1h	21	Fêmea
8	Iodo 2% 1h	22	Macho
8	Iodo 2% 1h	23	Macho
8	Iodo 2% 1h	24	Macho
9	Hipoclorito de sódio 10% 1h	25	Macho
9	Hipoclorito de sódio 10% 1h	26	Macho
9	Hipoclorito de sódio 10% 1h	27	Macho
10	Álcool 70% 1h	28	Macho
10	Álcool 70% 1h	29	Macho
10	Álcool 70% 1h	30	Macho
11	Controle	31	Macho
11	Controle	32	Macho
11	Controle	33	Macho

Quadro 2 - Grupo, tratamento experimental dos oocistos de *N. caninum* e identificação dos gerbilos experimentais - São Paulo - 2008

3.4 PROCESSAMENTO DO SORO E DOS TECIDOS DOS GERBILOS

O soro dos gerbilos foi analisado para a presença de anticorpos anti-*N. caninum* pré e pós-tratamento e os tecidos por diagnóstico direto e molecular quando do sacrifício, 63 dias pós-tratamento.

3.4.1 Pesquisa de cistos de *N. caninum*

Para a pesquisa de cistos de *N. caninum* adicionou-se 0,5 mL de solução salina fisiológica ao material encefálico, em microtubos e foram feitas cinco lâminas com o *imprint* desse tecido e leitura direta em microscópio óptico composto, com aumento de 10 vezes.

3.4.2 RIFI do soro dos gerbilos

Os soros dos gerbilos foram analisados para pesquisa de anticorpos anti- *N. caninum* pela RIFI, conforme descrito no item 3.1.1.1 com conjugado anti-gerbilo marcado com fluoresceína (Immunology Consultants Laboratory, EUA). O ponto de corte utilizado foi de 1:50 (DUBEY et al., 1988b) e as amostras foram testadas nas diluições 1:50 e 1:100.

3.4.3 Western Blotting - W B

O W B foi realizado no Friedrich-Loeffler-Institut, Alemanha pelo Dr. Gereon Schares.

3.4.3.1 Cepas de *N. caninum*

Cepas Nc-1 de *N. caninum* (DUBEY et al., 1988b) foram mantidas em culturas de células Vero e purificadas segundo protocolo de Schares et al. (1998, 1999). Taquizoítos obtidos de cultivo celular foram congelados a -80°C até serem utilizados no W B.

3.4.3.2 Purificação dos antígenos de superfície

Os antígenos de superfície p38 (NcSRS2) de *N. caninum* foram purificados por cromatografia de afinidade como descrito por Schares et al (2000), utilizando os anticorpos monoclonais mAb 4.15.15.

Para a realização do teste foram utilizados antígenos totais de taquizoítos de *N. caninum* e antígenos de superfície purificados, conforme descrito por Schares et al (1998). *Pellets* contendo 4×10^7 taquizoítos de *N. caninum* e da proteína purificada p38 (0,05 µg) foram incubados em tampão (2% [w/v] SDS, 10% [v/v] glicerol, 62mM Tris-HCl, pH 6,8) durante 1 minuto a 94°C e separados em gel de poliacrilamida (SDS) a 12% [w/v] (60 x 70 x 1 mm de tamanho). Em seguida foram transferidos para membranas PVDF (Immobilon-P, Millipore, EUA) e, após a transferência, as membranas foram bloqueadas com PBS-TG (PBS com 0,05% [v/v]), Tween 20 (Sigma, EUA) e gelatina líquida de peixe 2% (v/v) (Serva, Alemanha). As membranas foram cortadas em tiras para posterior exame.

Quando se utilizou antígeno total de *N. caninum*, a reatividade dos soros foi testada com antígenos imunodominantes de taquizoítos de *N. caninum* (Nc - IDA) de 29, 30, 33 e 37 KDa (SCHARES et al., 2000). No W B utilizando a proteína purificada p38 (NcSR32) a reatividade dos soros testados foi observada sobre a banda única de 38 KDa.

Para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum*, a incubação das tiras no W B foi realizada conforme descrito por Schares et al. (1998), com algumas modificações. O soro foi diluído a 1:100 em PBS-TG e como controle positivo foi utilizado o soro de um gerbilo experimentalmente infectado (SCHARES et al., 2005).

3.4.4 Exame Histopatológico e Imuno-histoquímica

Fragmentos de encéfalo, fígado, coração, músculo esquelético e baço dos gerbilos foram preservados em solução de formol tamponado e enviados ao Setor de Patologia Veterinária do Departamento de Patologia Clínica Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo Dr. David Driemeier para a realização de exames histopatológicos. O exame histopatológico foi realizado em cortes teciduais corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) e a pesquisa de *N. caninum* foi feita pelo teste de imuno-histoquímica (IHQ) com anticorpo primário anti-*N. caninum* (VMRD, Pullman, EUA).

Para a realização da reação de IHQ as amostras de tecidos foram inicialmente incubadas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 10 minutos para o bloqueio da peroxidase endógena. Para a recuperação antigênica utilizou-se tripsina a 0,1% por 10 minutos a 37°C, seguida de calor (microondas potência máxima por 2 minutos) com as lâminas imersas em tampão citrato pH 6,0 (1 L de água destilada, 2,1g de $C_6H_8O_7$, ajustado a pH 6,0 com NaOH a 0,5%). As marcações inespecíficas foram reduzidas pela aplicação de leite desnatado a 5% por 15 minutos. O anticorpo primário foi aplicado durante 1 hora à temperatura de 37°C, seguido do anticorpo secundário biotinalado e solução de avidina conjugada com peroxidase (Dako, EUA) por aproximadamente 20 minutos cada, a temperatura ambiente. A revelação da marcação foi obtida através da utilização do substrato cromógeno tetra-hidrocloreto de 3,5-diaminobenzidina (DAB, Dako, EUA), por 5 a 10 minutos. Foi utilizado hematoxilina como contra-corante por 1 minuto (MILLS, 1992).

3.4.5 PCR em Tempo Real

Amostras de cérebro e coração de cada um dos gerbilos foram fragmentadas e maceradas em cadinho e pistilo com nitrogênio líquido. A seguir os tecidos foram homogeneizados ao reagente DNazol® (DNAZOL® Reagent, GIBCO, EUA) até a completa lise celular. O material foi em seguida centrifugado a 10.000g durante 10 minutos para a remoção dos debris celulares. O DNA foi obtido do sobrenadante

pela adição de etanol absoluto induzindo a precipitação do material nucléico. Após lavagens com etanol a 70%, o DNA foi solubilizado em solução de NaOH a 8mM.

A concentração e a qualidade do DNA foram estimadas por meio de leitura em espectrofotômetro a 260 e 280 nm (BioPhotometer, Eppendorf, EUA).

Foram empregados 50 ng de DNA em cada reação de amplificação, utilizando conjuntos de *primers* e sonda específicos para *N. caninum* (gene 5) e controle endógeno 18S (Eukariotic 18S rRNA Endogenous Control, Applied Biosystems, EUA) em tampão universal para PCR em tempo real (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, EUA).

Paralelamente às amostras de DNA extraídas dos gerbilos, foram também preparadas reações utilizando DNA de taquizóitos de *N. caninum* (cepa NC-1) e água Milli-Q que foram empregadas como controles de amplificação positivo e negativo, respectivamente.

As reações foram realizadas no equipamento Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System (EUA) e submetidas a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Ao final da reação das curvas de amplificação foram analisadas utilizando o programa Sequence Detection Software (SDS, v1.3, Applied Biosystems, EUA).

Foram consideradas positivas as reações que apresentaram elevação do sinal fluorescente ao longo dos ciclos de amplificação e negativas as reações em que o sinal fluorescente se manteve no mesmo nível basal observado no início da reação.

Sequências (5'- 3') dos oligonucleotídeos para o gene 5 (Acession number AY665719)

Senso GCGGACGTGTCGTTGTTG

Anti-senso GTTCACACACTATAGCCACAAACAA

Sonda CCTGCGGCAGCAAGGCTCCTT

4 RESULTADOS

Os búfalos utilizados como doadores de inóculo de *N. caninum* apresentaram anticorpos anti-*N. caninum* com títulos 100, 400 e 400.

Os cães número 1, 2 e 3 receberam respectivamente os cérebros dos búfalos número 563 com título 400, 552 também com título 400 e 562 com título 100. Um dos cães imunossuprimidos (cão 1) veio a óbito nove dias após a infecção e cinco dias pós-imunossupressão. O cão número 3, que não eliminou oocistos, não foi imunossuprimido. Somente o cão número 2 eliminou oocistos nas fezes e estes foram observados a partir do oitavo dia pós-ingestão do tecido cerebral. O cão 2 eliminou oocistos por um período de 10 dias (Quadro 3).

Cão N°.	Imunossupressão	Título de Anticorpos (búfalos)	Eliminação de oocistos	d. p. i.
1	Sim	100	0	0
2	Sim	400	80.000	8°- 16°
3	Não	400	*	*

* = Óbito

d. p. i.= dias pós ingestão do cérebro

Quadro 3 - Resultados do bioensaio em cães para obtenção de oocistos de *N. caninum* - São Paulo - 2008

4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS OOCISTOS PELA PCR- RFLP

Os oocistos obtidos do cão número 2 apresentaram, pela PCR- direcionada aos *primers* HSP 400F e HSP 400R, banda com 400bp, assim como os controles positivos de *N. caninum* e de *H. heydorni*.

Os produtos da PCR obtidos dos oocistos do cão 2 foram digeridos pela enzima *StuI* mas não pela enzima *KpnI*, indicando tratar-se de oocistos da espécie *N. caninum* (Figura 1).

(A)

(B)

PM= peso molecular

H.h. = *Hammondia heydorni*N.c.= *Neospora caninum*

dpi = dias pós ingestão

Figura 1 – Resultado da PCR-RFLP com as enzimas de restrição: (A) KPN1 e (B) STUI - São Paulo - 2008

4.2 EFICÁCIA DOS TRATAMENTOS QUÍMICOS E FÍSICOS

A eficácia dos tratamentos sobre os oocistos de *N. caninum* foram avaliadas através de: exame direto para a pesquisa de cistos no cérebro dos gerbilos, RIFI e W B no soro dos gerbilos, PCR e IHQ nos tecidos dos gerbilos. A presença de uma dessas cinco técnicas com resultado positivo foi considerado que o respectivo tratamento não inviabilizou os oocistos.

4.2.1 Pesquisa de cistos

Os gerbilos inoculados não apresentaram sintomas da doença.

Em nenhum dos 33 gerbilos do estudo, cistos de *N. caninum* foram observados nos cérebros pelo exame direto. Para cada gerbilo cinco lâminas foram examinadas (Quadro 4).

4.2.2 PCR-Tempo Real

Pela PCR em tempo real, tecidos de sete dos 33 gerbilos foram positivos a DNA de *N. caninum*, sendo: os três controles positivos (gerbilos número 31, 32 e 33) e os animais número 9 (+4°C por 6h), números 10 e 11 (+60°C por 1m) e o número 21 (amônia 10% por 1h). Todas as amostras positivas foram provenientes do tecido de cérebro; as amostras de coração apresentaram-se negativas (Quadro 4).

4.2.3 RIFI – Gerbilos

O resultado da RIFI dos soros dos gerbilos experimentais encontra-se no quadro 4. Dos 33 gerbilos, 25 (75,75%) apresentaram anticorpos anti-*N. caninum* (RIFI ≥ 100). Os três gerbilos dos grupos 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10 e 11, correspondentes a sete diferentes tratamentos e aos animais controles positivos, sem nenhum tratamento, apresentaram soro conversão. Um dos três gerbilos do grupo 8 (iodo a 2% por 1h) também foi positivo (≥ 100). Todos os gerbilos que receberam oocistos tratados com 100°C durante 1 minuto (grupo 5) e hipoclorito de sódio a 10% por 1 hora (grupo 9) não apresentaram anticorpos anti- *N. caninum*.

4.2.4 Histopatologia e Imuno-histoquímica

No exame dos tecidos pela IHQ apenas um animal foi positivo, o número 12, que pertencia ao tratamento +60°C por 1 minuto (Quadro 4). Este gerbilo pelo exame histopatológico apresentou no encéfalo, meningite supurativa moderada com deposição de fibrina e grumos bacterianos e encefalite mononuclear focal discreta. As figuras 2 A e B ilustra o resultado do exame histopatológico do animal positivo.

(A)

(B)

Figura 2- (A) Fotomicrografia de corte histológico demonstrando foco de inflamação granulomatosa cerebral, composto por macrófagos e linfócitos. Objetiva de 10X, coloração de HE. (B) Fotomicrografia de corte histológico com reação de imuno-histoquímica, utilizando anticorpo anti- *N. caninum*. Demonstrando a marcação positiva (em marrom) no interior de células inflamatórias. Objetiva de 40X, reação de IHQ

4.2.5 Western Blotting

O resultado do W B dos soros dos gerbilos encontra-se no quadro 4 e figuras 3 e 4. Oito gerbilos de três diferentes tratamentos foram negativos, sendo: três animais do grupo 5, 100°C por 1 minuto; dois gerbilos do grupo 8, iodo a 2% por 1 hora e três gerbilos do grupo 9, hipoclorito de sódio a 10% por 1 hora. Todos os outros gerbilos apresentaram bandas no W B, reconhecendo antígenos imunodominantes presentes no extrato total de taquizoítos, bem como o antígeno recombinante p38, sendo os resultados com estes dois antígenos idênticos e confirmaram todos os achados da RIFI.

GRUPO	TRATAMENTO	GERBILOS	CISTOS	IH Q	RIFI	WB	PCR TEMPO REAL
1	Álcool absoluto 1h	1	N	N	P	P	N
1	Álcool absoluto 1h	2	N	N	P	P	N
1	Álcool absoluto 1h	3	N	N	P	P	N
2	-20° C 6h	4	N	N	P	P	N
2	-20° C 6h	5	N	N	P	P	N
2	-20° C 6h	6	N	N	P	P	N
3	+4° C 6h	7	N	N	P	P	N
3	+4° C 6h	8	N	N	P	P	N
3	+4° C 6h	9	N	N	P	P	P
4	+60° C 1min	10	N	N	P	P	P
4	+60° C 1min	11	N	N	P	P	P
4	+60° C 1min	12	N	P	P	P	N
5	+100° C 1min	13	N	N	N	N	N
5	+100° C 1min	14	N	N	N	N	N
5	+100° C 1min	15	N	N	N	N	N
6	Formol 10% 1h	16	N	N	P	P	N
6	Formol 10% 1h	17	N	N	P	P	N
6	Formol 10% 1h	18	N	N	P	P	N
7	Amônia 10% 1h	19	N	N	P	P	N
7	Amônia 10% 1h	20	N	N	P	P	N
7	Amônia 10% 1h	21	N	N	P	P	P
8	Iodo 2% 1h	22	N	N	P	P	N
8	Iodo 2% 1h	23	N	N	N	N	N
8	Iodo 2% 1h	24	N	N	N	N	N
9	Hipoclorito de sódio 10% 1h	25	N	N	N	N	N
9	Hipoclorito de sódio 10% 1h	26	N	N	N	N	N
9	Hipoclorito de sódio 10% 1h	27	N	N	N	N	N
10	Álcool 70% 1h	28	N	N	P	P	N
10	Álcool 70% 1h	29	N	N	P	P	N
10	Álcool 70% 1h	30	N	N	P	P	N
11	Controle	31	N	N	P	P	P
11	Controle	32	N	N	P	P	P
11	Controle	33	N	N	P	P	P

P= Positivo, N= Negativo.

Quadro 4 - Resultados da pesquisa de cistos no cérebro, presença do agente pela imuno-histoquímica (IHQ), presença de anticorpos anti-*N.caninum* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI ≥ 100) e pelo Western Blotting (WB) e da PCR em Tempo Real nos gerbilos dos diferentes tratamentos (G1 – G11) - São Paulo - 2008

Tratamento: linhas 1, 2, 3: álcool absoluto por 1h; linhas 4, 5, 6: -20°C por 6h; linhas 7, 8, 9: +4°C por 6h; linhas 10,11,12: +60°C por 1min; linhas 13,14,15: +100°C por 1min; linhas 16,17,18: formol 10% por 1h; linhas 19, 20, 21: amônia 10% por 1h; linhas 22, 23, 24: iodo 2% por 1h; linhas 25, 26, 27: hipoclorito de sódio 10% por 1h; linhas 28, 29, 30: álcool 70% por 1h. PK- controle positivo. NK- controle negativo.

Figura 3 - Análise do soro dos gerbilos dos diferentes tratamentos (linhas 1 a 30) e dos controles sem tratamento (linhas 31 a 33) pelo *Western Blotting*, utilizando antígeno purificado p38 (NcSRS2) de *Neospora caninum*

Tratamento: linhas 1, 2, 3: álcool absoluto por 1h; linhas 4, 5, 6: -20° C por 6h; linhas 7, 8, 9: +4° C por 6h; linhas 10,11,12: +60° C por 1min; linhas 13,14,15: +100° C por 1min; linhas 16,17,18: formol 10% por 1h; linhas 19, 20, 21: amônia 10% por 1h; linhas 22, 23, 24: iodo 2% por 1h; linhas 25, 26, 27: hipoclorito de sódio 10% por 1h; linhas 28, 29, 30: álcool 70% por 1h. PK- controle positivo. NK- controle negativo.

Figura 4 - Análise dos soros dos gerbilos dos diferentes tratamentos (linhas 1 a 30) e dos controles sem tratamento (linhas 31 a 33) pelo *Western Blotting*, utilizando antígeno total de *N. caninum*

5 DISCUSSÃO

O efeito de diferentes tratamentos químicos e físicos sobre oocistos de coccídeos tais como *S. neurona* e *T. gondii* já foram realizados (DUBEY; BEATTIE, 1988; DUBEY et al., 2002b), entretanto, apesar da grande importância do *N. caninum*, estudos semelhantes ainda não haviam sido feitos. O presente estudo relata pela primeira vez o efeito de tratamentos com desinfetantes e temperaturas sobre oocistos de *N. caninum*.

Para a obtenção de oocistos para a realização do estudo, búfalos foram utilizados como inóculos. Estes se mostraram bons doadores como anteriormente observado por Rodrigues et al. (2004).

Dos três cães alimentados com cérebros de búfalos soropositivos para *N. caninum*, dois foram imunossuprimidos. Um deles veio a óbito e o outro eliminou uma quantidade boa de oocistos por 10 dias. Lindsay; Dubey; Duncan (1999) também conseguiram infecção de cães utilizando um esquema de imunossupressão, entretanto o fato de serem animais bastante jovens, aproximadamente 65 dias de idade, associado à imunossupressão e à infecção, provavelmente tenha sido a causa da morte desse animal. O cão que não recebeu tratamento imunossupressor não eliminou oocistos durante os 30 dias de observação.

O período de pré-patência de oito dias está dentro da amplitude observada em outros estudos com infecção experimental em cães (GONDIM; MCALLISTER; GAO, 2005; Rodrigues et al., 2004). A quantidade de oocistos eliminada pelo cão ao longo dos 10 dias de patência foi de aproximadamente 80.000 oocistos. No estudo de Rodrigues et al. (2004) os cães também receberam inóculo de tecidos de búfalos, e eliminaram oocistos em quantidade que variou de 21.250 oocistos (durante sete dias) a 820.655 oocistos (por 17 dias). Estes cães também eram jovens, mas não haviam sido imunossuprimidos. O uso de animais jovens como doadores de oocistos é uma recomendação (BOYD et al., 2005; GONDIM; MCALLISTER; GAO, 2005) e, apesar de não terem sido utilizados animais mais velhos neste estudo, acredita-se que poderia ter influenciado negativamente, uma vez que um dos cães, sem imunossupressão, não eliminou oocistos.

Os oocistos eliminados pelas fezes foram inicialmente diagnosticados como *Neospora-Hammondia*, por serem morfologicamente similares (LINDSAY; UPTON;

DUBEY, 1999; DUBEY et al., 2002a). Devido a este fato foram analisados pela PCR-RFLP, procedimento este que os classificou como *N. caninum* (MONTEIRO et al., 2008). Vale ressaltar que os oocistos não foram analisados em *pool*, mas por cada um dos dias de eliminação e, em todas as análises, os resultados foram semelhantes. Somente após esta observação um *pool* com os oocistos eliminados nos diferentes dias foi realizado.

Para avaliar a viabilidade dos oocistos, bioensaios em gerbilos foram realizados conforme padronizado por Dubey e Lindsay (2000), que confirmaram ser essa espécie animal um bom modelo de infecção oral com oocistos.

Os gerbilos foram infectados com os oocistos tratados e, com o tecido e o soro desses animais necropsiados 63 dias pós-infecção, procedeu-se cinco testes: pesquisa de cistos no cérebro, IHQ de cérebro, coração, musculatura esquelética, baço e fígado, PCR em Tempo Real de cérebro e coração e sorologia através da RIFI e do W B.

Os animais do grupo 11, que receberam oocistos sem tratamento, serviram como controles positivos para os ensaios de viabilidade. Todos os três gerbilos desse grupo foram positivos pela PCR em Tempo Real e pelas técnicas sorológicas, indicando que estas técnicas apresentam alta sensibilidade e devem ser indicadas em ensaios com modelos experimentais gerbilo.

No mesmo momento que os gerbilos controles foram inoculados os grupos sob os diferentes tratamentos também o foram, uma vez que estas técnicas biológicas levam, no mínimo, oito semanas, tempo para que ocorra a cronificação do agente no organismo do roedor, com formação de cistos teciduais e anticorpos séricos. A presença de anticorpos séricos nos controles confirmou a viabilidade dos oocistos utilizados nos inóculos experimentais.

Dos outros 30 gerbilos infectados com oocistos de 10 diferentes tratamentos, em nenhum deles cistos teciduais foram observados no cérebro. Uma explicação para este fato pode ser que na amostra utilizada para a pesquisa de cistos estas estruturas não se encontravam presentes, pois mesmo tendo sido feitas cinco lâminas para cada um dos gerbilos, pode ocorrer destes não serem encontrados. Dubey (1988b) com *T. gondii* avalia que deva existir aproximadamente um cisto por 50g de tecido em grandes animais. Para *N. caninum* este dado não é conhecido, podendo ser ainda menor, visto que cistos desse agente são muito pouco observados em órgãos que não o sistema nervoso central. Há também o fato de que

coccídeos formadores de cistos teciduais podem formar mais ou menos cistos, dependendo do isolado, e este fato muito provavelmente também possa estar ocorrendo com *N. caninum*. Outros autores conseguiram observar cistos cerebrais em gerbilos infectados com cistos de *N. caninum* (GONDIM et al., 2001; PENA, et al., 2007). Pela facilidade e disponibilidade do tecido nervoso quando bioensaios são realizados, mesmo com os resultados negativos obtidos neste estudo, recomendam-se estes sejam pesquisados, mas com a atenção de não considerar resultados negativos como conclusivos.

Outra técnica realizada foi a pesquisa do DNA do *N. caninum* em tecidos dos gerbilos dos diferentes grupos, através da PCR em Tempo Real. Nesta técnica também há o problema da sensibilidade, uma vez que a quantidade de tecido examinado para cada um dos gerbilos é relativamente baixa. Utilizou-se tecidos do cérebro e do coração e sete animais foram positivos, sendo todos os positivos em amostras de tecidos cerebrais.

Outra técnica utilizada foi a IHQ; nesta apenas um animal do grupo 4 (–60°C por 1 minuto) obteve resultado positivo, mostrando baixa sensibilidade. Pelo mesmo motivo descrito para as outras técnicas nas quais o agente é pesquisado em tecidos, a sensibilidade fica prejudicada, pois somente uma pequena quantidade de tecidos é pesquisada e os cistos podem não estar presentes nessas amostras Rosa et al. (2001) com amostras de 16 diferentes tecidos de caprinos experimentalmente infectados por *T. gondii* e com diagnóstico da infecção confirmado por provas sorológicas e inclusive por sintomas da doença nos animais experimentais, não conseguiram encontrar o agente pela técnica de IHQ.

Quanto às técnicas sorológicas (RIFI e W B) estas se mostraram muito úteis e todos os resultados foram semelhantes, seja pela RIFI ou pelo W B, sendo que este último teste foi utilizado como confirmatório da RIFI e realizado com antígeno total de *N. caninum* e com antígeno de proteína recombinante p38 de *N. caninum*. Dos 33 animais dos 10 tratamentos mais os controles, 25 apresentaram-se positivos. As técnicas sorológicas foram igualmente sensíveis e quando comparadas às outras técnicas utilizadas (pesquisa de cistos, PCR em Tempo Real e IHQ) foram as de maior sensibilidade.

Para que um tratamento fosse considerado eficaz para inviabilizar os oocistos todos os cinco testes tinham que apresentar resultado negativo. Isso só foi

observado nos grupos 5 e 9. Em todos os outros tratamentos resultados positivos foram observados em pelo menos um dos testes diagnósticos utilizados.

Dos tratamentos físicos utilizados sobre os oocistos, somente +100°C por 1 minuto mostrou-se eficaz e dos químicos, uso do Hipoclorito de Sódio a 10% por 1h também foi eficaz na inativação dos oocistos esporulados de *N. caninum*. Devido a grande variedade de diluições que muitos desses compostos são vendidos no mercado e utilizados, a recomendação do uso destes em ambientes para o controle das formas infectantes de *N. caninum* é difícil de ser feita. Mesmo assim, é importante conhecer-se o potencial desses compostos em outras diluições, tempos e temperaturas antes de serem descartados como auxiliares no controle.

Os resultados obtidos no presente estudo diferem de pesquisas anteriormente realizadas com outros coccídeos. Com *S. neurona* Dubey et al. (2002) observaram eficácia na inativação de oocistos com o uso do Hidróxido de Amônia em sua concentração absoluta (29,9%) e quando tratados a temperaturas entre 55°C e 70°C. No presente estudo a amônia não foi eficaz, mas a diluição utilizada foi de 10% e à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

Dubey et al. (1998) observaram o efeito de temperaturas (de -10°C a 70°C) por diferentes períodos sobre oocistos esporulados de *T. gondii* mantidos em solução aquosa. Observaram que temperaturas abaixo de 35°C mantêm a infectividade desses oocistos por longos períodos e somente acima de 35°C começaram a perder a capacidade de infecção. No presente estudo, apesar do tempo máximo de exposição ter sido de apenas 6 horas, temperaturas de até 20°C negativos não inviabilizaram os oocistos. Em regiões tropicais e sub-tropicais, como o Brasil, nas quais estas temperaturas são raramente atingidas, oocistos esporulados de *N. caninum* provavelmente se mantenham viáveis no ambiente, mesmo após noites bastante frias e de geadas.

Por outro lado o tratamento com temperatura de 60°C por 1 minuto também não inviabilizou os oocistos de *N. caninum*, diferentemente do que foi constatado por Dubey (1998) que com o mesmo tratamento (60°C por 1 minuto) observou que oocistos esporulados de *T. gondii* tornavam-se inativos, o mesmo ocorrendo com temperatura de 50°C por 2hs ou 55°C por 2 minutos. Estes resultados reforçam a importância do uso de fonte de calor como água em ebulição (100°C) ou vassoura de fogo na limpeza de instalações e equipamentos para o controle de oocistos de coccídeos.

Também é interessante comentar que para *T. gondii*, a temperatura de 35°C por 62 dias inativou oocistos esporulados desse agente. No presente estudo tratamentos que utilizassem períodos longos de exposição não foram realizados, mas observando-se diferenças entre a viabilidade desses coccídeos ao mesmo tratamento, como anteriormente comentado, seria importante testar temperaturas que facilmente são observadas em nosso país no ambiente, como 30-35°C e por períodos de tempo mais longos.

Em relação aos desinfetantes é importante observar que dificilmente é possível deixar que estes possam agir sobre as formas infectantes presentes no ambiente por períodos de tempo muito longos e sob a mesma concentração. Os animais nem sempre podem ser removidos do local, alguns desinfetantes, nas dosagens que poderiam ter maior eficácia, são irritantes ou tóxicos, além de não ser prático e fácil a obtenção da diluição desejada, isso porque muitos já são vendidos diluídos, prontos para o uso. Estes podem ser mais recomendados para lavagem de equipamentos e pequenas instalações, sendo importante atentar-se para o tempo de exposição. Neste estudo somente o hipoclorito de sódio 10% por 1 hora mostrou-se eficaz, entretanto o mesmo desinfetante não foi testado em tempos e concentrações menores. Comparando os resultados obtidos com estudos utilizando oocistos de coccídeos, os de *N. caninum* se comportaram de forma semelhante aos de *T. gondii* (DUBEY e BEATTIE, 1988) e de *S. neurona* (Dubey et al., 2002b), isto é, resistentes à maioria dos desinfetantes e concentrações testadas.

Estes resultados confirmam a resistência das formas infectantes dos coccídeos no ambiente e indicam ser temperaturas de 100°C por 1 minuto e hipoclorito de sódio a 10% por 1 hora ferramentas eficazes no controle de oocistos esporulados de *N. caninum* no ambiente.

6 CONCLUSÕES

Tratamento de oocistos de *Neospora caninum* com hipoclorito de sódio a 10% durante 1 hora a temperatura ambiente e tratamento físico com temperatura de 100°C por 1 minuto inviabilizaram os oocistos, podendo ser utilizados como forma de controle de oocistos em ambientes.

REFERÊNCIAS

- BARBER, J. S.; VAN HAM, L.; POLIS, I.; TREES, A. J. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in Belgian dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 38, p. 15-16, 1997.
- 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.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M. C.; HILL, D. E.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K.; DUBEY, J. P. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of naturally infected dog. **Journal of Parasitology**, v.87, n.3, p.612-618, 2001.
- BELLI, S. I.; SMITH, N. C.; FERGUSON, D. J. P. The coccidian oocyst: a tough nut to crack. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 416-423, 2006.
- BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst- forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 70, p. 271-274, 1984.
- BJÖRKMAN, C.; JOHANSSON, O.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O. J. M.; UGGLA, A. *Neospora* species infection in a herd if dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 208, p. 1441-1444, 1996.
- BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1497-1507, 1999.
- BOYD, S. P.; BARR, P. A.; BROOKS, H. W.; ORR, J. P. Neosporosis in a young dog presenting with dermatitis and neuromuscular signs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 46, p. 85-88, 2005.
- BUXTON, D.; MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 12, p. 546-552, 2002.

CAÑON- FRANCO, W. A.; YAI, L. E. O.; JOPPERT, A. M.; SOUSA, C. E.; D'AURIA, S. R. N.; DUBEY, J. P.; GENNARI S. M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in the rodent capybara (*Hydrochoeris hydrochoeris*) from Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 850, 2003.

CAVALCANTE, G. T.; MONTEIRO, R. M.; SOARES, R. M.; NISHI, S. M.; ALVES NETO A. F.; GENNARI, S. M. Shedding of oocysts by dogs fed different tissues from naturally *Neospora caninum* infected bovines. In: **ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF PARASITOLOGISTS**, 83. Arlington, Texas. **Abstracts...** Texas: AAP, 2008. p. 80.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.; MIRÓ, G.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; PEREIRA-BUENO, J.; FRISUELOS, C.; ORTEGA-MORA, L. M. Seroprevalence and risk factors associated with *Neospora caninum* infection in different dog populations in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 148-151, 2008.

CORBELLINI, L. G.; SMITH, D. R.; PESCADOR, C. A.; SCHMITZ, M.; CORREA, A.; STEFFEN, D. J.; DRIEMEIER, D. Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 74, p.130-141, 2006.

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, 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, p. 325–332, 1992.

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

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, p. 99-104, 2002.

DUBEY, J. P. Long- term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 6, p.910-913, 1988.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of animals and man**, 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 American Veterinary Medical Association**, v. 193, p. 1269-1283, 1988a.

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 American Veterinary Medical Association**, v. 193, p.1259-1263, 1988b.

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

DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. **Journal of Parasitology**, v. 84, n.4, p. 862-865, 1998.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. **Parasitology Research**, v. 86, p. 165-168, 2000.

DUBEY, J. P.; HILL, D. E.; LINDSAY, D. S.; JENKINS, M. C.; UGGLA, A.; SPEER, C. *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* are separate species. **Trends in Parasitology**, v. 18, n.2, p. 66-69, 2002a.

DUBEY, J. P.; SAVILLE, W. J.; SREEKUMAR, C.; SHEN, S. K.; LINDSAY, D. S.; PENA, H. F.; VIANNA, M. C.; GENNARI, S. M.; REED, S. M. Effects of high temperature and disinfectants on the viability of *Sarcocystis neurona* sporocysts. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 6, 2002b.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007.

DUMETRE, A.; DARDE, M. L. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? **Fems Microbiology Reviews**, v. 27, n. 5, p. 651-661, 2003.

FERNANDES, B. C. T. M.; GENNARI, S. M.; SOUZA, S. L. P.; CARVALHO, J. M.; OLIVEIRA, W. G.; CURY, M. C. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from urban, peri-urban and rural areas of the city of Uberlândia, Minas Gerais – Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 33-40, 2004.

FERROGLIO, E.; PASINO, M.; RONCO, F.; BENA, A.; TRISCIUOGGIO, A. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in urban and rural dogs in north-west Italy. **Zoonoses Public Health**, v. 54, p. 135-139, 2007.

FRENKEL, J. K.; RUIZ, A.; CHINCHILLA, M. Soil survival of *Toxoplasma gondii* in Kansas and Costa Rica. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 24, p. 439-443, 1975.

FUNADA, M. R.; PENA, H. F. J.; SOARES, R. M.; AMAKU, M.; GENNARI, S. M. Frequência de parasitos gastrintestinais em cães e gatos atendidos em hospital-escola veterinário da cidade de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 1338-1340, 2007.

GENNARI, S. M.; YAI, L. E. O.; D'ÁURIA, S. N. R.; CARDOSO, S. M. S.; KWOK, O. C. H.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p. 177-179, 2002.

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

GOMEZ-COUSO, H.; FONTAN-SAINZ, M.; FERNANDEZ-ALONSO, J.; ARES-MAZAS, E. Excystation of *Cryptosporidium parvum* at temperatures that are reached during solar water disinfection. **Parasitology**, v. 136, p. 393-399, 2009.

GONDIM, L. F. P.; SAEKI, S.; ONAGA, H.; HARITANI, M.; YAMANE, I. Maintenance of *Neospora caninum* tachyzoites using Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). **New Zealand Veterinary Journal**, v. 47, p. 36, 1999.

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, p. 1–7, 2001.

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

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

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

GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M. M.; GAO, L. Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 134, p. 22-29, 2005.

GUIMARÃES, J. S.; SOUZA, S. L. P.; BERGAMASCHI, D. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle in the north of Paraná state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 124, p. 1-8, 2004.

GUIMARÃES JÚNIOR, J. S.; BOGADO, A. L. G.; CUNHA, T. C. B.; GARCIA, J. L. Avaliação *in vitro* da eficácia de desinfecção sobre oocistos não esporulados de *Eimeria tenella* isolados de frangos de corte. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, p. 67-71, 2007.

JESUS, E. E. V.; SANTOS, P. O. M.; BARBOSA, M. V. F.; PINHEIRO, A. M.; GONDIM, L. F. P.; GUIMARÃES, J. E.; ALMEIDA, M. A. O. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães nos municípios de Salvador e Lauro de Freitas, Estado da Bahia-Brasil. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 43, p. 5-10, 2006.

KANG, S. W.; PARK, S. S.; CHOE, S. E.; JEAN, Y. H.; JUNG, S. C.; KIM, K.; QUYEN, D. V. Characterization of tissue distribution and histopathological lesions in

Neospora caninum experimentally infected gerbils. **Parasitology Research**, v. 104, p. 1261-1268, 2009.

KIM, J. H.; KANG, M. S.; LEE, B. C.; HWANG, W. S.; Lee, C. W.; SO, B. J.; DUBEY, J. P.; KIM, D. Y. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs and raccoon dogs in Korea. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 41, p. 243-245, 2003.

LINDSAY, D. S.; UPTON, S. J.; DUBEY, J. P. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1521-1523, 1999a.

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

LINDSAY, D. S.; COLLINS, M. V.; MITCHELL, S. M.; COLE, E. A.; FLICK, G. J.; WETCH, C. N.; LINDQUIST, A.; DUBEY, J. P. Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in seawater. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 687-688, 2003.

LINTON, A. H.; HUGO, W. B.; RUSSELL, A. D. (Ed.). Disinfection in veterinary and farm animal practice. Oxford: **Blackwell Scientific**, 1987. 179 p.

MALMASI, A.; HOSSEININEJAD, M.; HADDADZADEH, H.; BADDI, A.; BAHONAR, A. Serologic study of anti- *Neospora caninum* antibodies in household dogs and dogs living in dairy and beef cattle farms in Tehran, Iran. **Parasitology Research**, v. 100, p. 1143-1145, 2007.

MCALLISTER, M. M.; HUFFMAN, E. M.; HIETALA, S. K.; CONRAD, P. A.; ANDERSON, M. L.; SALMAN, M. D. Evidence suggesting a point source in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, p. 355-357, 1996.

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 for Parasitology**, v. 28, p. 1473-1478, 1998. Supplement 9.

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

MENDEZ-HERMIDA, F.; CASTRO-HERMIDA, J. A.; ARES-MAZAS, E.; KEHOE, S. C.; MCGUIGAN, K. G. Effect of batch-process solar disinfection on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in drinking water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p.1653-1654, 2005.

MILLS, B. Immunohistochemistry. In: PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. (Ed.) **Laboratory methods in histotechnology**. Washington: AFIP, 1992. Cap. 23, p. 247-255.

MONTEIRO, R. M.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; SOUZA, S. O.; RICHTZENHAIN, L. J.; SOARES, R. M. Differential diagnosis of oocysts of Hammondia-like organisms of dogs and cats by PCR-RFLP analysis of 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. **Parasitology Research**, v. 103, p. 235-238, 2007.

MONTEIRO, R. M.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; SOUSA, S.O.; RICHTZENHAIN, L. J.; SOARES, R. M. Differential diagnosis of oocysts of Hammondia-like organisms of dogs and cats by PCR-RFLP analysis of 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. **Parasitology Research**, v. 103, p. 235-238, 2008.

MORAES, C. C. G.; MEGID, J.; PITUCO, E. M.; OKUDA, L. H.; DEL FAVA, C.; DE STEFANO, E.; CROCCI, A. J. Ocorrência de anticorpos anti- *Neospora caninum* em cães da microrregião da serra de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 1-6, 2008.

PARADIES, P.; CAPELLI, G.; TESTINI, G.; CANTACESSI, C.; TREES, A. J.; OTRANTO, D. Risk factors for canine neosporosis in farm and kennel dogs in southern Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 240-244, 2007.

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

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

PATITUCCI, A. N.; PÉREZ, M. J.; ROZAS, M. A.; ISRAEL, K. F. Neosporosis canine: detection of sera antibodies in rural and urban canine population of Chile. **Arquivos de Medicina Veterinária**, v. 33, p. 227-232, 2001.

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, p. 61-66, 2007.

PINHEIRO, S. R. **Avaliação da atividade micobacteriana de desinfetantes químicos sobre estirpes de *Mycobacterium avium*, isolados de suínos abatidos no Estado de Santa Catarina, no ano de 1999**. 2001. 93 f. Tese (Livre- Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

ROCHELLE, P. A.; UPTON, S. J.; MONTELONE, B. A.; WOODS, K. The response of *Cryptosporidium parvum* to UV light. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 81-87, 2005.

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, p. 139-150, 2004.

ROSA, C.; KASAI, N.; SOUZA, S. L. P.; GUERRA, J. L.; GENNARI, S. M. Comparação das técnicas de imuno-histoquímica e bioensaio em camundongos para pesquisa de *Toxoplasma gondii* em tecidos de caprinos experimentalmente inoculados. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 1, p. 13-17, 2001.

RUBIN, J. Agents for disinfection and control of tuberculosis. IN: BLOCK, S. S. (Ed.). **Disinfection, sterilization and preservation**. 3. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1983. P. 414-441.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning** – a laboratory manual. 2. ed. [USA] : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1886 p.

SAWADA, M.; PARK, C. H.; KONDO, H.; MORITA, T.; SHIMADA, A.; YAMANE, I.; UMEMURA, T. Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60, p. 853-854, 1998.

SCHARES, G.; PETERS, M.; WURM, R.; BÄRWALD, A.; CONRATHS, F.J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. **Veterinary Parasitology**, v. 80, p. 87-98, 1998.

SCHARES, G.; DUBREMETZ, J.F.; DUBEY, J.P.; BÄRWALD, A.; LOYENS, A.; CONRATHS, F. J. *Neospora caninum*: Identification of 19-, 38-, and 40-kDa surface antigens and a 33-kDa dense granule antigen using monoclonal antibodies. **Experimental Parasitology**, v. 92, p. 109-119, 1999.

SCHARES, G.; RAUSER, M.; SÖNDGEN, P.; REHBERG, P.; BÄRWALD, A.; DUBEY, J. P.; EDELHOFER, R.; CONRATHS, F. J. Use of purified tachyzoite surface antigen p38 in an ELISA to diagnose bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1123-1130, 2000.

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

SHARMA, S.; BAL, M .S.; MEENAKSHI K. K.; SANDHU, K. S.; Dubey, J. P. Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs in India. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 1, p. 303-304, 2008.

SOARES, R. M.; CORTEZ, R. L. P. B; GENNARI, S. M.; SERCUNDES, M. K; KEID, L. B; PENA, H. F. J. Crab- eating fox (*Cerdocyon thous*), a South American canid, as a definitive host for *Hammondia heydorni*. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 46-50, 2009.

SPAULDING, E. H.; CUNDY, K. R.; TURNER, F. J. Chemical disinfection of medical and surgical materials. In: BLOCK, S. S. (Ed.) **Disinfection, sterilization and preservation**. 2. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 654-684. 1977.

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, 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, p. 73-76, 2005a.

TIEMANN, J. C. H.; RODRIGUES, A. A. R.; SOUZA, S. L. P.; DUARTE, J. M. B.; GENNARI, S. M. Occurrence of anti- *Neospora caninum* antibodies in Brazilian cervids kept in captivity. **Veterinary Parasitology**, v. 129, p. 341-343. 2005b.

TREES, A.; MCALLISTER, M.; GUY, C.; MCGARRY, J.; SMITH, R.; WILLIAMS, D. *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 147-154, 2002.

UZEDA, R. S.; COSTA, K. S.; SANTOS, S. L.; PINHEIRO, A. M.; ALMEIDA, M. A. O.; MCALLISTER, M. M.; GONDIM, L. F. P. Loss of infectivity of *Neospora caninum* oocysts maintained for a prolonged time. **Korean Journal of Parasitology**, v. 45, p. 295- 299, 2007.

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, p. 253-257, 2005.

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

WAPENAAR, W.; JENKINS, M. C.; HANDLEY, R. M. O.; BARKEMA, H. W. *Neospora caninum*-like oocysts observer in feces of free-ranging Red Fox (*Vulpes vulpes*) and coyotes (*Canis latrans*). **Journal of Parasitology**, v.92, n. 6, p. 1270-1274, 2006.

WAINWRIGHT, K. E.; LAGUNAS-SOLAR, M.; MILLER, M. A.; BARR, B. C.; GARDNER, I. A.; PINA, C.; MELLI, A. C.; PACKHAM, A. E.; ZENG, N.; TRUONG, T.; CONRAD, P. A. Physical inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. **American Society for Microbiology**, v. 73, p. 5663- 5666, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on disinfection in animal husbandry for prevention and control of zoonotic diseases**. Geneva. WHO, 1984. 49 p. (WHO/ VPH/ 84.4).

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

YAI, L. E. O.; RAGOZO, A. M. A.; CAÑON-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.