Luiz Ricardo Paes de Barros Cortez

**Estudo sobre a participação do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*)
como hospedeiro definitivo de organismos da sub-família
toxoplasmatinae**

São Paulo
2008

Luiz Ricardo Paes de Barros Cortez

**Estudo sobre a participação do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*)
como hospedeiro definitivo de organismos da sub-família
toxoplasmatinae**

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 Medicina Veterinária

Departamento:
Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:
Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:
Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares

São Paulo
2008

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.2087
FMVZ

Cortez, Luiz Ricardo Paes de Barros

Estudo sobre a participação do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) como hospedeiro definitivo de organismos da sub-família toxoplasmatinae / Luiz Ricardo Paes de Barros Cortez. – São Paulo : L. R. P. B. Cortez, 2008.

77 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.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares.

1. Cachorro-do-mato. 2. *Neospora caninum*. 3. *Hammondia heydorni*. 4. Hospedeiro definitivo. 5. Oocisto. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da possível participação do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) na cadeia epidemiológica do *Neospora caninum* como hospedeiro definitivo", protocolo nº783/2005, utilizando 04 (quatro) carrochos-do-mato, 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 "ad referendum".

(We certify that the Research "Study of the possible role of *Cerdocyon thous* in the epidemiological chain of *Neospora caninum* as a definitive host", protocol number 783/2005, under the responsibility of Profa. Dra. Solange Maria Gennari, utilizing 04 (four) *Cerdocyon thous*, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 06 de dezembro de 2005.

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da participação do cachorro-domato (*Cerdocyon thous*) na cadeia epidemiológica do *Neospora caninum* e da *Hammondia heydorni*", protocolado sob o nº1084/2007, utilizando 7 (sete) cães e 5 (cinco) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, 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 "ad referendum".

(We certify that the Research "Study of the participation of crab eating fox (*Cerdocyon thous*) in the epidemiologic chain of *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni*", protocol number 1084/2007, utilizing 7 (seven) dogs and 5 (five) bovines, under the responsibility Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting.

São Paulo, 29 de junho de 2007

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CORTEZ, Luiz Ricardo Paes de Barros

Título: Estudo sobre a participação do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) como hospedeiro definitivo de organismos da sub-família toxoplasmatinae

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 Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

*Com muito amor à minha esposa Danyele e aos
meus filhos Júlia e Lucas.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

***À minha esposa e companheira Dany.
Pelo apoio, carinho, compreensão e amor
recebidos, pelas condições criadas para
que eu pudesse estudar e pela motivação e
força.***

***Ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, pelos
conhecimentos transmitidos com paciência,
dedicação e bom humor, e acima de tudo pela
amizade.***

***Aos meus pais pelo exemplo, amor, dedicação, e em especial à minha mãe
pelo apoio e empolgação.***

***Aos meus filhos Júlia e Lucas pelo amor e pela imensa alegria e motivação que
me oferecem.***

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Solange Maria Gennari pelo apoio e exemplo de dedicação à ciência.

À Hilda, Renata e Guacyara pela grande ajuda nos laboratórios e pela amizade.

Ao João, Ni e Sr. Antônio pela dedicada ajuda e carinho com os cachorros-domato e pela recepção amistosa no VPS de Pirassununga.

Ao amigo Wagner Sato Ushikoshi pelo acolhimento em sua casa durante as disciplinas, pelas longas conversas e pela amizade.

À psicóloga Rosane pelo profissionalismo que me ajudou a lutar por meus ideais.

Ao amigo Tonhão, pela valiosa ajuda prestada ao permitir a colheita de amostras bovinas em sua propriedade.

Ao proprietário do frigorífico FRIMONDELLI, Genaro Mondelli, por ter, gentilmente autorizado o acompanhamento do abate e a colheita de tecidos bovinos.

Ao Parque Ecológico São Carlos e ao Zoológico de Guaíra por ceder os cachorros-do-mato.

Ao fotógrafo Rodrigo Z. Damiano por ceder os direitos de imagem da foto do cachorro-do-mato no Parque Ecológico São Carlos

À Lélia do IBAMA de Bauru pela ajuda com os cachorros-do-mato.

Aos amigos e professores da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, Lauris e Conti pelo apoio.

À biblioteca da FMVZ-USP, em especial à Elza pela ajuda.

Às “raposinhas” que participaram dos experimentos.

*“Os problemas significativos que enfrentamos não podem ser resolvidos
no mesmo nível de pensamento em que estávamos quando os criamos.”*

Albert Einstein

RESUMO

CORTEZ, L. R. P. B. **Estudo sobre a participação do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) como hospedeiro definitivo de organismos da sub-família toxoplasmatinae.** [Study of crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) as a definitive host for organisms belonging to sub-family Toxoplasmatinae]. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Neospora caninum e *Hammondia heydorni* são coccídeos formadores de cistos proximamente relacionados com outros organismos heteroxenos pertencentes ao filo Apicomplexa, como *Toxoplasma gondii* e *Hammondia hammondi*. Para saber se o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), um canídeo silvestre comumente encontrado do nordeste da Argentina ao nordeste da América do Sul, pode ser hospedeiro definitivo de *N. caninum*, exemplares de cachorro-do-mato foram alimentados com tecidos de bovinos e bubalinos naturalmente infectados por *N. caninum*. As fezes dos cachorros-do-mato foram colhidas e examinadas diariamente para pesquisa de oocistos. No primeiro experimento, masseter e cérebro (peça inteira dos dois órgãos) colhidos de dois bovinos de aproximadamente dois anos de idade, foram picados, misturados e fornecidos às quatro raposas em dois dias consecutivos. Duas raposas eliminaram oocistos sub-esféricos não esporulados medindo 10-13µm no oitavo e nono dias pós-infecção, respectivamente. Uma das raposas eliminou oocistos por cinco e a outra nove dias. Amostras de DNA extraída dos de oocistos de cada dia de eliminação foram analisadas por PCR com primers grupo-específicos PCR-ITS-1 e espécie-específicos Nc5-NPCR. Todas as amostras foram positivas por PCR-HSP-70 e PCR-ITS-1, mas negativas por Nc5-NPCR. A sequência de nucleotídeos PCR-ITS-1 revelou 100% de identidade com seqüências homólogas de *H. Heydorni*. Concluimos que *H. heydorni* também utiliza o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) como hospedeiro definitivo. O cachorro-do-mato é usualmente reportado em contato com rebanhos em diversas regiões do Brasil. Então, é razoável inferir que estes carnívoros possam exercer um importante papel nos ciclos silvestre e doméstico da

infecção por *H. heydorni*. Em um segundo experimento, sete exemplares de cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) foram alimentados com tecidos de 3 búfalos (*Bubalus bubalis*) naturalmente infectados por *N. caninum*. As fezes das raposas foram analisadas 30 dias antes e trinta depois da infecção experimental e nenhuma das raposas eliminou oocistos *N. caninum*-like nas fezes. Estes resultados sugerem que o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) não é hospedeiro definitivo de *N. caninum*, entretanto estudos adicionais são necessários.

Palavras-chave: Cachorro-do-mato. *Neospora caninum*. *Hammondia heydorni*. Hospedeiro definitivo.

ABSTRACT

CORTEZ, L. R. P. B. **Study of crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) as a definitive host for organisms belonging to sub-family Toxoplasmatinae**

[Estudo sobre a participação do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) como hospedeiro definitivo de organismos da sub-família toxoplasmatinae]. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Neospora caninum and *Hammondia heydorni* are two cyst forming coccidians closely related to other apicomplexans, such as *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* with a two host life-cycle. To clarify whether crab-eating fox (*Cerdocyon thous*), a wild carnivore commonly found from northern Argentina to northern South America, can be final hosts of *N. caninum*, foxes were fed on tissues of cows and water buffaloes naturally infected with *N. caninum*. Faeces were examined from 30 days before to 30 days after infection. In experiment 1, the whole masseter muscle and brain from two-year old bovines are collected, minced and pooled together for the fox infection. The bovine pooled tissues were equally administered for four fox, in two consecutive days. Two foxes shed unsporulated oocysts subspherical in shape measuring 10-13µm, after eight and nine days post-infection, respectively. One of the foxes eliminated oocysts for five days, while the other fox shed oocysts for nine days. A DNA sample of oocysts detected at each day of oocyst elimination was tested by a PCR carried out employing primers directed to the common toxoplasmatiid 18S and 5.8S coding genes (PCR-ITS-1). These samples were also submitted to a *N. caninum* specific gene (Nc-5nPCR). All of them were positive by PCR-ITS-1 and negative by Nc-5nPCR. The PCR-ITS-1 nucleotide sequence revealed 100% identity with homologous sequences of *H. heydorni*. In conclusion, it is clear that *H. heydorni* also uses the crab-eating fox as a definitive host. The crab-eating fox is usually reported to live in close contact with livestock in several regions of Brazil. Therefore it is reasonable to infer that such carnivores may play an important role in the sylvatic and domestic cycles of *H. heydorni* infection.

In experiment 2, seven fox consumed tissues from three *N. caninum* naturally infected water buffaloes. Faeces were examined from 30 days before to 30 days

after infection and none fox shed *N. caninum*-like oocysts. These results suggest that the crab-eating fox cannot be definitive host of *N. caninum*; however additional studies will be necessary.

Key-words: Crab-eating fox. *Neospora caninum*. *Hammondia heydorni*. Definitive host.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	<i>Cerdocyon thous</i> em recinto do Parque Ecológico de São Carlos.....	34
Figura 2 -	Distribuição de <i>Cerdocyon thous</i> na América do Sul. Fonte: Berta, 1982.....	35
Figura 3 e 4 -	Oocistos sub-esféricos (n=100) observados em solução de sacarose em microscopia de campo claro com aumento de 1000 x mediram 11,39-14,39 (12,85 ± 0,62) µm por 10,97-13,36 (12,25 ± 0,60) µm.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Ocorrência de anticorpos anti- <i>N. caninum</i> em diferentes espécies de animais silvestres brasileiros e método de diagnóstico utilizado.....	28
Tabela 2 -	Primers utilizados.....	46
Tabela 3 -	Eliminação de oocistos de <i>Hammondia heydorni</i> por cachorros-do-mato alimentados com tecidos de bovinos naturalmente infectados	55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Análise morfométrica de oocistos não esporulados em solução de sacarose: comprimento e largura	57
Gráfico 2 -	Análise morfométrica de oocistos não esporulados em solução de sacarose: proporção comprimento-largura	57

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
FMVZ-USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP
G	Grama
G	gravidade terrestre
HCl	ácido clorídrico
HSP	proteína do choque térmico
ITS	espaço interno transcrito
KO	Knockout
KCl	cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	fosfato de potássio monobásico anidro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mL	Mililitro
M	Molar
µm	Micrômetro
mM	Milimolar
MB	monócito bovino
NaCl	cloreto de sódio
Na ₂ HPO ₄	fosfato de sódio dibásico anidro
Na ₂ H ₂ PO ₄	fosfato de sódio monobásico anidro
PB	par de bases
PBS	solução salina tamponada
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
q.s.p.	quantidade suficiente para
RFLP	polimorfismo de fragmentos gerados por enzimas de restrição
SDS	dodecil sulfato de sódio
TE	tampão Tris-EDTA
TBE	tampão Tris- borato-EDTA
USP	Universidade de São Paulo
VPS	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
v/v	volume a volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
1.1	<i>NEOSPORA CANINUM</i>	23
1.1.1	Sintomatologia da Neosporose.....	24
1.1.2	Epidemiologia da Neosporose.....	25
1.1.3	Ciclo Biológico.....	30
1.2	<i>HAMMONDIA HEYDORNI</i>	32
1.3	<i>CERDOCYON THOUS</i>	34
2	OBJETIVO.....	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1	EXPERIMENTO 1	38
3.1.1	Animais.....	38
3.1.2	Infecção experimental.....	39
3.1.3	Detecção de anticorpos anti-N. caninum em soros de canídeos e bovinos.....	40
3.1.3.1	Preparo da RIFI.....	40
3.1.3.2	Reação de Imunofluorescência Indireta em amostras de soro colhidas dos bovinos.....	41
3.1.3.3	Reação de Imunofluorescência Indireta em amostras de soro colhidas dos Cachorros-do-mato.....	42
3.1.4	Detecção e mensuração de oocistos nas fezes.....	42
3.1.5	Detecção e Identificação de DNA de parasitas em oocistos e em tecidos dos hospedeiros.....	43
3.1.5.1	Extração de DNA de oocistos.....	43

3.1.5.2	Extração de DNA de tecidos.....	44
3.1.5.3	PCR.....	45
3.1.5.4	Detecção do Produto Amplificado.....	48
3.1.5.5	Seqüenciamento.....	48
3.2	EXPERIMENTO 2.....	50
3.2.1	Animais.....	50
3.2.2	Infecção experimental.....	51
3.2.3	Detecção de anticorpos anti-N. caninum em soros de bubalinos e canídeos.....	52
3.2.3.1	Preparo da RIFI.....	52
3.2.3.2	Reação de Imunofluorescência Indireta em amostras de soro colhidas dos bubalinos.....	52
3.2.3.3	Reação de Imunofluorescência Indireta em amostras de soro colhidas dos Cachorros-do-mato.....	53
3.2.4	Detecção de oocistos nas fezes.....	53
3.2.5	Detecção e Identificação de DNA de parasitas em oocistos e em tecidos dos hospedeiros.....	53
4	RESULTADOS.....	54
4.1	EXPERIMENTO 1.....	54
4.2	EXPERIMENTO 2.....	58
5	DISCUSSÃO.....	60
6	CONCLUSÕES.....	63
	REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

Neospora caninum e *Hammondia heydorni* são protozoários classificados no filo Apicomplexa, família Sarcocystidae e sub-família Toxoplasmatinae que é composta por quatro gêneros: *Toxoplasma* (uma espécie), *Neospora* (duas espécies), *Hammondia* (duas espécies) e *Besnoitia* (seis espécies) (TENTER; JOHNSON, 1997).

O filo apicomplexa é composto por organismos de vida parasitária que possuem em comum uma estrutura intracelular composta por organelas especializadas denominada complexo apical (LEVINE, 1970). O complexo apical está vinculado à invasão de parasita na célula do hospedeiro (SOLDATI et al., 2001; TOMLEY et al., 2001).

H. heydorni é considerado um protozoário que usualmente utiliza canídeos como hospedeiros definitivos e com raras manifestações clínicas da infecção (DUBEY; WILLIAMS, 1980).

Pouco se sabe sobre o ciclo de vida de *H. heydorni*, exceto que é um coccídeo heteroxeno obrigatório (DUBEY et al., 2002a).

N. caninum apresenta distribuição mundial e a infecção já foi relatada nos cinco continentes (DUBEY, 1999).

A neosporose, doença causada pelo protozoário *N. caninum*, é freqüente causa de abortamento no mundo todo (DUBEY, 1999).

A doença pode causar abortamento em bovinos de leite e corte, sendo apontada como a maior causa de abortamentos em rebanhos leiteiros na Califórnia (ANDERSON et al., 1991).

As perdas econômicas decorrentes da neosporose para a indústria leiteira da Califórnia são próximas de 35 milhões de dólares por ano (ANDERSON et al., 1995; DUBEY, 2003).

O cão (*Canis familiaris*) e o coiote (*Canis latrans*) são os únicos hospedeiros definitivos conhecidos que excretam oocistos resistentes no meio ambiente (McALLISTER et al., 1988; BASSO et al., 2001a; GONDIM et al., 2004b).

A presença de anticorpos anti-*N. caninum* foi reportada em diversas espécies domésticas e silvestres (DUBEY, 2003b). Em 2004, Cañón-Franco et al. relataram, no Brasil, a presença desses anticorpos nas espécies silvestres: *Cerdocyon thous*, *Lycalopex gymnocercus* e *Dusicyon vetulus*.

1.1 NEOSPORA CANINUM

Neospora caninum é um protozoário coccídeo primeiramente reconhecido como agente etiológico de encefalomielite em cães na Noruega. Os autores encontraram parasitas de morfologia semelhante ao *Toxoplasma gondii* em lesões de cérebro e músculos, mas não detectaram anticorpos anti-*T. gondii* nas amostras de soros dos cães e nem resposta no bioensaio em camundongos (BJERKÅS et al., 1984). Em 1991, Bjerkås e Dubey confirmaram, por imunoistoquímica, que esses parasitas eram *N. caninum*.

O parasita foi descrito em 1988 por Dubey et al., neste mesmo ano, quando o autor desenvolveu um teste sorológico capaz de distingui-lo do *Toxoplasma gondii*. Posteriormente, um estudo retrospectivo realizado com amostras de tecidos de cães, conservadas desde 1975, demonstrou que *N. caninum* não se tratava de um agente novo (DUBEY et al., 1988b).

A neosporose, doença causada pelo *N. caninum* é responsável por abortamentos em bovinos em todas as partes do mundo (LINDSAY, 1996; DUBEY, 1999).

A participação do cão na epidemiologia da neosporose, como hospedeiro definitivo, foi descrita em 1998 por McAllister e colaboradores.

1.1.1 Sintomatologia da neosporose

Embora a neosporose em cães ocorra normalmente na forma sub-clínica, filhotes de ninhadas infectadas congenitamente podem sobreviver durante meses apresentando paresia progressiva, principalmente em membros posteriores, e ainda apresentar miocardites, dificuldade de deglutição, paralisia da mandíbula, cegueira, convulsões, incontínências urinária e fecal, flacidez e atrofia muscular (LINDSAY et al., 1999).

Cães de qualquer idade podem apresentar dermatites e úlceras cutâneas, mas essas são mais freqüentes em adultos (DUBEY; LINDSAY, 1996; BOYD et al., 2005).

A predisposição de raça e sexo não é conhecida, porém casos clínicos vêm sendo descritos com maior freqüência em cães das raças Labrador, Boxer, Greyhound, Golden retriever e Basset hound (DUBEY; LINDSSAY, 1996).

Em bovinos, normalmente as infecções também são sub-clínicas, a doença clínica pode ocorrer em infecções fetais ou congênitas com manifestações neurológicas como ataxia, deficiência na propriocepção, paresia de membros posteriores e anteriores e hidrocefalia. Além disso, fraqueza, baixo peso e crescimento retardado (DUBEY, 1999).

A manifestação mais observada em vacas é o abortamento. A ocorrência pode ser endêmica ou epidêmica (WOUDA et al., 1999a).

O *N. caninum* foi reconhecido como o principal causador de aborto em bovinos leiteiros da Califórnia em 1991 (ANDERSON et al., 1991).

Tanto em rebanhos leiteiros quanto de corte, o *N. caninum* causa aborto em vacas a partir do terceiro mês de gestação e mais freqüentemente no quinto e sexto mês. Os fetos podem morrer no útero, sendo reabsorvidos, mumificados, autolisados, natimortos, nascidos vivos com sintomas ou clinicamente normais, mas cronicamente infectados (DUBEY, 1999). Em animais silvestres existem poucos relatos sobre a sintomatologia da neosporose.

Foi relatada a presença de meningoencefalomielite em filhote de veado (*Dama dama*) (SOLDATI et al., 2004), miocardite em rinoceronte (*Ceratotherium simum*) (WILLIAMS et al., 2002).

Chavez-Velasquez et al. (2004) em um estudo feito com fetos abortados de alpacas (*Vicugna pacos*) e lhamas (*Llama glama*) relacionaram a presença de *N. caninum* com os abortamentos.

1.1.2 Epidemiologia da neosporose

A identificação da gama de hospedeiros e o conhecimento da distribuição geográfica são importantes para o entendimento da epidemiologia da neosporose (DUBEY et al., 2007).

Cães são hospedeiros definitivos do *Neospora caninum* (McALLISTER et al., 1998). Além dos cães, outros canídeos têm sido considerados potenciais hospedeiros definitivos do *Neospora caninum* (McALLISTER et al., 1999).

Dentre os carnívoros, além do cão (DUBEY 1999) e da raposa vermelha inglesa (*Vulpes vulpes*) (ALMERIA et al., 2002), Lemberger e colaboradores demonstraram o guaxinim (*Procyon lotor*) como hospedeiro intermediário de *N. caninum*.

Canídeos apresentam importância na epidemiologia da neosporose, especialmente após a descoberta da participação do coite como hospedeiro definitivo de *N. caninum* (GONDIM et al., 2004b).

O isolamento de *N. caninum* viáveis tem sido feito em vaca (*Bos taurus*), ovelha (*Ovis ovis*), búfalo (*Bubalus bubalis*), cervídeos (*Odocoileus virginianus*), além do cão (*Canis familiaris*). Outros hospedeiros como: raposa vermelha inglesa (*Vulpes vulpes*), guaxinim (*Procyon lotor*), antílope (*Tragelaphus imberbis*), cervídeos (*Odocoileus hemionus columbianus*, *Cervus eldi siamensis*, *Dama dama*), lhama (*Lama glama*), alpaca (*Vicugna pacos*) ratazana (*Rattus norvegicus*),

camundongo (*Mus musculus*), rinoceronte (*Ceratotherium simum*) e cabra (*Capra hircus*) também foram demonstrados por imunohistoquímica ou técnicas moleculares conforme relatado por Dubey (2007) em revisão sobre a epidemiologia da neosporose.

No Brasil, Gondim et al. (2001) realizaram o primeiro isolamento de *N. caninum* (Nc-Bahia) em um cão naturalmente infectado.

Locatelli-Dittrich et al. (2003) isolaram *N. caninum* em feto bovino em um rebanho leiteiro no estado do Paraná.

Pena et al. (2007) realizaram no Brasil, o isolamento de *N. caninum* em ovino naturalmente infectado. Neste estudo, dois cães foram alimentados com tecido cerebral de ovinos sorologicamente reagentes para *N. caninum*. Um dos cães eliminou oocistos não esporulados nas fezes. Oocistos foram então fornecidos via oral a gerbil e a *Calomys callosus*. O agente foi isolado em cérebro de gerbil através da identificação de cisto por técnica histológica. Foi detectada a presença de DNA de *N. caninum* em tecido cerebral de gerbil e *Calomys callosus*.

Diversos estudos sobre a prevalência de anticorpos contra *N. caninum* na espécie canina têm sido realizados em todo o mundo, sugerindo uma ampla distribuição do parasita.

Anticorpos foram encontrados em 121 de 320 (37,8%) cães na Argentina (BASSO et al., 2001b), 22% dos 200 cães na Nova Zelândia (REICHEL et al., 1998), 10% dos 150 cães na Turquia (COSKUN et al., 2000), 6,7% de 163 cães no Brasil (MINEO et al., 2001), 10% de 500 cães domiciliados e 25% de 611 cães errantes no Brasil (GENNARI et al., 2002), 6,4% de 1.058 cães na Itália (CRINGOLI et al., 2002), e 12.% de 120 urbanos e 26 % de 81 cães rurais no Chile (PATITUCCI et al., 2001). Klein e Müller (2001), 4% de 50 cães na Alemanha sem sinais clínicos e 13% de 200 cães sintomáticos, 21,6% de 134 cães de fazendas de gado no Paraná, Brasil (DE SOUZA et al., 2002).

Três levantamentos comparando a prevalência de anticorpos contra *N. caninum* em cães urbanos e rurais demonstram uma maior soroprevalência em áreas rurais, Sawada et al. (1998), Wouda et al. (1999b) e Basso et al. (2001b).

Os estudos de soroprevalência citados acima sugerem a existência de relação entre infecções em cães e bovinos.

Autores encontraram uma significativa diferença entre a prevalência de anticorpos em cães de áreas urbanas e de fazendas de gado.

Cañón-Franco et al. (2003a) encontraram prevalências de 8,3% e 12,6% para áreas urbana e rural, respectivamente, em um mesmo município no estado de Rondônia.

Bartels et al. (1999) observaram uma significativa associação entre a presença de cães nas propriedades e a ocorrência de abortamentos em bovinos. Esta associação também foi observada por Paré et al. (1998) e Mainar-Jaime et al. (1999) que quantificaram, respectivamente no Canadá e na Espanha, em sete vezes maior o risco de transmissão em propriedades com pelo menos um cão em relação a propriedades sem cães.

Guimarães Júnior et al. (2004) encontraram uma associação entre a presença de cães e prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em fazendas de gado leiteiro no norte do estado do Paraná.

De Souza et al. (2002) e Cañón-Franco et al. (2003a) encontraram aumento na prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* proporcional a idade dos animais, sugerindo a ocorrência de exposição pós-natal.

Estudos sorológicos realizados em diversas regiões, em diferentes espécies, sugerem a presença do *Neospora caninum*, no mundo todo, assim como a existência de um ciclo silvestre da neosporose (GONDIM, 2006).

Anticorpos contra *N. caninum* foram encontrados em coiotes norte americanos (*Canis latrans*), raposas-vermelhas inglesas (*Vulpes vulpes*) e dingos australianos (*Canis familiaris dingo*) (LINDSAY et al., 1996; BARBER et al., 1997; BUXTON et al., 1997).

Uma alta prevalência de anticorpos contra *N. caninum* foi encontrada (DUBEY et al., 1999) a partir de 400 amostras de soro de veado (*Odocoileus virginianus*).

No Brasil, diversos estudos mostram a soroprevalência em várias espécies em diferentes regiões (Tabela 1).

Tabela 1 - Ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em diferentes espécies de animais silvestres brasileiros e método de diagnóstico utilizado

Espécie	Examinados	Positivos (%)	Método	Referência
Canídeos	57	9 (15,8)	RIFI ($\geq 1:50$)	
<i>L. gymnocerus</i>	12	5 (41,7)		A
<i>C. thous</i>	15	4 (26,7)		A
<i>D. vetulus</i>	30	0		A
Marsupiais				
<i>D. marsupialis</i>	396	84 (21,2)	RIFI ($\geq 1:25$)	B
Roedores				
<i>H. hydrochaeris</i>	149	13 (8,7)	RIFI ($\geq 1:25$)	C
Cervídeos				
<i>Mazama SSP</i>	150	63 (42,0)	RIFI ($\geq 1:50$)	D
<i>O. bezoarticus</i>	39	15 (38,5)	RIFI ($\geq 1:50$)	D
	23	3 (13,0)		D
	16	12 (75,0)		D

(A) CAÑÓN-FRANCO et al., 2003b (B) YAI et al., 2003 (C) CAÑÓN-FRANCO et al., 2004 (D) TIEMANN et al., 2005

Yai et al. (2008) encontraram uma ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em 9,4% das capivaras (*H. hydrocharis*) examinadas no estado de São Paulo.

Anticorpos anti-*N. caninum* têm sido encontrados em canídeos selvagens brasileiros, entre eles o *Cerdocyon thous* (CAÑÓN-FRANCO et al., 2004), indicando que diversas espécies têm sido expostas ao *N. caninum*, sugerindo a necessidade de estudos sobre o papel destas na cadeia epidemiológica do coccídeo.

Vitaliano et al. (2004) investigou a ocorrência de anticorpos contra *N. caninum* em lobos-guará (*Chrysocyon Brachyurus*) mantidos em cativeiros e observou ocorrência de 8,5%.

A presença de animais domésticos tem sido apontada como fator de risco para a neosporose em animais silvestres.

Tiemann e colaboradores encontraram significativa diferença na ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em veados dos pampas (*Ozotoceros bezoarticus*) em

regiões com maior contato com animais domésticos, quando comparada com regiões mais conservadas (TIEMANN et al., 2005b).

Estudos têm relacionado o risco de exposição ao *N. caninum* com a presença de animais silvestres em fazendas de criação de gado.

Os resultados encontrados por Barling et al. (2000) sugerem um aumento no risco de exposição ao *N. caninum* em criações de gado de corte no Texas, relacionado à presença de canídeos silvestres, entre eles, coiotes (*Canis latrans*) e raposas cinzas (*Urocyon cinereoargenteus*).

Em 2004, foi demonstrada a participação do coioite (*Canis latrans*) na transmissão do *N. caninum* como hospedeiro definitivo (GONDIM et al., 2004b).

Neste estudo, quatro filhotes de coioite foram alimentados com tecidos de bovinos infectados por *N. caninum* e foi observada a eliminação de oocistos não esporulados nas fezes dos filhotes. Os oocistos foram examinados por PCR e foram positivos para *N. caninum* e negativos para *Hammondia heydorni*.

Como o *N. caninum* foi isolado de canídeos silvestres, coiotes (*Canis latrans*) nos Estados Unidos, existe possibilidade de outros canídeos serem hospedeiros definitivos do parasita (GONDIM et al., 2004b).

Foi demonstrada no mesmo ano a transmissão entre animais domésticos e silvestres (GONDIM et al., 2004a), ou seja, entre o veado da cauda branca (*Odocoileus virginianus*) e o cão doméstico (*Canis familiaris*). Após a ingestão de cérebro de veado naturalmente infectado, dois dos quatro cães eliminaram oocistos nas fezes.

O autor acredita que a caça desses cervídeos seja um fator importante na transmissão silvestre-doméstica, uma vez que os caçadores jogam as carcaças evisceradas no campo.

Após uma temporada de caça, na Virginia, 28 cérebros de veados sorologicamente reagentes para *N. caninum*, dos 110 veados abatidos e abandonados foram inoculados em camundongos KO para interferon-gamma. A partir disso, foi feito o isolamento *in vitro* de *N. caninum* em veado (*Odocoileus virginianus*).

Os animais silvestres, provavelmente desempenham importante papel na transmissão da neosporose entre animais domésticos (GONDIM, 2006).

1.1.3 Ciclo biológico

As formas infectantes são: taquizoítos, bradizoítos contidos em cistos teciduais e esporozoítos contidos em oocistos, o hospedeiro pode se infectar pela ingestão de oocistos ou oocistos, ou pela via transplacentária (DUBEY, 2003; DUBEY et al., 2006)

A transmissão na espécie canina pode ocorrer verticalmente, através da transmissão congênita de fêmeas infectadas aos filhotes ou horizontalmente pela ingestão de cistos teciduais. A ingestão de membranas placentárias também pode ser uma forma de transmissão, uma vez que o parasita tem sido encontrado em placentas naturalmente infectadas (DIJKSTRA et al., 2001; PETERS et al., 2001).

Carnívoros podem adquirir a infecção pela ingestão de tecidos infectados (MCALLISTER et al., 1988; LINDSAY et al., 1989; SCHARES et al., 2001; GONDIM et al., 2002).

O hospedeiro definitivo elimina o oocisto não esporulado no meio ambiente (cão, de 5 a 14 dias após a ingestão de cisto tecidual). Pode ocorrer esporulação do oocisto no meio ambiente em 24 horas após a eliminação (LINDSAY et al., 1999).

A resistência do oocisto no meio ainda não é conhecida. O hospedeiro intermediário pode se infectar por via transplacentária, ou ingerindo água ou alimento contaminados com oocistos (McALLISTER et al., 1998).

Os cães podem eliminar oocistos após ingerirem tecidos de diferentes espécies como bovinos, caprinos, ovinos, ratos, camundongos e porcos da índia (SCHARES et al., 2001).

Cadelas com infecção subclínica podem transmitir o parasita aos fetos e sucessivas ninhadas podem ser infectadas, porém, segundo Barber e Trees, 1998, a

transmissão vertical, isoladamente, não é capaz de manter o parasita na espécie canina.

A transmissão horizontal é a principal forma de transmissão da neosporose em cães.

Em vacas, é comum a transmissão vertical transplacentária (TREES; WILLIAMS, 2005), porém French et al. (1999) sugerem a necessidade da transmissão horizontal para a manutenção do parasita em uma população. Wouda et al. (1999a) acreditam que a transmissão vertical, isoladamente, não seria capaz de causar altas prevalências, nem mesmo de manter a infecção por um período prolongado em um rebanho.

Um estudo mostrou que cães já infectados não eliminam oocistos após uma reexposição (DIJKSTRA et al., 2001), porém são necessários estudos adicionais, com diferentes tecidos e outras circunstâncias como diferentes níveis de estresse.

Esporozoítos são liberados dos oocistos no trato intestinal do hospedeiro intermediário, penetram nas células sob a forma de taquizoítos que se multiplicam rapidamente por endodigenia e destroem a células e subsequente infectam novas células (INNES et al., 2000).

Podem então ser encontrados em diversas células como macrófagos, fibroblastos, tecido muscular e outros, incluindo placenta de vacas prenhes (SHIVAPRASAD et al., 1989).

Em células de diversos tecidos os taquizoítos podem diminuir a atividade de multiplicação, apresentando-se então sob a forma de bradizoítos. A fim de se defenderem do sistema imune do hospedeiro, os bradizoítos formam uma camada protetora ao redor deles, formando cisto.

Os cistos são comumente observados em tecido nervoso (DUBEY et al., 2002), mas podem ser encontrados em tecido muscular de cão e bovinos (PETERS et al., 2001).

Permanecem na forma cística latentes por períodos variáveis, mas podem recrudesce. Este mecanismo ainda é desconhecido, mas a imunossupressão do hospedeiro é fator desencadeante do processo (WOUDA, 2000).

Oocistos eliminados por hospedeiros definitivos devem ser fonte de infecção pós-natal (DE MAREZ et al., 1999).

Cães (McALLISTER et al., 1998) e coiotes (GONDIM et al., 2004) são os únicos hospedeiros definitivos do *N. caninum* conhecidos até o momento.

1.2 HAMMODIA HEYDORNI

Hammondia heydorni é um parasita coccídeo formador de cistos que apresenta ciclo de vida com, obrigatoriamente, dois hospedeiros (DUBEY; FAYER, 1976).

H. heydorni é considerado um protozoário que usualmente utiliza canídeos como hospedeiros definitivos e com raras manifestações clínicas da infecção (DUBEY; WILLIAMS, 1980).

Inicialmente foi descrito como um coccídeo monóxeno *Isospora bigemina* por Heydorn em 1973, pois, após a esporulação, os oocistos encontrados nas fezes de um cão alimentado com carne bovina crua, mensuravam 11,9µm x 11,1µm e foram considerados similares aos oocistos de *Isospora bigemina* (HEYDORN; MEHLHORN, 2002). O ciclo biológico deste protozoário foi em parte elucidado por Heydorn em 1973 e Heydorn e colaboradores em 1975 (HEYDORN; MEHLHORN, 2002).

Devido aos estudos realizados por Heydorn, Trados e Laarman (1976) propuseram o nome *Isospora heydorni*. Dubey (1977) propôs que fosse classificado no gênero *Hammondia*, por apresentar semelhanças estruturais e no ciclo biológico com *Hammondia hammondi*.

Em 1995 Rommel (não publicado) sugeriu que *Hammondia heydorni* e *Neospora caninum* fossem classificados como espécies sinônimas, esta hipótese foi refutada e ficou demonstrado por análise filogenética que se trata de duas espécies distintas (ELLIS et al., 1999; MUGRIDGE et al., 1999; SCHARES et al., 2002).

Os cães atuam tanto como hospedeiro definitivo quanto como hospedeiro intermediário (DUBEY; FAYER, 1976).

O cão (*Canis familiaris*), o coiote (*Canis latrans*), e a raposa-vermelha inglesa (*Vulpes vulpes*) foram identificados como hospedeiros definitivos de *H. heydorni* (ENTZEROTH et al., 1978; DUBEY; WILLIAMS, 1980; SCHARES et al., 2002). Além desses, Mohammed et al. (2003) observaram a presença de oocistos nas fezes de uma raposa-vermelha árabe (*Vulpes vulpes arabica*) após ser alimentada com tecido de *Gazella gazella* infectado. Os oocistos foram analisados por técnicas moleculares e identificados como de *H. heydorni* e a raposa-vermelha árabe como hospedeiro definitivo.

Em um estudo realizado a partir de oocistos identificados em fezes de uma cadela sofrendo de toxicose por corticosteróides que apresentava caquexia, atrofia bilateral dos músculos temporais e diarreia, Blagburn et al. (1988) realizaram bioensaios em cães, caprinos e um bovino. Os oocistos eliminados em grande quantidade pela cadela ($1,37 \times 10^9$) mensuravam $12,6 \times 11,9\mu\text{m}$ e foram fornecidos via oral a cães, caprinos, porcos-da-índia e a um bezerro. Os animais infectados experimentalmente não manifestaram sinais clínicos e cistos teciduais não foram encontrados em cortes histológicos.

O autor atribuiu a presença de sintomatologia clínica e o incremento na quantidade de oocistos eliminados à terapia com corticosteróides a que foi submetida a cadela.

Abel et al. (2006) analisaram oocistos de *H. heydorni* encontrados em fezes de uma cadela que apresentava sinais clínicos de anemia hemolítica e os compararam com oocistos eliminados por raposa vermelha inglesa (*Vulpes vulpes*). Através de técnicas moleculares os pesquisadores encontraram diferenças genéticas entre os oocistos de *H. heydorni* isolados de cães e de raposas, sugerindo a existência de duas diferentes linhagens.

1.3 CERDOCYON THOUS

O cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) (LINNAEUS, 1766) foi o primeiro canídeo sul-americano descrito na literatura (BISBAL, 1980).

Os *C. thous* (Figura 1) são animais generalistas, a sua dieta pode variar conforme a época do ano e a região habitada, o que permite a este canídeo uma ampla distribuição geográfica, que vai do norte da Venezuela até a Argentina e o Uruguai. Aos pares, podem apanhar alimentos maiores, tais como tartarugas e iguanas (MICHALSKI, 2006).

Fonte: Foto cedida pelo autor, Rodrigo Z. Damiano.

Figura 1- *Cerdocyon thous* em recinto do Parque Ecológico de São Carlos

Conforme observamos na figura 2, a distribuição desta espécie no Brasil se dá por quase todo território, com exceção das planícies da Bacia Amazônica (BERTA, 1982; BISBAL, 1988).

Fonte: Berta, 1982

Figura 2- Distribuição de *Cerdocyon thous* na América do Sul.

Quanto ao habitat o *C. thous* mostra preferência por áreas com formações mais abertas como savana arbórea e mata do tipo capoeira (BRADY, 1979).

O *C. thous* pode utilizar também ambientes de campo como cerrado, campo sujo, capão de mata e áreas de cultivo de milho e soja. (MICHALSKI, 2006).

2. OBJETIVO

Em virtude da ampla distribuição do *C. thous* em território brasileiro e da já demonstrada possibilidade de outros canídeos além dos cães domésticos participarem como hospedeiros definitivos no ciclo de vida do *N. caninum*, propusemos o trabalho em tela com o objetivo de investigar se *N. caninum* utiliza o *C. thous* como hospedeiro definitivo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Nos itens a seguir serão descritos materiais e métodos utilizados.

3.1 EXPERIMENTO 1

No item seguinte serão apresentados os animais que participaram do experimento 1.

3.1.1 Animais

Quatro exemplares de cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), desmamados, dois machos e duas fêmeas, com seis meses de idade, nascidos em cativeiro e provenientes do Parque Ecológico de São Carlos-SP foram transferidos para o canil do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (VCM/FMVZ/USP), em Abril de 2006.

No local onde nasceram e permaneceram até o início deste experimento, os filhotes de cachorro-do-mato (raposas), numerados de 1 a 4, foram alimentados com carne crua e ração comercial para cães. A partir de então, as raposas foram transferidas para as dependências do VCM/FMVZ/USP (dia 0 do experimento) e mantidas em gaiolas de aço individuais, recebendo ração comercial para cães e água *ad libitum* durante os sessenta dias do experimento, exceto nos dois dias da infecção experimental.

3.1.2 Infecção experimental

No dia da transferência das raposas para a FMVZ/USP, amostras de soro destes animais foram colhidas e submetidas ao sorodiagnóstico pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum*, como descrito por Dubey et al. (1988) (ver protocolo de sorodiagnóstico descrito no item 3.1.3.). Todas as raposas foram soronegativas (título RIFI <25).

Masseter e cérebro (peça inteira dos dois órgãos) colhidos de dois bovinos de aproximadamente dois anos de idade, foram picados, misturados e fornecidos às quatro raposas. Os bovinos foram previamente testados pela RIFI (ver protocolo de sorodiagnóstico descrito no item 3.1.3.) e apresentaram resultados positivos com título de 100.

Os tecidos de origem bovinos foram pesquisados, após a infecção experimental, quanto à presença de DNA de *N. caninum* e *H. heydorni*, por técnicas moleculares (ver itens 3.1.5).

Para as infecções experimentais, que ocorreram nos dias 30 e 31 do experimento, às raposas foram fornecidas porções, em dois dias consecutivos, da mistura de tecido muscular e cérebro dos bovinos.

Todo o conteúdo de fezes eliminado por cada uma das raposas foi colhido do dia 1 ao dia 60 do experimento para exame coproparasitológico para detecção de oocistos (ver item 3.1.4.). Os oocistos eliminados em cada dia de eliminação foram submetidos à identificação molecular, conforme descrito no item 3.1.5.

As raposas foram eutanasiadas no dia 60 do experimento e, à necropsia recolheu-se soro, a totalidade do conteúdo encefálico, fragmentos de musculatura esquelética (masseter) e fragmentos de musculatura cardíaca. Os órgãos foram mantidos a -20°C para serem posteriormente testados para identificação molecular de formas parasitárias da sub-família toxoplasmatinae (ver item 3.1.5.) e os soros submetidos ao sorodiagnóstico pela RIFI (ver item 3.1.3).

3.1.3 Detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em soros de canídeos e bovinos

Antes da infecção experimental e após o término dos exames coproparasitológicos, foram colhidas amostras de sangue das raposas, por punção da veia cefálica, para realização de RIFI para verificar a presença de anticorpos contra *N. caninum*. Os soros dos bovinos, cujos tecidos foram utilizados como inóculo, também foram testados para a presença de anticorpos anti-*N. caninum*, conforme descrito a seguir.

3.1.3.1 Preparo da RIFI

Taquizoítos de *Neospora caninum*, amostra NC-1 (DUBEY et al., 1988) foram mantidos por meio de passagens consecutivas em cultivo de células no laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (VPS/FMVZ/USP), na cidade de São Paulo.

Os taquizoítos de *N. caninum* foram mantidos por passagens contínuas em cultura de células em garrafas de 25 cm³ com monocamada de monócitos bovinos (MB) M-617 e incubados a 37°C. As células foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 acrescido de soro fetal bovino 10%. A passagem para uma nova garrafa de 25 cm³ é feita com o auxílio de um raspador de células e se dá quando no mínimo 80% do tapete celular estão rompidos.

O conteúdo total, retirado da garrafa, aproximadamente 8,0 mL, é passado por agulha de calibre 27G para que as células que ainda abriguem taquizoítos se rompam.

Uma alíquota de 1 mL desse material é inoculada em uma nova garrafa de 25 cm³ com monocamada de monócitos bovinos e 7mL do meio de cultura agora livre de soro fetal bovino e incubada a 37°C.

As suspensões de taquizoítos cultivados em garrafas contendo monocamada de monócitos bovinos M-617 foram utilizadas como antígeno no preparo das lâminas para a RIFI.

Para serem utilizadas nas lâminas, as suspensões de taquizoítos sofreram o seguinte processo: centrifugação a 2000 x *g* durante 10 minutos com solução fosfatada tamponada (PBS) em pH 7,2 (1,37M NaCl; 0,027MKCl; 0,105M Na₂HPO₄; 0,018M KH₂PO₄), desprezo do sobrenadante e ressuspensão do sedimento. Após a repetição do processo, uma terceira lavagem foi realizada apenas com solução salina de NaCl 0,85%, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido.

Após a contagem dos taquizoítos em câmara de Neubauer a concentração final foi ajustada para 1,0 x 10⁷ taquizoítos/mL. Alíquotas de 20 µL da suspensão foram depositadas em cada poço das lâminas de 12 poços (PGC Scientifics 60-5453-46), após retirada do excesso, as lâminas foram secas em temperatura ambiente, fixadas em metanol e armazenadas em caixas de polipropileno sob congelamento a -20°C, até a realização da RIFI.

3.1.3.2 Reação de Imunofluorescência Indireta em amostras de soro colhidas dos bovinos

As amostras de soro colhidas dos bovinos foram testadas quanto à presença de anticorpos anti-*N. caninum* através da RIFI, a reação foi feita como descrita por Dubey et al. (1988).

Os soros testes e os soros controles positivo e negativo foram diluídos em PBS pH 7,2 (0,147M NaCl; 0,0018M Na₂H₂PO₄; 0,0084M Na₂HPO₄) e distribuídos em lâminas preparadas conforme descrito no item anterior.

As lâminas foram então incubadas a 37°C por 30 minutos e após isso, lavadas três vezes com PBS pH 7,2 e incubadas com o conjugado (IgG de coelho anti-IgG bovino SIGMA F-7887) marcado com isotiocianato de fluoresceína.

Feita a leitura em microscópio epifluorescente OLYMPUS BX-FLA foram consideradas positivas as amostras com título de maior diluição do soro capaz de determinar algum grau de fluorescência em todo o contorno do taquizoíto. Foram testadas diluições de soros, em base 2, a partir de 1:50.

3.1.3.3 Reação de Imunofluorescência Indireta em amostras de soro colhidas dos Cachorros-do-mato

As amostras de soro colhidas das raposas foram testadas quanto à presença de anticorpos anti-*N. caninum* através da RIFI, exatamente como descrito no item anterior, exceto pelo uso de IgG de coelho anti-IgG canina como conjugado fluorescente. Foram testadas diluições de soros, em base 2, a partir de 1:50.

3.1.4 Detecção e mensuração de oocistos nas fezes

O total de fezes eliminado diariamente pelas raposas foi colhido durante trinta dias que antecederam a infecção experimental e trinta dias após, para pesquisa de oocistos de coccídeos pela técnica de concentração por flutuação usando solução de sacarose (sp. Gr. 1.205).

O número de oocistos por grama de cada amostra positiva foi contado em câmara de Neubauer.

As amostras positivas para a presença de oocistos de Toxoplasmatinae de cada raposa foram reunidas e do combinado de amostras positivas de cada animal foi feita nova centrifugo-flutuação em solução de sacarose, desta vez para mensuração dos oocistos. De cada combinado de amostra, 100 oocistos não-esporulados foram mensurados, para os quais foram registrados os valores de seus respectivos comprimentos, larguras e razão comprimento/largura. As mensurações foram registradas em micrômetros.

Os oocistos não esporulados em solução concentrada de sacarose foram mensurados em microscópio óptico em campo claro (Olympus BX40), conectado a câmara fotográfica (Olympus DP70), até o aumento de 1000 x. As imagens obtidas foram analisadas por software Image-Pro® Plus version 5.1 (Media Cybernetics, Inc., 95 Silver Spring, MD).

3.1.5 Detecção e Identificação de DNA de parasitas em oocistos e em tecidos dos hospedeiros

Amostras de oocistos de cada dia de eliminação foram analisadas por técnicas moleculares, para que fosse possível a determinação das espécies de parasitos eliminados. Também foram submetidas a análises moleculares para identificação de parasitos as amostras oriundas de tecidos das raposas e dos bovinos cujos tecidos serviram de inóculo. Seguem as etapas para conclusão dos métodos para identificação molecular.

3.1.5.1 Extração de DNA de oocistos

Os oocistos observados a microscopia óptica foram lavados da lâmina em que eram observados com 1 mL de TE (10mM TrisHCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0) em

placa de Petri estéril. Os oocistos foram então transferidos para micro-tubos de 1,5 mL e lavados novamente em TE por centrifugação a 12.000 x *g* por 5 minutos.

O sedimento contendo oocistos foi submetido à extração do DNA. Para isso, adicionou-se ao sedimento de oocistos um tampão de extração (Tris-HCl 10mM; NaCl 100mM; EDTA 25mM; SDS 1% e água milli-Q qsp 590μL). Realizou-se o congelamento e descongelamento das amostras três vezes consecutivas para melhor rompimento dos oocistos. Adicionou-se 5μL de proteinase K (10μg/μL) e procedeu-se uma incubação em banho-seco por 4 horas à 37°C ou 2 horas a 56°C. O volume final obtido foi de 600μL.

Para a purificação das amostras adicionou-se 300μL de fenol e 300μL de clorofórmio, seguido por homogeneização e centrifugação a 12.000 x *g* por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante (cerca de 400μL) foi transferido a um novo microtubo e adicionou-se 10% deste volume recolhido, que neste caso foi 40μL, de acetato de sódio (3M pH 5,3) para precipitação do DNA. Após a homogeneização, as amostras foram mantidas em freezer a -20°C por no mínimo 2 horas, ou “overnight”.

As amostras foram centrifugadas a 12.000g por 30 minutos a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspendido em 1mL de etanol a 70%. O material foi novamente centrifugado a 12.000 x *g* por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o microtubo deixado em posição invertida até estarem completamente secos.

Por fim, adicionou-se 30μL de TE (10mM Tris HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0) nas amostras e essas foram homogeneizadas e incubadas em banho-seco a 56°C por 30 minutos. Após uma nova homogeneização as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até a sua utilização.

3.1.5.2 Extração de DNA de tecidos

Aproximadamente 5mm³ de tecidos (musculatura ou tecido encefálico) foram homogeneizados em tampão de lise contendo Tris-HCl 10mM; NaCl 100mM; EDTA

25mM; SDS 1% e proteinase K a 5ug /mL. Procedeu-se, então, uma incubação em banho-seco por 4 horas à 37°C ou 2 horas a 56°C. O volume final obtido foi de 600µL.

Para a purificação das amostras adicionou-se 300µL de fenol e 300µL de clorofórmio, seguido por homogeneização e centrifugação a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante (cerca de 400µL) foi transferido a um novo microtubo e adicionou-se 10% deste volume recolhido, que neste caso foi 40µL, de acetato de sódio (3M pH 5,3) para precipitação do DNA. Após a homogeneização, as amostras foram mantidas em freezer a -20°C por no mínimo 2 horas, ou “overnight”.

As amostras foram centrifugadas a 12.000g por 30 minutos a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspendido em 1mL de etanol a 70%. O material foi novamente centrifugado a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o microtubo deixado em posição invertida até estarem completamente secos.

Por fim, adicionou-se 30µL de TE (10mM Tris HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0) nas amostras e essas foram homogeneizadas e incubadas em banho-seco a 56°C por 30 minutos. Após uma nova homogeneização as amostras foram armazenadas no freezer a -20°C até a sua utilização.

3.1.5.3 PCR

As amostras de DNA obtidas nos itens acima foram submetidas à amplificação por PCR utilizando-se diferentes formatos e primers. Para as amostras de oocistos foram empregadas três PCRs, uma direcionada ao gene codificador de rRNA (PCR-ITS-1), outra ao gene codificador de proteína de choque térmico HSP70 (PCR-HSP-70) e a terceira ao gene 5 de *N. caninum* (nPCR-Nc5). Para as amostras de tecidos foram empregadas uma PCR direcionada ao gene codificador de rRNA (nPCR-ITS-1) e outra ao gene 5 de *N. caninum* (nPCR-Nc5). As PCRs estão detalhadas a seguir:

PCR-ITS-1: baseadas nos primers JS4 e CT2b

PCR-HSP-70: baseada nos primers HSP70F e HSP70R

nPCR-ITS-1: baseada nos primers JS4 e CT2b para a amplificação primária e nos primers CT1 e CT2b para a reação secundária (em formato de heminested-PCR)

nPCR-Nc5: baseadas nos primers NP4 e NP7 para a amplificação primária e nos primers NP6 e NP7 para a reação secundária (em formato de heminested-PCR)

As PCRs PCR-ITS-1, PCR-HSP-70 e nPCR-ITS-1 são grupo específicas, pois amplificam material nucléico de diferentes organismos da sub-família toxoplasmatinae. Para diferenciação dos produtos obtidos com estas técnicas é necessário recorrer ao seqüenciamento dos produtos amplificados. A nPCR-Nc5 emprega primers específicos para amplificação do gene 5, locus exclusivo de *N. caninum*.

Os primers usados neste estudo podem ser encontrados na tabela 2 a seguir:

Tabela 2 Primers utilizados

Primer	¹	Seqüência	Ref. ²
JS4	+	CGA AAT GGG AAG TTT TGT GAA C	A
CT1	+	TGA ATC CCA AGC AAA ACA	B
CT2b	-	TTG CGC GAG CCA AGA CAT C	C
HSP70F	+	CAG TCG GAC ATG AAG CAT TGG C	C
HSP70R	-	ATC GCA CGC TCA CCT TCG TAC AC	C
NP4	+	CCT CCC AAT GCG AAC GAA A	D
NP6	+	CAGT CAA CCT ACG TCT TCT	D
NP7	-	GGG TGA ACC GAG GGA GTT G	D

¹: (+) primer senso; (-) primer anti-senso

²: (a) Slapeta et al., 2002; (b) Sreekumar et al., 2003; (c) Monteiro et al., 2007; (d) Yamage et al., 1996.

O protocolo a seguir foi adotado para a primeira fase de amplificação das amostras com qualquer um dos primers desenhados neste estudo.

Para uma reação de 50 μ L foram utilizados:

- ☐ 25, 2 μ L de água ultrapura autoclavada
- ☐ 5 μ L de 10x PCR Buffer (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM; pH 9,0)
- ☐ 8 μ L da mistura de dNTPs (1,25mM)
- ☐ 1,5 μ L de MgCl₂ (50mM)
- ☐ 2,5 μ L de cada primer (10 pmol/ μ L)
- ☐ 0,3 μ L de Taq DNA polimerase
- ☐ 5 μ L de DNA extraído da amostra alvo

Foi utilizado o seguinte ciclo:

- ☐ Desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos
- ☐ Desnaturação a 94°C por 30 segundos
- ☐ Hibridização dos primers a 55°C por 30 segundos
- ☐ Extensão a 72°C por 50 segundos
- ☐ 40 ciclos de repetição a partir da desnaturação por 30 segundos
- ☐ Extensão final a 72°C por 5 minutos

Para a segunda etapa de amplificação empregou-se o seguinte protocolo:

Para uma reação de 50 μ L utilizou-se 2,5 μ L de cada primer (10pmol/ μ L), 5 μ L de 10x PCR Buffer, 1,5 μ L de MgCl₂ (50mM), 8 μ L de dNTP (1,25mM), 0,3 μ L de Taq polimerase e 1 μ L de DNA amplificado na primeira etapa de amplificação. Os ciclos de incubação foram idênticos aos definidos para a primeira PCR.

3.1.5.4 Detecção do Produto Amplificado

Os produtos amplificados pelas PCRs mais o marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases (GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder), foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em cuba horizontal, imersos em tampão TBE (Tris-Borato 0,045M; EDTA 1mM). Em cada orifício do gel foram depositados 10µL de cada amostra misturado a 2µL de corante de amostra (30% de glicerol; 0,25% de azul de bromofenol).

Para a detecção de fragmentos obtidos após restrição enzimática utilizou-se o marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 50 pb (GeneRuler™ 50pb DNA Ladder), analisados em gel de agarose a 2,5%. Nesse caso, em cada orifício do gel foram depositados cerca de 30µL das amostras misturado a 2µL de corante de amostra.

Após a corrida eletroforética, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,5µg/mL) por 15 a 20 minutos e a visualização das bandas foi realizada através de transiluminação com luz ultravioleta.

3.1.5.5 Seqüenciamento

Nos parágrafos abaixo estão descritas as metodologias realizadas para a obtenção das seqüências de nucleotídeos de cada produto.

Os produtos de PCR de tamanho esperado foram recortados do gel de agarose a 1,5% com lâmina de bisturi. Esses fragmentos foram eluídos do gel e a purificação do DNA foi realizada com o “kit” GFX™ (Amersham Biosciences), conforme instruções do fabricante.

Alíquotas dos produtos de PCR purificados (5µL) foram quantificadas com o auxílio do marcador de peso molecular Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder (MBI

Fermentas) em gel de agarose 1,5% imerso em Tampão TBE, pH 8,0 (Tris-borato 0,045M; EDTA 0,001M). As intensidades luminosas das bandas adquiridas após purificação do DNA foram visualmente comparadas com as do marcador. A concentração em nanogramas de DNA das amostras foi determinada seguindo a tabela fornecida pelo fabricante do marcador de peso molecular.

Para a reação de seqüenciamento foi utilizado o “kit” ABI PRISMTM Big Dye TerminatorTM (Applied Biosystems). Misturou-se de 6ng de DNA purificado, 2µL de Big DyeTM, 1µL de Tampão SaveMoney 5x (Tris-HCl 400mM; MgCl₂ 10mM, pH 9,0), 2pmol de cada um dos primers (senso ou anti senso) e água q.s.p. 10 µL. As seqüências do cromatograma foram editadas usando o programa Sequencher 4.1 (Genocodes Corp).

O ciclo de seqüenciamento foi efetuado no termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf com o seguinte programa:

☐ Desnaturação inicial; 96°C por 1 minuto

☐ Desnaturação: 96°C por 15 segundos

Rampa: 1,0°C/ s

☐ Hibridização: 50°C por 15 segundos

Rampa: 1,0°C/ s

☐ Extensão: 60°C por 4 minutos

Rampa: 1,0°C/ s

O ciclo repete-se por mais 39 vezes a partir da desnaturação. Em seguida, as amostras foram mantidas a 4°C embrulhadas em folhas de alumínio até a sua precipitação.

Após o ciclo de seqüenciamento, adicionou-se 40µL de isopropanol a 65% (v/v em água) nas amostras. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas por 15 a 20 minutos em temperatura ambiente e local escuro. Em seguida, foram centrifugadas a 14.000 x g por 25 minutos.

O sobrenadante foi descartado com o auxílio de pipeta e em seguida adicionou-se 300µL de etanol a 60% (v/v em água). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 14.000 x *g* por 10 minutos.

O etanol foi removido com a pipeta e as amostras foram colocadas em banho seco a 80°C por cerca de 2 minutos até a secagem completa dos microtubos.

As amostras foram mantidas a em local escuro a –20°C até o seqüenciamento.

As amostras foram homogeneizadas com formamida, colocadas em banho-seco por 3 minutos a 95°C, mantidas em gelo por cerca de 2 minutos e aplicadas para o seqüenciamento. Este foi realizado a partir do protocolo do manual técnico do equipamento ABI PRISMTM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

3.2 EXPERIMENTO 2

No item seguinte serão apresentados os animais que participaram do experimento 2.

3.2.1 Animais

Sete filhotes de cachorro-do-mato (raposas) encontrados e recolhidos pela Polícia Florestal após uma queimada em uma área de mata nativa na região de Guaíra, estado de São Paulo foram encaminhados ao Parque Zoológico de Guaíra.

Os animais aparentavam ser de uma mesma ninhada e ter aproximadamente dois meses de idade. No período de dois meses em que ficaram no parque, receberam ração comercial para cães recomendada para filhotes e carne crua.

Foram então transportadas até Pirassununga, estado de São Paulo, onde permaneceram durante todo o experimento nas instalações do VPS/FMVZ/USP.

A partir daí, as raposas, com aproximadamente quatro meses de idade, foram mantidas em gaiolas de aço individuais e receberam ração comercial para cães e água *ad libitum* durante os sessenta dias do experimento, exceto nos dois dias da infecção experimental.

3.2.2 Infecção experimental

Como inóculo para a infecção experimental foi utilizado tecido cerebral completo de três bubalinos previamente testados pela RIFI para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum*, como descrita por Dubey et al. (1988) (ver protocolo descrito nos itens 3.2.3.) que apresentaram resultados positivos em título de 100, 200 e 400.

Os cérebros foram picados e fornecidos em porções que foram divididas em quantidade suficiente para dois dias consecutivos e administradas por via oral em quantidades iguais para as sete raposas.

Os tecidos dos bubalinos foram pesquisados, após a infecção experimental, quanto à presença de DNA de *N. caninum* e *H. heydorni* (ver item 3.2.5.)

O total de fezes eliminadas pelas raposas foi colhido diariamente, durante trinta dias que antecederam a infecção experimental e trinta dias após, para pesquisa de oocistos de coccídeos pela técnica de concentração por flutuação usando solução de sacarose (sp. gr. 1.205), como descrito no item 3.2.4.

Após o término dos exames coproparasitológicos, dos animais foram colhidas amostras de sangue, por punção da veia cefálica, para realização de RIFI para verificar a presença de anticorpos contra *N. caninum* (ver item 3.2.3.).

Os animais foram então eutanasiados e tecidos musculares e cerebrais foram pesquisados quanto à presença de DNA de *N. caninum* e *H. heydorni* (ver item 3.2.5.).

3.2.3 Detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em soros de bubalinos e canídeos

Antes da infecção experimental e após o término dos exames coproparasitológicos, as raposas foram testadas por RIFI para verificar a presença de anticorpos contra *N. caninum*.

Os bubalinos cujos tecidos foram utilizados como inóculo também foram testados quanto à presença de anticorpos anti-*N. caninum*, conforme descrito a seguir.

3.2.3.1 Preparo da RIFI

A manutenção foi feita como o descrito no item 3.1.3.1.

3.2.3.2 Reação de Imunofluorescência Indireta em amostras de soro colhidas dos bubalinos

Idem ao item 3.1.3.3

3.2.3.3 Reação de Imunofluorescência Indireta em amostras de soro colhidas dos Cachorros-do-mato

Idem ao item 3.1.3.4

3.2.4 Detecção de oocistos nas fezes

O total de fezes eliminadas pelas raposas foi colhido diariamente, durante trinta dias que antecederam a infecção experimental e trinta dias após, para pesquisa de oocistos de coccídeos pela técnica de concentração por flutuação usando solução de sacarose (sp. Gr. 1.205).

3.2.5 Detecção e Identificação de DNA de parasitas em oocistos e em tecidos dos hospedeiros

Procedimentos realizados exatamente da mesma forma como descrita para o item 3.1.5.

4 RESULTADOS

Nos itens seguintes serão discutidos os resultados obtidos nos experimentos 1 e 2.

4.1 EXPERIMENTO 1

Duas raposas (nº1 e nº4) desafiadas pela ingestão de tecidos bovinos eliminaram oocistos não esporulados após sete e oito dias, respectivamente. Uma das duas raposas eliminou oocistos durante cinco dias enquanto a outra eliminou por nove dias (Tabela 3).

Os percentis de comprimento e largura observados por análise morfométrica dos oocistos estão representados no gráfico 1. A proporção comprimento-largura dos oocistos encontrados está demonstrada no gráfico 2.

Tabela 3- Eliminação de oocistos de *Hammondia heydorni* por cachorros-do-mato alimentados com tecidos de bovinos naturalmente infectados

<i>Dias pós-infecção</i>	<i>Raposa nº 1</i>	<i>Raposa nº 4</i>
7	-	-
8	$< 1,0 \times 10^3$	-
9	$1,3 \times 10^4$	$2,1 \times 10^3$
10	$5,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^5$
11	$1,1 \times 10^4$	$4,1 \times 10^4$
12	$< 1,0 \times 10^3$	$1,7 \times 10^5$
13	-	$4,9 \times 10^4$
14	-	$7,5 \times 10^4$
15	-	$1,7 \times 10^4$
16	-	$< 1,0 \times 10^3$
17	-	$< 1,0 \times 10^3$
18	-	-

Figura 3

Figura 4

Figuras 3 e 4 Oocistos sub-esféricos (n=100) observados em solução de sacarose em microscopia de campo claro com aumento de 1000 x mediram 11,39-14,39 ($12,85 \pm 0,62$) μm por 10,97-13,36 ($12,25 \pm 0,60$) μm .

Gráfico 1- Análise morfométrica de oocistos não esporulados em solução de sacarose: comprimento e largura

Gráfico 2- Análise morfométrica de oocistos não esporulados em solução de sacarose: proporção comprimento-largura

Uma amostra de DNA extraída dos oocistos detectados a cada dia de eliminação foi testada por PCR-HSP-70, PCR-ITS-1 e Nc5-NPCR.

Todas as amostras foram positivas por PCR-HSP-70 e PCR-ITS-1 mas negativas por Nc5-NPCR.

Os produtos das reações de PCR-HSP-70 e PCR-ITS-1 foram seqüenciados e as seqüências submetidas à pesquisa no BLAST (blastn, WWW.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) para a identificação de espécie do parasita.

As seqüências de nucleotídeos de PCR-HSP-70 e PCR-ITS-1 revelaram 100% de identidade com seqüências homólogas de *H. heydorni*.

Como demonstrado pelos resultados obtidos com a nPCR-ITS-1, foram encontradas evidências moleculares da presença de *H. heydorni* em tecidos, cerebral e muscular, tanto nas amostras do homogeneizado de origem bovina fornecido às raposas quanto em tecido cerebral da raposa-1 e músculo masseter da raposa-4.

Os produtos de nPCR-ITS1 foram seqüenciados e as seqüências submetidas à pesquisa no BLAST e, como na identificação dos oocistos, revelaram 100% de identidade com seqüências homólogas de *H. heydorni*. Não foram encontrados fragmentos de DNA de *N. caninum* Nc-5 em tecidos dos bovinos ou das raposas.

As raposas não soroconverteram apresentando resultados negativos quanto à presença de anticorpos contra *N. caninum*, pela RIFI.

4.2 EXPERIMENTO 2

Foram encontradas evidências da presença de DNA de *N. caninum* nos tecidos cerebrais dos bubalinos.

Porém, não foram encontradas evidências da presença de DNA *H. heydorni* nem de *N. caninum* em tecidos cerebrais e de musculatura esquelética das amostras de cachorro-do-mato.

Os animais não soroconverteram para resposta anticórpica contra *N. caninum*, conforme resultados obtidos à partir da RIFI.

Nenhum animal do experimento eliminou oocistos sub-esféricos sugestivos de organismos da sub-família toxoplasmatinae.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo reporta, pela primeira vez, tecidos bovinos como fonte de infecção de *H. heydorni* para cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*).

Outros canídeos já foram identificados como hospedeiros definitivos de *H. heydorni*. Oocistos eliminados nas fezes foram detectados entre os quinto e décimo segundo dias pos-infecção em raposas-vermelhas inglesas (*Vulpes vulpes*) alimentadas com tecidos de caprinos (SCHARES et al., 2002). Em outro experimento, tecidos de ovinos infectados por ingestão de oocistos de cães, foram fornecidos a um cão e a um coiote, ambos eliminaram oocistos após cinco a oito dias. Um segundo isolado de *H. heydorni* foi obtido de um coiote alimentado com carne de bovino naturalmente infectado. (DUBEY; WILLIAMS, 1980).

No presente estudo, os oocistos de *H. heydorni* foram eliminados entre 8 a 12 dias e 9 a 17 pós-infecção (raposa-1 e raposa-4, respectivamente).

Os oocistos eliminados pelos cachorros-do-mato foram significativamente maiores que os oocistos de *H. heydorni* isolados de cães por Schares et al. (2005).

O 75º percentil de comprimento e largura observado no isolado de cachorro-do-mato foi maior que 13,0µm e 12,5µm, respectivamente. O 75º percentil observado por Schares et al. (2005) para os oocistos mais compridos e largos foi menor que 12,5µm e 11,5µm, respectivamente.

Quando comparados com oocistos de *H. heydorni* reportados por Schares et al. (2005), os oocistos dos cachorros-do-mato tiveram semelhante proporção comprimento x largura.

Embora os oocistos de *H. heydorni* isolados de cachorro-do-mato se apresentaram significativamente maiores, por outro lado, a configuração genotípica deste isolado (em HSP70 e ITS-1 loci) foi idêntica a *H. heydorni* em outros isolados de cães de outras partes do mundo.

Assim, o significado biológico da diferença encontrada no tamanho dos oocistos permanece desconhecido.

Até onde sabemos, os oocistos de *H. heydorni* que foram morfologicamente caracterizados por Schares et al. (2005) não foram caracterizados em nível molecular. É sabido que existem pelo menos duas linhagens geneticamente distintas entre os isolados de *H. heydorni*, dessa forma, estudos combinando análises morfológicas e moleculares são necessários para verificar se as diferenças no tamanho dos oocistos estão relacionadas com diferenças na configuração genotípica de *H. heydorni*.

Os tecidos bovinos fornecidos às raposas, como inóculo, eram provenientes de animais previamente testados por RIFI para detecção de anticorpos anti-*N. caninum* e que apresentaram títulos de 100. Entretanto, *N. caninum* não foi isolado em nenhuma das raposas.

Apesar de já terem sido encontrados anticorpos anti-*N. caninum* em soros de cachorros-do-mato (CAÑÓN-FRANCO et al., 2004), o cão doméstico (*Canis familiaris*) e o coiote (*Canis latrans*) são os únicos hospedeiros definitivos conhecidos do *N. caninum*.

Finalmente, está claro que *H. heydorni* também utiliza o cachorro-do-mato como hospedeiro definitivo. O cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), canídeo muito comum na América do Sul é costumeiramente reportado convivendo com rebanhos em diversas regiões do Brasil.

Portanto, é razoável inferir que estes canídeos podem exercer um importante papel nos ciclos silvestre e doméstico de *H. heydorni*.

A presença de DNA de *H. heydorni* nas amostras de tecidos das raposas sugere que o parasita pode não ser um heteroxeno obrigatório como se acredita, mas esta observação necessita de estudos adicionais.

Assim como o cão e o coiote, a participação de outros canídeos silvestres na transmissão da neosporose, como hospedeiros definitivos deve ser considerada.

A presença de canídeos silvestres tem sido apontada como fator de risco para a exposição ao *N. caninum* em criações de gado (BARLING et al., 2000).

Anticorpos anti-*N. caninum* têm sido encontrados em canídeos selvagens brasileiros, entre eles o *Cerdocyon thous* (CAÑÓN-FRANCO et al., 2004), amplamente distribuído e abundante em algumas regiões da Brasil.

Então, visando saber se a presença do cachorro-do-mato pode ser um fator de risco para os rebanhos bovinos brasileiros, neste experimento esses canídeos foram alimentados com tecidos de hospedeiros intermediários infectados por *N. caninum*.

A tentativa de detectar a eliminação de oocistos falhou sugerindo a hipótese de o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) não ser hospedeiro definitivo de *N. caninum*, ou então se tratar de um mau eliminador de oocistos.

Os resultados deste trabalho são concordantes com os de outras tentativas de identificação de hospedeiros definitivos em canídeos classificados fora do gênero *Canis*, Schares et al. (2002) não detectaram a presença de oocistos de *N. caninum* em fezes de raposas-vermelhas inglesas alimentadas com tecidos de caprinos e ovinos infectados experimentalmente com *N. caninum*. Paralelamente, neste trabalho, dois dos cinco cães eliminaram oocistos de *N. caninum* nas fezes após serem alimentados com os tecidos dos hospedeiros intermediários infectados.

Além da hipótese de não ser o *C. thous* hospedeiro definitivo de *N. caninum*, a não eliminação de oocistos de *N. caninum* pode ser atribuída à possível infecção com eliminação de oocistos, anterior ao experimento, uma vez que as raposas eram alimentadas com carne crua e tinham acesso a áreas onde era possível a caça no recinto onde eram mantidas no “Parque Ecológico de São Carlos”, pois, animais que eliminam oocistos uma vez dificilmente eliminam uma segunda vez na vida.

Cães já infectados não eliminam oocistos após uma reexposição (DIJKSTRA et al., 2001), porém são necessários estudos adicionais, com diferentes tecidos e outras circunstâncias como diferentes níveis de stress.

A presença de DNA de *N. caninum* no inóculo, detectada através de técnicas moleculares não quantifica e nem garante a viabilidade de *N. caninum* para causar infecção, ou seja, a não eliminação de oocistos poderia também ser explicada pela impropriedade do inóculo.

A mudança na dieta das raposas nos dias da infecção experimental pode ter desencadeado alterações gastrintestinais relativas à motilidade e absorção, o que poderia diminuir a possibilidade de infecção, porém esta hipótese necessita de investigações adicionais.

6 CONCLUSÕES

1. *Hammondia heydorni* utiliza também o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) como hospedeiro definitivo.
2. O papel do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) como hospedeiro definitivo do *N. caninum* permanece não esclarecido.

REFERÊNCIAS

ABEL, J.; G. SCHARES; K. ORZESZKO; R. B. GASSER; J. T. ELLIS. Hammondia isolated from dogs and foxes are genetically distinct. **Parasitology**, v. 132, n., p. 187-192, 2006.

ALMERIA, S.; D. FERRER; M. PABON; J. CASTELLA; S. MANAS. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 107, n. 4, p. 287-294, 2002.

ANDERSON, M. L.; P. C. BLANCHARD; B. C. BARR; J. P. DUBEY; R. L. HOFFMAN; P. A. CONRAD. Neospora-Like Protozoan Infection as a Major Cause of Abortion in California Dairy-Cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 198, n. 2, p. 241-244, 1991.

ANDERSON, M. L.; C. W. PALMER; M. C. THURMOND; J. P. PICANSO; P. C. BLANCHARD; R. E. BREITMEYER; A. W. LAYTON; M. MCALLISTER; B. DAFT; H. KINDE; D. H. READ; J. P. DUBEY; P. A. CONRAD; B. C. BARR. Evaluation of Abortions in Cattle Attributable to Neosporosis in Selected Dairy Herds in California. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 207, n. 9, p. 1206-8, 1995.

BARBER, J. S.; R. B. GASSER; J. ELLIS; M. P. REICHEL; D. MCMILLAN; A. J. TREES. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. **Journal of Parasitology**, v. 83, n. 6, p. 1056-1058, 1997.

BARBER, J. S.; A. J. TREES. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 57-64, 1998.

BARLING, K. S.; M. SHERMAN; M. J. PETERSON; J. A. THOMPSON; J. W. MCNEILL; T. M. CRAIG; L. G. ADAMS. Spatial associations among density of cattle, abundance of wild canids, and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 217, n. 9, p. 1361-1365, 2000.

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

BASSO, W.; L. VENTURINI; M. C. VENTURINI; D. E. HILL; O. C. H. KWOK; S. K. SHEN; J. P. DUBEY. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 3, p. 612-618, 2001.

BASSO, W.; L. VENTURINI; M. C. VENTURINI; P. MOORE; M. RAMBEAU; J. M. UNZAGA; C. CAMPERO; D. BACIGALUPE; J. P. DUBEY. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 4, p. 906-907, 2001.

BERTA, A. *Cerdocyon-Thous*. **Mammalian Species**, v., n. 186, p. 1-4, 1982.

BISBAL, F. J. E. El zorro comun (*Cerdocyon thous*). **Natura (Caracas)**, v., n., p. 4-6, 1980.

BJERKAS, I.; J. P. DUBEY. Evidence That *Neospora-Caninum* Is Identical to the Toxoplasma-Like Parasite of Norwegian Dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 32, n. 3, p. 407-410, 1991.

BJERKAS, I.; S. F. MOHN; J. PRESTHUS. Unidentified Cyst-Forming Sporozoon Causing Encephalomyelitis and Myositis in Dogs. **Zeitschrift Fur Parasitenkunde-Parasitology Research**, v. 70, n. 2, p. 271-274, 1984.

BLAGBURN, B. L.; D. S. LINDSAY; L. J. SWANGO; G. L. PIDGEON; K. G. BRAUND. Further Characterization of the Biology of *Hammondia-Heydorni*. **Veterinary Parasitology**, v. 27, n. 3-4, p. 193-198, 1988.

BOYD, S. P.; P. A. BARR; H. W. BROOKS; J. P. ORR. Neosporosis in a young dog presenting with dermatitis and neuromuscular signs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 46, n. 2, p. 85-88, 2005.

BRADY, C. A.; J. F. EISENBERG. Observations on the behavior and ecology of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). **Vertebrate ecology in the northern Neotropics**, v. , n., p. 161-171, 1979.

BUXTON, D.; S. W. MALEY; P. P. PASTORET; B. BROCHIER; E. A. INNES. Examination of red foxes (*Vulpes vulpes*) from Belgium for antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Record**, v. 141, n. 12, p. 308-309, 1997.

CANON-FRANCO, W. A.; D. P. BERGAMASCHI; M. B. LABRUNA; L. M. A. CAMARGO; S. L. P. SOUZA; J. C. R. SILVA; A. PINTER; J. P. DUBEY; S. M. GENNARI. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 71-74, 2003a.

CANON-FRANCO, W. A.; L. E. O. YAI; A. M. JOPERT; C. E. SOUZA; S. R. N. D'AURIA; J. R. DUBEY; S. M. GENNARI. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in the rodent capybara (*Hydrochoerus hydrochoerus*) from Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 4, p. 850-850, 2003b.

CANON-FRANCO, W. A.; L. E. O. YAI; S. L. P. SOUZA; L. C. SANTOS; N. A. R. FARIAS; J. RUAS; F. W. ROSSI; A. A. B. GOMES; J. P. DUBEY; S. M. GENNARI. Detection of antibodies to *Neospora caninum* in two species of wild canids, *Lycalopex gymnocercus* and *Cerdocyon thous* from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 123, n. 3-4, p. 275-277, 2004.

CHAVEZ-VELASQUEZ, A.; G. ALVAREZ-GARCIA; E. COLLANTES-FERNANDEZ; E. CASAS-ASTOS; R. ROSADIO-ALCANTARA; E. SERRANO-MARTINEZ; L. M. ORTEGA-MORA. First report of *Neospora caninum* infection in adult alpacas (*Vicugna pacos*) and llamas (*Lama glama*). **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 864-866, 2004.

COSKUN, S. Z.; L. AYDYN; C. BAUER. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in domestic dogs in Turkey. **Veterinary Record**, v. 146, n. 22, p. 649-649, 2000.

CRINGOLI, G.; L. RINALDI; F. CAPUANO; L. BALDI; V. VENEZIANO; G. CAPELLI. Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 4, p. 307-313, 2002.

DE MAREZ, T.; S. LIDDELL; J. P. DUBEY; M. C. JENKINS; L. GASBARRE. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1647-1657, 1999.

DE SOUZA, S. L. P.; J. S. GUIMARAES; F. FERREIRA; J. P. DUBEY; S. M. GENNARI. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Parana, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 2, p. 408-409, 2002.

DIJKSTRA, T.; M. EYSKER; G. SCHARES; F. J. CONRATHS; W. WOUDA; H. W. BARKEMA. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 8, p. 747-752, 2001.

DUBEY, J. P. Neosporosis in cattle. **Journal of Parasitology**, n. 89, p. S42-S56, 2003a.

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

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

DUBEY, J. P.; B. C. BARR; J. R. BARTA; I. BJERKAS; C. BJORKMAN; B. L. BLAGBURN; D. D. BOWMAN; D. BUXTON; J. T. ELLIS; B. GOTTSTEIN; A.

HEMPHILL; D. E. HILL; D. K. HOWE; M. C. JENKINS; Y. KOBAYASHI; B. KOUDELA; A. E. MARSH; J. G. MATTSSON; M. M. MCALLISTER; D. MODRY; Y. OMATA; L. D. SIBLEY; C. A. SPEER; A. J. TREES; A. UGGLA; S. J. UPTON; D. J. L. WILLIAMS; D. S. LINDSAY. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 8, p. 929-946, 2002a.

DUBEY, J. P.; D. BUXTON; W. WOUDA. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134, n. 4, p. 267-289, 2006.

DUBEY, J. P.; J. L. CARPENTER; C. A. SPEER; M. J. TOPPER; A. UGGLA. Newly Recognized Fatal Protozoan Disease of Dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988.

DUBEY, J. P.; R. FAYER. Development of *Isospora-Bigemina* in Dogs and Other Mammals. **Parasitology**, v. 73, n. DEC, p. 371-&, 1976.

DUBEY, J. P.; A. L. HATTEL; D. S. LINDSAY; M. J. TOPPER. Neonatal *Neospora-Caninum* Infection in Dogs - Isolation of the Causative Agent and Experimental Transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 10, p. 1259-1263, 1988.

DUBEY, J. P.; K. HOLLIS; S. ROMAND; P. THULLIEZ; O. C. H. KWOK; L. HUNGERFORD; C. ANCHOR; D. ETTER. High prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1709-1711, 1999.

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

DUBEY, J. P.; J. P. KREIER. *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnoitia*, *Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming *Coccidia* of man and animals. **Parasitic Protozoa. Volume 3. Gregarines, haemogregarines, Coccidia, Plasmodium, and haemoproteids.**, v., n., p. 101-237, 1977.

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

DUBEY, J. P.; G. SCHARES. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1-2, p. 1-34, 2006.

DUBEY, J. P.; C. S. F. WILLIAMS. Hammondia-Heydorni Infection in Sheep, Goats, Moose, Dogs and Coyotes. **Parasitology**, v. 81, n. AUG, p. 123-127, 1980.

ELLIS, J. T.; D. A. MORRISON; S. LIDDELL; M. C. JENKINS; O. B. MOHAMMED; C. RYCE; J. P. DUBEY. The genus *Hammondia* is paraphyletic. **Parasitology**, v. 118, n., p. 357-362, 1999.

ENTZEROTH, R.; E. SCHOLTYSECK; E. GREUEL. Roe Deer Intermediate Host of Different Coccidia. **Naturwissenschaften**, v. 65, n. 7, p. 395-395, 1978.

FRENCH, N. P.; D. CLANCY; H. C. DAVISON; A. J. TREES. Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1691-1704, 1999.

GENNARI, S. M.; L. E. O. YAI; S. N. R. D'AURIA; S. M. S. CARDOSO; O. C. H. KWOK; M. C. JENKINS; J. P. DUBEY. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of Sao Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 2, p. 177-179, 2002.

GONDIM, L. F. P. Neosporal caninum in wildlife. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 6, p. 247-252, 2006.

GONDIM, L. F. P.; L. GAO; M. M. MCALLISTER. 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.; M. M. MCALLISTER; N. E. MATEUS-PINILLA; W. C. PITT; L. D. MECH; M. E. NELSON. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 6, p. 1361-1365, 2004a.

GONDIM, L. F. P.; M. M. MCALLISTER; W. C. PITT; D. E. ZEMLICKA. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 159-161, 2004b.

GONDIM, L. F. P.; A. M. PINHEIRO; P. O. M. SANTOS; E. E. V. JESUS; M. B. RIBEIRO; H. S. FERNANDES; M. A. O. ALMEIDA; S. M. FREIRE; R. MEYER; M. M. MCALLISTER. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**, v. 101, n. 1, p. 1-7, 2001.

GUIMARAES JUNIOR, J.S. **Neospora caninum em bovinos de exploração leiteira: soroprevalência, fatores de risco e comparação das técnicas sorológicas**. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 119pp, 2002.

HEYDORN, A. O.; H. MEHLHORN. *Neospora caninum* is an invalid species name: an evaluation of facts and statements. **Parasitology Research**, v. 88, n. 2, p. 175-184, 2002.

INNES, E. A.; D. BUXTON; S. MALEY; S. WRIGHT; J. MARKS; I. ESTEBAN; A. RAE; A. SCHOCK; J. WASTLING. Neosporosis - Aspects of epidemiology and host immune response. **Tropical Veterinary Diseases**, v. 916, n., p. 93-101, 2000.

KLEIN, B. U.; E. MULLER. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs with and without clinical suspicion for neosporosis in Germany. **Praktische Tierarzt**, v. 82, n. 6, p. 437-440, 2001.

LEMBERGER, K. Y.; L. F. P. GONDIM; A. P. PESSIER; M. M. MCALLISTER; M. J. KINSEL. *Neospora caninum* infection in a free-ranging raccoon (*Procyon lotor*) with

concurrent canine distemper virus infection. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 960-961, 2005.

LEVINE, N. D. Taxonomy of the Sporozoa. **Journal of Parasitology**, v. 56, n. 4 SEC II PT. 1, p. 208-209, 1970.

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

LINDSAY, D. S.; E. J. KELLY; R. D. MCKOWN; F. J. STEIN; J. PLOZER; J. HERMAN; B. L. BLAGBURN; J. P. DUBEY. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of coyotes with *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, v. 82, n. 4, p. 657-659, 1996.

LINDSAY, D. S.; S. E. LITTLE; W. R. DAVIDSON. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in white-tailed deer, *Odocoileus virginianus*, from the southeastern United States. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 2, p. 415-417, 2002.

LINDSAY, D. S.; J. L. WESTON; S. E. LITTLE. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) from South Carolina. **Veterinary Parasitology**, v. 97, n. 2, p. 159-164, 2001.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; R. RICHARTZ; M. E. G. JOINEAU; R. D. PINCKNEY; R. S. DE SOUSA; L. C. LEITE; V. THOMAZ-SOCCOL. Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Parana, southern Brazil. **Veterinary Record**, v. 153, n. 12, p. 366-367, 2003.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; V. T. SOCCOL; R. RICHARTZ; M. E. GASINO-JOINEAU; R. VINNE; R. D. PINCKNEY. Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in southern Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 6, p. 1493-1494, 2001.

MAINAR-JAIME, R. C.; M. C. THURMOND; B. BERZAL-HERRANZ; S. K. HIETALA. Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. **Veterinary Record**, v. 145, n. 3, p. 72-75, 1999.

MCALLISTER, M.; R. A. WILLS; A. M. MCGUIRE; W. R. JOLLEY; J. D. TRANAS; E. S. WILLIAMS; D. S. LINDSAY; C. BJORKMAN; E. L. BELDEN. Ingestion of *Neospora caninum* tissue cysts by *Mustela* species. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1531-1536, 1999.

MCALLISTER, M. M.; J. P. DUBEY; D. S. LINDSAY; W. R. JOLLEY; R. A. WILLS; A. M. MCGUIRE. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, 1998.

MCINNES, L. M.; P. IRWIN; D. G. PALMER; U. M. RYAN. In vitro isolation and characterisation of the first canine *Neospora caninum* isolate in Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 3-4, p. 355-363, 2006.

MEHLHORN, H.; A. O. HEYDORN. *Neospora caninum*: Is it really different from *Hammondia heydorni* or is it a strain of *Toxoplasma gondii*? An opinion. **Parasitology Research**, v. 86, n. 2, p. 169-178, 2000.

MICHALSKI, F.; P. G. CRAWSHAW; T. G. DE OLIVEIRA; M. E. FABIAN. Notes on home range and habitat use of three small carnivore species in a disturbed vegetation mosaic of southeastern Brazil. **Mammalia**, v. 70, n. 1-2, p. 52-57, 2006.

MINEO, T. W. P.; D. A. O. SILVA; G. H. N. COSTA; A. C. B. VON ANCKEN; L. H. KASPER; M. A. SOUZA; D. D. CABRAL; A. J. COSTA; J. R. MINEO. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 98, n. 4, p. 239-245, 2001.

- MOHAMMED, O. B.; A. J. DAVIES; H. S. HUSSEIN; P. DASZAK; J. T. ELLIS.
Hammondia heydorni from the Arabian mountain gazelle and red fox in Saudi Arabia. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 3, p. 535-539, 2003.
- MONTEIRO, R. M.; L. J. RICHTZENHAIN; H. F. J. PENA; S. L. P. SOUZA; M. R. FUNADA; S. M. GENNARI; J. P. DUBEY; C. SREEKUMAR; L. B. KEID; R. M. SOARES. Molecular phylogenetic analysis in Hammondia-like organisms based on partial Hsp70 coding sequences. **Parasitology**, v. 134, n., p. 1195-1203, 2007.
- MUGRIDGE, N. B.; D. A. MORRISON; A. R. HECKEROTH; A. M. JOHNSON; A. M. TENTER. Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that Neospora caninum is more closely related to Hammondia heydorni than to Toxoplasma gondii. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1545-1556, 1999.
- PARE, J.; G. FECTEAU; M. FORTIN; G. MARSOLAIS. Seroepidemiologic study of Neospora caninum in dairy herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, n. 11, p. 1595-+, 1998.
- PATITUCCI, A. N.; M. J. PEREZ; M. A. ROZAS; K. F. ISRAEL. Canine neosporosis: detection of sera antibodies in rural and urban canine population of Chile. **Archivos De Medicina Veterinaria**, v. 33, n. 2, p. 227-232, 2001.
- PENA, H. F. J.; R. M. SOARES; A. M. A. RAGOZO; R. M. MONTEIRO; L. E. O. YAI; S. M. NISHI; S. M. GENNARI. Isolation and molecular detection of Neospora caninum from naturally infected sheep from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 1-2, p. 61-66, 2007.
- PETERS, M.; E. LUTKEFELS; A. R. HECKEROTH; G. SCHARES.
Immunohistochemical and ultrastructural evidence for Neospora caninum tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 10, p. 1144-1148, 2001.

PETERS, M.; P. WOHLSEIN; A. KNIERIEM; G. SCHARES. Neospora caninum infection associated with stillbirths in captive antelopes (Tragelaphus imberbis).

Veterinary Parasitology, v. 97, n. 2, p. 153-157, 2001.

REICHEL, M. P. Prevalence of Neospora antibodies in New Zealand dairy cattle and dogs. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 46, n. 1, p. 38-38, 1998.

REICHEL, M. P.; J. T. ELLIS; J. P. DUBEY. Neosporosis and hammondiosis in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, n. 6, p. 308-312, 2007.

SAWADA, M.; C. H. PARK; H. KONDO; T. MORITA; A. SHIMADA; I. YAMANE; T. UMEMURA. Serological survey of antibody to Neospora caninum in Japanese dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60, n. 7, p. 853-854, 1998.

SCHARLES, G.; F. J. CONRATHS. Placentophagia - an alternative way for horizontal transmission of Neospora caninum in cattle? Response from Gereon Schares and Franz Josef Conraths. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 12, p. 574-575, 2001.

SCHARLES, G.; A. O. HEYDORN; A. CUPPERS; H. MEHLHORN; L. GEUE; M. PETERS; F. J. CONRATHS. In contrast to dogs, red foxes (Vulpes vulpes) did not shed Neospora caninum upon feeding of intermediate host tissues (vol 88, pg 44, 2002). **Parasitology Research**, v. 88, n. 6, p. 592-592, 2002.

SCHARLES, G.; N. PANTCHEV; D. BARUTZKI; A. O. HEYDORN; C. BAUER; F. J. CONRATHS. Oocysts of Neospora caninum, Hammondia heydorni, Toxoplasma gondii and Hammondia hammondi in faeces collected from dogs in Germany. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 14, p. 1525-1537, 2005.

SHIVAPRASAD, H. L.; R. ELY; J. P. DUBEY. A Neospora-Like Protozoan Found in an Aborted Bovine Placenta. **Veterinary Parasitology**, v. 34, n. 1-2, p. 145-148, 1989.

SLAPETA, J. R.; B. KOUDELA; J. VOTYPKA; D. MODRY; R. HOREJS; J. LUKES. Coprodiagnosis of Hammondia heydorni in dogs by PCR based amplification of ITS 1

rRNA: Differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*. **Veterinary Journal**, v. 163, n. 2, p. 147-154, 2002.

SOLDATI, D.; J. F. DUBREMETZ; M. LEBRUN. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1293-1302, 2001.

SOLDATI, S.; M. KIUPEL; A. WISE; R. MAES; C. BOTTERON; N. ROBERT. Meningoencephalomyelitis caused by *Neospora caninum* in a juvenile fallow deer (*Dama dama*). **Journal of Veterinary Medicine Series a-Physiology Pathology Clinical Medicine**, v. 51, n. 6, p. 280-283, 2004.

SREEKUMAR, C.; D. E. HILL; V. M. FOURNET; B. M. ROSENTHAL; D. S. LINDSAY; J. P. DUBEY. Detection of *Hammondia heydorni*-like organisms and their differentiation from *Neospora caninum* using random-amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 5, p. 1082-1085, 2003.

TADROS, W.; J. J. LAARMAN. Sarcocystis and Related Coccidian Parasites a Brief General Review Together with a Discussion on Some Biological Aspects of Their Life Cycles and a New Proposal for Their Classification. **Acta Leidensia**, v. 44, n., p. 1-107, 1976.

TENTER, A. M.; A. M. JOHNSON. Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidia. **Advances in Parasitology**, Vol 39, v. 39, n., p. 69-139, 1997.

TIEMANN, J. C. H.; A. A. R. RODRIGUES; S. L. P. DE SOUZA; J. M. B. DUARTE; S. M. GENNARI. Occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in Brazilian cervids kept in captivity. **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 3-4, p. 341-343, 2005.

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

TOMLEY, F. M.; K. J. BILLINGTON; J. M. BUMSTEAD; J. D. CLARK; P. MONAGHAN. EtMIC4: a microneme protein from *Eimeria tenella* that contains tandem arrays of epidermal growth factor-like repeats and thrombospondin type-1 repeats. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1303-1310, 2001.

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

VITALIANO, S. N.; D. A. O. SILVA; T. W. P. MINEO; R. A. FERREIRA; E. BEVILACQUA; J. R. MINEO. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from southeastern and midwestern regions of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 253-260, 2004.

WILLIAMS, J. H.; I. ESPIE; E. VAN WILPE; A. MATTHEE. Neosporosis in a white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) calf. **Journal of the South African Veterinary Association-Tydskrif Van Die Suid-Afrikaanse Veterinere Vereniging**, v. 73, n. 1, p. 38-43, 2002.

WOUDA, W. Diagnosis and epidemiology of bovine neosporosis: A review. **Veterinary Quarterly**, v. 22, n. 2, p. 71-74, 2000.

WOUDA, W.; C. J. M. BARTELS; A. R. MOEN. Characteristics of *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997). **Theriogenology**, v. 52, n. 2, p. 233-245, 1999.

WOUDA, W.; T. DIJKSTRA; A. M. H. KRAMER; C. VAN MAANEN; J. M. A. BRINKHOF. 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.; W. A. CANON-FRANCO; V. C. GERALDI; M. E. L. SUMMA; M. CAMARGO; J. P. DUBEY; S. M. GENNARI. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) from the city of Sao Paulo, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 4, p. 870-871, 2003.

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

YAMAGE, M.; O. FLECHTNER; B. GOTTSTEIN. *Neospora caninum*: Specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). **Journal of Parasitology**, v. 82, n. 2, p. 272-279, 1996.