ELIANA MONTEFORTE CASSARO VILLALOBOS

Identificação de infecção por protozoários da família Sarcocystidae
em sistema nervoso central de equinos com sinais clínicos
neurológicos e reprodutivos

São Paulo
2012

ELIANA MONTEFORTE CASSARO VILLALOBOS

**Identificação de infecção por protozoários da família Sarcocystidae
em sistema nervoso central de equinos com sinais clínicos
neurológicos e reprodutivos**

São Paulo

2012

ELIANA MONTEFORTE CASSARO VILLALOBOS

**Identificação de infecção por protozoários da família Sarcocystidae
em sistema nervoso central de equinos com sinais clínicos
neurológicos e reprodutivos**

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

Departamento

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador

Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares

São Paulo

2012

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2554
FMVZ

Villalobos, Eliana Monteforte Cassaro

Identificação de infecção por protozoários da família Sarcocystidae em sistema nervoso central de equinos com sinais clínicos neurológicos e reprodutivos / Eliana Monteforte Cassaro Villalobos. -- 2012.

76 p.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2012.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares.

1. Equinos. 2. Protozoários. 3. Encefalopatia. 4. Abortamento. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Identificação da infecção por *Sarcocystis neurona*, *Neospora hughesi* e *Toxoplasma gondii* em sistema nervoso central de equinos com sintomatologia nervosa", protocolado sob o nº 2028/2010, utilizando aproximadamente 100 (cem) amostras de sistema nervoso central (SNC) de cavalos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 27/10/2010.

We certify that the Research "Infection identification by *Sarcocystis neurona*, *Neospora hughesi* and *Toxoplasma gondii* in horses with neurological signs", protocol number 2028/2010, utilizing 100 (one hundred) samples of central nervous system of horses, under the responsibility Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/27/2010.

São Paulo, 28 de outubro de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: VILLALOBOS, Eliana Monteforte Cassaro

TÍTULO: Identificação de infecção por protozoários da família Sarcocystidae em sistema nervoso central de equinos com sinais clínicos neurológicos e reprodutivos

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

Data; ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

DEDICATÓRIA

A minha família

Ao meu pai e minha mãe (*in memoriam*), que sempre me deram exemplos de dedicação, amor e trabalho além de me darem amor, incentivo e apoio para trilhar o caminho de bem.

Ao meu esposo Ramón e minhas filhas Heloisa e Cecília que com amor me apoiaram nesta fase.

Aos meus irmãos, sobrinhos, cunhadas e tios, que saibam que sempre podem contar comigo.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela vida.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, pelos anos de convivência, trabalho e paciência e principalmente pelas oportunidades proporcionadas que enriqueceram minha vida profissional.

As pesquisadoras: Alessandra Figueiredo de Castro Nassar, Elenice Maria Sequetin Cunha, Maria do Carmo Custodio de Souza Hunold Lara, Claudia Del Fava, Eliana Roxo e a funcionária Márcia Regina Silva Rosa todas do Instituto Biológico que foram de fundamental importância para a realização deste trabalho.

Ao prof. Dr. Paulo Brandão que disponibilizou o LABMAS para a realização do sequenciamento das amostras e à amiga Sheila pela grande ajuda da execução do mesmo.

Aos amigos de pós-graduação: Daniela, Felipe, João, Gisele, Herbert, Cristina, Estela, Juliana, meus agradecimentos por enriquecerem minha vida.

Aos amigos do laboratório de parasitologia: Solange, Hilda, Renatinho, pessoas que além de competência na sua área sempre se mostraram amigos e colaboradores;

Ao Instituto Biológico e Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP que possibilitaram a realização desta pesquisa e pela minha formação.

A todos que de alguma forma contribuíram para execução deste trabalho.

Aos equinos que foram utilizados neste estudo que serviram de fonte de aprendizado para realização desta tese.

RESUMO

VILLALOBOS, E. M. C. **Identificação de infecção por protozoários da família Sarcocystidae em sistema nervoso central de equinos com sinais clínicos neurológicos e reprodutivos.** [Infection by protozoa of Sarcocystidae family in central nervous system from equine presenting neurological and reproductive symptomatology]. 2012. 76 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Pela grande produção de equinos no Brasil, perdas econômicas causadas por mortalidade ou perdas reprodutivas neste plantel simbolizam grandes prejuízos, tanto na produção para o mercado interno quanto para a exportação. Necessário se faz o acompanhamento de enfermidades que afetam o sistema nervoso desta espécie. Agentes virais e bacterianos causando problemas neurológicos e reprodutivos, nesta espécie, são amplamente estudados no Brasil. Pouco se conhece sobre o papel dos protozoários da família Sarcocystidae em determinar sinais clínicos neurológicos e reprodutivos. O objetivo deste estudo é identificar protozoários formadores de cistos, com potencial para causar doença neurológica e reprodutiva, em amostras de tecido encefálico de equinos com diagnóstico clínico de encefalopatias e de fetos abortados. Foram analisadas 165 amostras de SNC e 21 amostras de feto abortado de equinos, enviados ao Instituto Biológico para realização de exames laboratoriais. As amostras foram submetidas à *nested* PCR-ITS1 com *primers* direcionados às regiões conservadas do locus ribossômico de protozoários da família Sarcocystidae. Após confirmação do resultado, os produtos de amplificação foram sequenciados para a determinação das sequências ITS1, discriminatórias entre as diversas espécies de protozoários da família Sarcocystidae. Das 15 amostras positivas (duas de feto abortado e 13 de SNC de equino com sintomatologia neurológica) em 14 o protozoário envolvido foi *Toxoplasma gondii* e em uma delas *Sarcocystis neurona*. Para *Neospora* spp não foi encontrada nenhuma amostra positiva. Nas amostras de SNC também foi realizado o exame histopatológico para análise das alterações histopatológicas. Todos os materiais positivos para *S. neurona* ou *T. gondii* apresentaram algum tipo de alteração (infiltrado inflamatório meníngeo/neurópilo), congestão/edema, hemorragia, necrose, malácia, indicando a ação de patógeno neurotrópico. A frequência de amostras positivas pela *nested* PCR-ITS1, para a presença de protozoários foi 7,9% (13/165) e de abortamento por protozário (*T. gondii*) foi de 9,5% (2/21). *Sarcocystis neurona*

foi encontrado em apenas uma amostra de SNC. Pelos resultados é possível inferir que a ocorrência de mieloencefalite e abortamentos causados pelos protozoários *Sarcocistideos* em equinos pode revelar-se maior do que se considera atualmente, caso o estudo do SNC nesta espécie seja executado rotineiramente para a conclusão de casos clínicos.

Palavras-chave: Equinos. Protozoários. Encefalopatia. Abortamento.

ABSTRACT

VILLALOBOS, E. M. C. Infection by protozoa of Sarcocystidae family in central nervous system from equine presenting neurological and reproductive symptomatology. [Identificação de infecção por protozoários da família Sarcocystidae em sistema nervoso central de equinos com sinais clínicos neurológicos e reprodutivos].. 2012. 76 f. Tesis (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Regarding the importance of equine husbandry in Brazil, economic losses due to mortality or reproductive failures within these herds could mean significant problems for national and international trade market. Therefore, it is necessary to research for diseases affecting the central nervous system (CNS). In Brazil, a broad amount of studies has been made concerning viral and bacterial nervous and/or reproductive diseases. Although, little is established about the role of protozoan from Sarcocystidae family leading to that kind of symptomatology. This study aimed to identify cystic protozoa which are potentially pathogenic for reproductive and neural tracts using samples from equine encephalic tissue of animals diagnosed with clinical encephalopathy and aborted fetuses. 165 samples of equine CNS and 21 aborted fetuses of this same species were analyzed in the Instituto Biológico facilities. They were submitted to *nested* PCR-ITS1 using primer to conserved regions from ribosomal locus of Sarcocystidae family protozoa. After confirmatory results, amplified samples were submitted to sequencing for determination of ITS-1 sequences, which are discriminatory concerning the several species of protozoan from Sarcocystidae family. Among the 15 positive identified samples (2 from aborted fetuses and 13 from adult equine CNS), in 14 were detected *Toxoplasma gondii* as the protozoa involved with the symptoms and in one of them *Sarcocystis neurona* was detected. None was found positive for *Neospora* spp. All samples collected were examined using histopathological techniques looking for disease findings. Positive samples for *S. neurona* or *T. gondii* showed varied types of alteration (neutrophilic/meningeal inflammatory infiltrate), congestion/edema, hemorrhage, necrosis and malacia, indicating that they were affected by a neurotropic pathogen. The frequency of parasitic equine encephalitis using *nested* PCR-ITS1 was 7,9% (13/165) and abortion by protozoa (*T. gondii*) was 9,5% (2/21). The incidence of

these diseases may be higher than registered nowadays if equine CNS could be analyzed during clinical diagnosis routine for case conclusion.

Keywords: Equine. Protozoa. Encephalitis. Abortion.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Detalhes do rebanho equídeo brasileiro por região. Número efetivo de animais dos rebanhos de asininos, equinos e muares.	18
Quadro 2 Sequências dos <i>primers</i> utilizados nas reações de <i>nested</i> PCR ITS1 para identificação de protozoários da família Sarcocystidae	44
Quadro 3 Identificação dos equinos positivos à presença de protozoários da família Sarcocystidae pela <i>nested</i> PCR-ITS1 e sequenciamento.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Amostras de SNC de equinos enviadas ao Laboratório de Raiva e Encefalites do Instituto Biológico no período de janeiro de 2006 a junho de 2011 e resultados obtidos	51
Tabela 2 Quadro histopatológico observado nas amostras de sistema nervoso central de equinos com sinais clínicos neurológicos, dos casos negativos para enfermidades virais, bacterianas e parasitárias e positivos para a pesquisa de protozoários da família Sarcocystidae.	53
Tabela 3 Lesões histopatológicas identificadas nas amostras de SNC de equinos e fetos abortados positivas na PCR, quanto ao tipo de infiltrado inflamatório, alterações vasculares e necrose.	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo de vida do <i>Sarcocystis neurona</i>	24
Figura 2 - Ciclo de vida do <i>Neospora caninum</i>	29
Figura 3 Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i>	35
Figura 4 - Corte histológico de SNC (4µm): edema perivascular do neurópilo (aumento 200X).....	55
Figura 5 - Corte histológico de SNC (4µm): edema perivascular do neurópilo (aumento 200X).....	55
Figura 6 - Corte histológico de SNC (4µm): hemorragia do neurópilo (aumento 200X). 56	
Figura 7 - Corte histológico de SNC (4µm): hemorragia perivascular do neurópilo (aumento 200X).....	56
Figura 8 - Corte histológico de SNC (4µm): infiltrado inflamatório perivascular mononuclear intenso no neurópilo (aumento 200X)	57
Figura 9 - Corte histológico de SNC (4µm): congestão meníngea e infiltrado inflamatório (aumento 200X)	57
Figura 10 - Corte histológico de SNC (4µm): necrose multifocal do neurópilo com infiltrado inflamatório mononuclear (aumento 200X).	58
Figura 11 - Corte histológico de SNC (4µm): área de malácia com infiltrado de macrófagos espumosos (aumento 400X).....	58
Figura 12 Corte histológico de SNC (4µm): congestão e edema do neurópilo (aumento 200x).....	59

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1 - Frequência de diversos tipos de lesões histopatológicas nas amostras de SNC positivos pela <i>nested</i> PCR-ITS1.	59
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	18
1.1	<i>Sarcocystis neurona</i>	23
1.2	<i>Neospora</i> spp.	27
1.3	<i>Toxoplasma gondii</i>	34
2	OBJETIVOS	40
3	MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1	AMOSTRAS.....	43
3.2	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE PROTOZOÁRIOS EM AMOSTRAS DE SNC DE EQUINOS	43
3.2.1	Extração do DNA	43
3.2.2	Amplificação das amostras	44
3.2.3	Sequenciamento	46
3.2.3.1	Purificação dos produtos amplificados.....	46
3.2.3.2	Reação de sequenciamento	46
3.2.3.3	Precipitação do DNA	47
3.2.3.4	Eletroforese de sequenciamento	48
3.2.3.5	Análise das sequências.....	48
4	RESULTADOS	50
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS	68

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Brasil possui o maior rebanho de equinos da América Latina, sendo que a movimentação financeira apenas de equinos é de 7,3 bilhões, gerando 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos no complexo do agronegócio do cavalo (MAPA). Este rebanho brasileiro é compreendido por 7.802.598 cabeças de equídeos, sendo 5.496.461 apenas equinos (Quadro 1) (sidra-IBGE, 2009). Considerando apenas a região sudeste, o estado de Minas Gerais possui o maior rebanho de equino e o segundo maior rebanho de muares e o oitavo rebanho de asininos do Brasil, enquanto São Paulo possui o quinto maior rebanho equino, o décimo segundo maior rebanho de muares e o décimo terceiro rebanho de asininos do Brasil (IBGE, 2009).

Quadro 1 Detalhes do rebanho equídeo brasileiro por região. Número efetivo de animais dos rebanhos de asininos, equinos e muares.

Regiões brasileiras	Efetivo do rebanho equídeo brasileiro 2009		
	Equinos	Muares	Asininos
Brasil	5.496.461	1.275.653	1.030.484
Norte	712.235	186.761	38.484
Nordeste	1.375.594	631.054	930.559
Sul	929.055	49.583	4.480
Sudeste	1.357.256	232.981	42.813
Centro-oeste	1.122.321	175.274	14.148

Fonte: IBGE, 2009

A exportação brasileira de equinos vivos em 2009 atingiu US\$ 4,4 milhões. O Brasil é o oitavo maior exportador de carne equina, desconsiderando as exportações feitas pela França, Bélgica, Itália, Rússia e Suíça (países exportadores de carne equina tecnificada) torna-se o quarto maior fornecedor com

10,9% de participação ficando atrás da Argentina (28,7%), Canadá (24,6%) e Polônia (14,6%) (MAPA, Tendências de mercado).

Diante à grande produção de equinos no Brasil, perdas econômicas causadas por mortalidade ou perdas reprodutivas neste plantel simbolizam grandes prejuízos, tanto na produção para o mercado interno quanto para a exportação.

O acompanhamento e discriminação de enfermidades que afetam o sistema nervoso com sintomatologia clínica semelhante e, portanto confundíveis, é de fundamental importância para o conhecimento da ocorrência dessas doenças, análise de possíveis falhas no uso e eficiência de vacinas empregadas e acompanhamento de reservatórios naturais. Com exceção do diagnóstico de raiva, o Estado de São Paulo, atualmente, não dispõe e nem gera estas informações de forma sistematizada, global e em escala.

No Brasil, no período de 2006 a set de 2011, foram reportados 10.374 casos de raiva em herbívoros, sendo que em equinos este número totalizou 780 casos, correspondente a 7,5 % do total (BRASIL, 2012)

Dos materiais encaminhados para exame ao Instituto Biológico, no período de janeiro 2000 a julho de 2006, provenientes de equinos apresentando sinal clínico de encefalite, apenas 21,7% foram positivos para a raiva, e de abril de 2007 a julho de 2010 de 15,4% (16/104) das amostras submetidas ao diagnóstico de raiva foram positivas, havendo necessidade de realização de pesquisa de outros agentes bacterianos, virais e parasitários para conclusão dos casos clínicos (CUNHA et al., 2010)..

Abortamentos e outros distúrbios reprodutivos em equinos são importantes causas de prejuízos financeiros. Doenças nutricionais e infecciosas são, por sua vez, importantes fatores responsáveis por infertilidade em éguas.

Dentre as enfermidades infecciosas associadas a distúrbios reprodutivos que acometem equinos, destaca-se a Leptospirose e o Aborto Equino a Vírus, causado pelo Herpesvírus equino tipo-1 (HVE-1). Estas doenças acometem os equinos com frequência considerável, apesar de já estarem disponíveis recursos eficientes de prevenção e controle como, por exemplo, a vacinação.

Em equinos, infecções causadas pelo HVE-1 estão associadas a abortamentos, mortalidade perinatal, doença respiratória e doença neurológica. A

sintomatologia clínica de ordem reprodutiva em equinos acometidos pelo HVE-1 é muito similar àquela relatada para quadros de neosporose equina, uma enfermidade associada à infecção pelo protozoário coccídio *Neospora caninum* (DUBEY; PORTFIELD, 1990; LINDSAY et al., 1996; PRONOST et al., 1999;).

Sabe-se que *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* são importantes causadores de abortamento em ruminantes no mundo, mas pouco se conhece sobre a manifestação clínica e ocorrência da infecção causada por estes parasitos em equinos.

Hamir et al. (1992) realizaram um estudo retrospectivo de cinco anos (1985-1989) de enfermidades neurológicas, em equinos encaminhados para necropsia na Faculdade de Medicina Veterinária da América do Norte, Pensilvânia, EUA. De um total de 283 equinos necropsiados, 95 (33,6%) foram diagnosticados clinicamente como portadores de encefalomielite/mieloencefalite. Neste estudo foram realizados os testes de imunoperoxidase em amostras de SNC, para diagnóstico de raiva, sendo confirmados quatro animais positivos para raiva (1,4). Com relação ao diagnóstico das demais enfermidades a confirmação foi dada apenas pela necropsia. O diagnóstico clínico apresentado foi de: 70 (25%) casos de mieloencefalite por protozoários (EPM), sete de herpesvírus equino (2,5%), três de encefalite bacteriana (1%), três de encefalomielite equina (1%) e oito (3%) para outras causas. Quando se analisa as frequências apenas nos casos onde os animais apresentaram sintomatologia nervosa (95 animais) as frequências se alteram: 73,7% para EPM, 7,4% para o herpesvírus equino, 4,2% para raiva, 3,1% para encefalite bacteriana, 3,1% para encefalomielite equina e 8,5% para outras causas. Na época não foram realizados testes moleculares bem como não relatam quais técnicas foram utilizadas para detecção de agentes infecciosos ou presença de anticorpos para a conclusão diagnóstica.

A mieloencefalite equina causada por protozoários (EPM) é uma enfermidade neurológica grave geralmente fatal com sinais clínicos variáveis (DUBEY et al., 1991; MACKAY et al., 2000). É uma enfermidade infecciosa não contagiosa, endêmica nas Américas tendo os equinos como hospedeiros intermediários do agente causal e de grande importância econômica (RADOSTITIS et al., 2002). Classicamente a sintomatologia desenvolvida pelos equinos é de assimetria do déficit neurológico, fraqueza, debilidade, andar anormal, além de

debilidade muscular focal. Os sinais menos frequentes são: inclinação da cabeça, paralisia facial, convulsões e mudanças de comportamento. A enfermidade acomete equinos em qualquer idade (GRANSTROM et al., 1998; MACKAY et al., 2000; DUBEY et al., 2001).

Sarcocystis neurona é considerado o principal e mais frequente agente causador da EPM, mas infecções por *Neospora caninum* e *Neospora hughesi* podem determinar enfermidades neurológicas clinicamente indistinguíveis. (MACKAY et al., 2000; DUBEY et al., 2001; SELLON; DUBEY, 2007).

Não existem muitos estudos relacionando lesões histopatológicas com infecção por protozoários da família Sarcocystidae.

Clark et al. (1981) relata lesões histopatológicas em sistema nervoso central de equinos. O primeiro caso era de um animal com 14 anos de idade que apresentou paresia e ataxia de membro posterior que evoluiu para incoordenação de posterior após salto e decréscimo da sensibilidade neurológica, os sinais neurológicos foram se agravando com o decorrer do tempo. Os achados histopatológicos foram edema cerebral, vacuolização da substância branca, infiltrado inflamatório perivascular no neurópilo e na meninge, áreas de malácia, na medula puderam ser observadas áreas de malácia e infiltrado inflamatório multifocal não supurativo, também pode ser visualizado um cisto sem distinção de parede ultraestruturalmente caracterizado dentro do FILO Protozoa, sub-Filo Apicomplexa (Toxoplasma-like). Nos outros órgãos não foram encontradas lesões nem tão pouco outros agentes virais, bacteriológicos e micóticos foram isolados no SNC e órgãos do animal.

O segundo caso relatado por Clark e colaboradores era de um animal com três anos de idade que apresentou paralisia progressiva, hipermetria dos quatros membros durante o trote e caminhada, reflexos lentos com tropeço em obstáculos, mas apresentava-se alerta. Em dois meses houve agravamento do quadro com ataxia, andar em círculos, diminuição do apetite e depressão. Foram realizados exames sorológicos para pesquisa de anticorpos contra o vírus da encefalomyelite equina e *Toxoplasma gondii* com resultados negativos. O animal foi sacrificado e no exame histopatológico pode-se observar no neurópilo e medula espinhal infiltrado inflamatório não supurativo com grande número de células da Glia, células gigantes, macrófagos e linfócitos (CLARK et al., 1981).

Observou-se também necrose de neurônios e axônios, diminuição da mielina, além de acentuada vacuolização. No citoplasma dos neurônios evidenciaram organismos (merozoítos) denominados Toxoplasma-like. A medula espinal também apresentou um processo necrotizante não supurativo. Outros órgãos não apresentaram lesões e neste caso também nenhum agente bacteriano, micótico ou HVE - 1 foram isolados (CLARK et al., 1981).

No Brasil, Barros et al. (1986) relatam casos de EPM em duas éguas de um haras no Rio Grande do Sul com sintomatologia nervosa uma delas veio a óbito e não foi necropsiada, a outra foi sacrificada após evolução do caso que se iniciou com claudicação e incoordenação progressiva de membros posteriores. Microscopicamente as lesões encontradas na medula espinal eram inflamatórias e degenerativas acentuadas principalmente, em meio à presença de microorganismos protozoários, lesões inflamatórias discretas também foram observadas no córtex cerebral.

Também no Brasil, Paixão et al. (2007), detectou *S. neurona* em SNC de égua da raça Puro Sangue Inglês com sete anos de idade. Este animal apresentou inicialmente histórico de ptose de lábio inferior com protrusão de língua e anorexia, este quadro evolui para decúbito decorrente de paralisia de trem posterior. O animal foi eutanaziado e nenhuma lesão macroscópica evidente foi encontrada no SNC. Ao exame histopatológico puderam ser observadas uma severa encefalite multifocal não supurativa em todo SNC. Havia também áreas de congestão, gliose multifocal e infiltrado inflamatório também na meninge. Na imunohistoquímica observaram no neurópilo esquizontes multinucleados e merozoítos nas regiões com infiltrado inflamatório.

1.1 *Sarcocystis neurona*

O protozoário mais comumente associado a EPM é *Sarcocystis neurona* que é um coccídio do filo Apicomplexa, família Sarcocystidae considerado o agente mais comum da EPM na América do Norte. O ciclo de vida completo do agente ainda não está totalmente elucidado embora já se conheçam alguns hospedeiros intermediários naturais que pertencem a uma extensa faixa incluindo guaxinins, lontra do mar, aves, tatus, e marsupiais (RADOSTITIS et al., 2002). Os hospedeiros definitivos são gambas do gênero *Didelphis* spp. Na América do Norte encontra-se a espécie *Didelphis virginiana* enquanto que na América do Sul está presente a espécie *Didelphis albiventris* que se mostrou capaz de transmitir o agente (DUBEY et al., 2001). Os equinos foram considerados hospedeiros acidentais, pois nestes somente esquizontes e merozoítos eram encontrados (DUBEY, 2001). A infecção nesta espécie ocorre através da ingestão de esporocistos presente nas fezes de gambás (Figura 1).

Mackay et al. (2000) considerou os equinos como hospedeiros aberrantes, porque estes se infectam acidentalmente quando ingerem alimentos contaminados com fezes dos gambás, que possuem esporocistos infectantes.

Figura 1 Ciclo de vida do *Sarcocystis neurona*.

Fonte: (<http://sarcocystis.life.cicle.jpg>)

Estudos posteriores, realizados por Mullaney et al. (2005), demonstraram que os cavalos podem ser considerados hospedeiros intermediários naturais da EPM (Figura 1), quando da observação da presença de cistos de *S. neurona* na musculatura e esquizontes no cérebro de um equino positivo para EPM que havia sido eutanasiado. Até então, somente haviam sido encontradas no encéfalo e medula espinhal de cavalos com EPM, apenas formas imaturas do parasito.

A EPM foi pela primeira vez descrita em detalhes por Rooney et al. (1970) e chamada de “mielite segmentária” baseada em 52 casos, onde 38 eram de equinos procedentes de Lexington, Reino Unido e 12 da Filadélfia e outros dois de diferentes locais. O protozoário foi relatado primeiramente em equinos com lesão segmentaria de SNC por três grupos de pesquisadores no ano de 1974 (BEECH, 1974; CUSICK et al., 1974; DUBEY et al., 1974). Cusick et al. (1974) foi o primeiro a descrever um caso de mieloencefalite por protozoário com sinais clínicos, lesões

macroscópicas de SNC e descrição do protozoário. Eles identificaram o protozoário erradamente como *T. gondii* posteriormente caracterizado como *Sarcocystis neurona*, por ilustrarem no trabalho um merozoíto que não continha roptrias e um esquizonte submetido a divisão por endopoligenia (DUBEY et al., 2001). Beech e Dodd (1974) relataram quadro de lesão por protozoário em oito equinos. Dubey et al. (1974, 1976) relataram lesões de SNC por protozoário distinto do *Toxoplasma gondii*, em oito equinos procedentes de Ohio, EUA, além de reexaminar os casos relatados por Cusick et al. (1974) e de Beech e Dodd (1974), concluindo tratar-se de provavelmente de uma espécie do gênero *Sarcocystis*.

A enfermidade foi denominada primeiramente como encefalomielite equina por protozoário por Beech (1974) e depois mieloencefalite equina por protozoários (MAYHEW et al., 1976) e esta denominação perdura até hoje. Estes mesmos autores foram os que primeiramente indicaram tratamento para a doença com medicamentos antiprotozoários. Esta enfermidade ocorre em várias regiões da América do Norte.

O nome do agente causador desta enfermidade foi proposto por Dubey et al. (1991) quando do isolamento deste pela primeira vez em equino procedente de Ithaca, NY. Este animal foi submetido a terapia com corticóide para aumentar as chances de isolamento do agente. Neste mesmo ano Davis et al. (1991a,b) isolaram o *S. neurona* de dois equinos da Califórnia e descreveu o cultivo em células de monócito de bovinos.

A EPM não produz alterações consistentes no hemograma ou na bioquímica sérica (MACKAY, 1997), embora possam existir algumas anormalidades inespecíficas como linfopenia, hiperfibrinogenia, aumento da bilirrubina sérica, uréia e enzimas teciduais, possivelmente relacionadas com estresse, terapia com corticóides, traumas, anorexia e lesões musculares (MACKAY et al., 1992). No líquido cefalorraquidiano (LCR) geralmente não se observam alterações de coloração, celularidade, turbidez, proteína, enzimas, glicose e eletrólitos (DUBEY et al., 2001). Podem ser observadas alterações como elevação na proteína total, pleocitose mononuclear aumento da atividade da creatinofosfoquinase (MACKAY et al., 1992; FENGER, 1997). O LCR é um material importante para diagnóstico *antemortem* da enfermidade, pois permite verificar a presença de anticorpos específicos ant- *S. neurona*, além de permitir que sejam feitos também através dele,

o diagnóstico de outras enfermidades neurológicas infecciosas ou não infecciosas (GRANSTROM et al., 1993; GRANSTROM, 1995).

As lesões de EPM se restringem ao SNC (BEECH; DOOD, 1974; CUSICK et al., 1974; DUBEY et al., 1974). A distribuição das lesões no SNC é multifocal, localizando-se, sobretudo, na medula espinhal, embora o encéfalo também possa estar comprometido (FENGER, 1997). Lesões macroscópicas podem quando presentes revelar áreas multifocais de hemorragia com perda da coloração normal do tecido nervoso e malácia (GRANSTROM; REED, 1994), podendo ser discretas ou extensas (GRANSTROM; SAVILLE, 1998).

Histologicamente as lesões inflamatórias consistem de infiltrado perivascular linfóide contendo macrófagos, eosinófilos e ocasionalmente células gigantes multinucleadas. Extensas áreas de necrose com hemorragia estão presentes nos casos mais graves e agudos (HAHN et al., 1999). Os cistos dos agentes não são comumente encontrados e quando presentes localizam-se dentro dos corpos celulares dos neurônios, células microgliais ou raramente dentro de células endoteliais dos vasos sanguíneos (FENGER, 1997). A rara visualização do agente no SNC, mesmo quando as lesões são extensas sugerem que citocinas/metabólitos celulares podem estar associados com as lesões. A presença de lesões hemorrágicas é comum, mas não explicada, por tratar-se de parasita de localização extra vascular. (DUBEY et al., 2001). Mesmo que não seja possível a visualização do parasita, deve-se suspeitar de EPM quando as alterações histopatológicas forem compatíveis com a doença (HAHN et al., 1999). Mayhew et al. (1976) afirma que em apenas 50% dos casos de EPM os parasitas são encontrados no local das lesões.

Muitos estudos sobre soroprevalência nesta espécie foram feitos nos Estados Unidos demonstrando que esta infecção é comum (BENTZ et al., 1997; BLYTHE et al., 1997; SAVILLE et al., 1997; TILLOTSON et al., 1999).

No Japão o primeiro caso de EPM causada pelo *S. neurona* ocorreu em um animal importado dos Estados Unidos, este apresentou ataxia, incoordenação do membro posterior. Com o agravamento da sintomatologia ele foi eutanaziado. O LCR e soro foram analisados através da técnica de "Western blot" com anticorpo monoclonal anti- *S. neurona* com resultados positivos (KATAYAMA et al., 2003).

No Brasil, esquizontes de *Sarcocystis neurona*-like foram detectados em cortes de cérebro e medula espinal de dois equinos com ataxia e por teste de imunohistoquímica. Destes dois animais um era nativo do Brasil e o outro nascido na Argentina e criado no Brasil, segundo os autores, estes casos sugerem que a existência do hospedeiro definitivo do *Sarcocystis neurona* não está confinada apenas à América do Norte (MASRI et al., 1992).

Outro estudo realizado no Brasil foi para determinar a prevalência de *S. neurona* e *Neospora* spp. em soro de 961 equinos, através de um teste de ELISA. Anticorpos anti SnSAG4 foram detectados em 669 (69,6%) das amostras enquanto que anticorpos anti NhSAG1 foram detectados somente em 24 (2,5%) dos equinos. Estes resultados indicam uma alta concentração de *S. neurona* neste meio ambiente resultando em exposição desta espécie ao parasita (HOANE et al., 2006).

Pela dificuldade em se estabelecer um diagnóstico definitivo de EPM o diagnóstico é presuntivo (pela sintomatologia clínica), mas pode ser confundido com outras enfermidades neurológicas.

1.2 *Neospora* spp.

O *Neospora caninum*, é um protozoário do Filo Apicomplexa, família Sarcocystidae, sub-família Toxoplasmatinae (MUGRIDGE et al., 1999). *Neospora caninum* é semelhante ao *Toxoplasma gondii*, porém estes coccídios diferem na sua estrutura antigênica, imunogenicidade e patogenicidade relacionada ao hospedeiro (DUBEY et al., 2002).

Os taquizoítos de *N. caninum* possuem formas de vida de multiplicação rápida, têm formato ovóide, lunar ou globular, com dimensões de 3 a 7µm de comprimento por 1 a 5µm de largura, dependendo do estágio de divisão em que se encontram. Nos animais infectados, são encontrados em células do sistema nervoso central, macrófagos, fibroblastos, células do endotélio vascular, miócitos, células do epitélio dos túbulos renais e hepatócitos (BJERSKAS; PRESTUS, 1987; DUBEY et al., 1988, 2002; SPEER; DUBEY, 1989).

Os taquizoítos apresentam dois anéis apicais, um anel polar, de oito a 18 roptrias, complexo de Golgi, retículo endoplasmático rugoso e liso, um núcleo e um nucléolo (SPERR; DUBEY, 1989; DUBEY, 2002).

Os oocistos esporulados medem de 11,7 μ m de comprimento por 11,3 μ m de diâmetro, contém dois esporocistos com quatro esporozoítos cada um e esporulam no meio ambiente em 24 horas após a eliminação pelo hospedeiro intermediário (Mc ALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999; DUBEY et al. 2002).

Os cistos teciduais são arredondados ou elípticos, com até 107 μ m de diâmetro, tendo sido encontrados somente em células do sistema nervoso, como cérebro, medula espinhal, nervos e retina (DUBEY et al., 2002). Sua parede é lisa medindo até 4 μ m de espessura, dependendo do tempo de infecção. Os cistos teciduais de *N. caninum* diferenciam-se dos de *T. gondii* pela parede com maior espessura. No interior dos cistos acham-se os bradizoítos, que são delgados, medindo de 6 a 8 μ m de comprimento por 1 a 1,8 μ m de largura e possuem as mesmas organelas presentes nos taquizoítos.

A primeira evidência de infecção por *N. caninum* foi demonstrada por Bjerkas et al. (1984) ao examinarem cérebros de sete filhotes de cães da raça boxer que apresentaram problemas neurológicos. Nestes tecidos, os autores encontraram estruturas semelhantes a cistos teciduais de *T. gondii*, embora não tenham encontrado, no soro destes animais, anticorpos anti-*T. gondii*.

Dubey et al. (1988) realizaram um estudo retrospectivo (de 1948 a 1987) examinando cortes histológicos de 23 cães cuja suspeita da causa da morte foi toxoplasmose. A investigação foi feita através de teste de imunoperoxidase. Dentre os 23 animais, em apenas 13 identificou-se o *T. gondii*. Nos outros dez cortes, foi encontrado um parasito distinto morfológica e antigenicamente de *Toxoplasma gondii* que foi classificado, posteriormente, como um novo gênero e espécie de coccídio, denominado *Neospora caninum*. Os canídeos do gênero canis são a única espécie reconhecida como hospedeiro definitivo do agente, onde ocorre a fase sexuada de multiplicação, resultando na eliminação dos oocistos pelas fezes. Estes se infectam ingerindo tecidos de bovinos e de outras espécies que contenham cistos teciduais, além de oocistos esporulados (transmissão horizontal) e via transplacentária (transmissão vertical). Os oocistos contaminam água e alimentos

consumidos pelos hospedeiros intermediários, dentre os quais os equinos (Mc ALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999).

Figura 2 - Ciclo de vida do *Neospora caninum*

Fonte: (DUBEY, 1999)

Dijkstra et al. (2001), alimentando cães com placenta de bovinos infectados naturalmente com *N. caninum*, observaram que houve eliminação de oocistos através das fezes destes animais, ressaltando a importância dos cães domésticos como transmissor do agente.

A neosporose causada pelo *N. caninum* é uma enfermidade emergente em bovinos e caninos em todo mundo. Este agente causa abortamento e enfermidade do sistema nervoso central em várias espécies de animais, incluindo cães, bovinos, cervídeos, ovinos, caprinos e equinos (DUBEY, 2003).

Em equinos, organismos do gênero *Neospora* têm sido incriminados como agentes causadores de abortamentos, natimortalidade e mortalidade neonatal. (DUBEY; PORTFIELD, 1990; PRONOST et al., 1999; LINDSAY et al., 1996).

Dubey e Portfield (1986) denominaram de parasito *Toxoplasma*-like, um agente detectado em pulmão de feto equino. O abortamento ocorreu dois meses antes do término da gestação, não tendo sido detectado anticorpos anti-*Toxoplasma* no soro da mãe. O estudo histopatológico mostrou um parasito alojado no interior de macrófagos e de outra célula não identificada do alvéolo pulmonar que não era corada pelo “periodic ácid-Schiff” ou com soro anti-*Toxoplasma* marcado com peroxidase. Em 1990, os mesmos autores reexaminaram estes cortes histológicos e concluíram, através de provas imunohistoquímicas, que este caso tratava-se de infecção por *N. caninum*, o que se constitui o primeiro relato de infecção natural por este agente em equinos. Estes achados demonstraram que a transmissão transplacentária nesta espécie pode ocorrer e que o *N. caninum* é mais um dos agentes causadores de abortamento neste hospedeiro.

Lindsay et al. (1996) observou em égua com cegueira parcial, um cisto tecidual de *Neospora* spp no sistema nervoso central.

Neosporose visceral foi descrita em fêmea da espécie equina da raça Appaloosa com histórico de perda de peso e anemia (GRAY et al., 1996). Foram encontradas lesões em linfonodos mesentéricos e intestino delgado do animal, levando os autores a concluírem tratar-se de infecção recente por via oral, pela localização das lesões.

Daft et al. (2007) diagnosticou neosporose em uma égua de 19 anos que apresentava paralisia de membro posterior, comportamento anormal. O protozoário foi observado no sistema nervoso central, medula espinhal e nervos periféricos. O animal apresentou sinais de doença de Cushing o que deve ter contribuído para a imunossupressão e reativação de infecção latente por *Neospora*.

Marsh et al. (1996) descreveu neosporose em equino da raça quarto de milha com 11 anos de idade que apresentou incoordenação motora durante três meses e subitamente desenvolveu quadro de incontinência urinária e agravamento da incoordenação. Foi feito isolamento do parasita em cultivo celular caracterizando uma nova espécie de protozoário do gênero *Neospora*, *N. hughesi*. Esta caracterização foi baseada em diferenças estruturais e moleculares entre as espécies (MARSH et al., 1998, 1999).

Neospora spp também foi identificado por Hamir et al. (1998) em sistema nervoso central e medula espinhal de um cavalo de 20 anos com grave ataxia. Este animal também apresentou adenoma de tireóide. O parasita isolado neste caso foi mais tarde identificado através de métodos moleculares como *Neospora hughesi* (DUBEY et al., 2001).

Outro caso identificado como infecção por *Neospora* foi de um equino da raça quarto de milha com 13 anos de idade, procedente do Alabama, USA. O animal apresentava ataxia e fraqueza no membro posterior durante cinco meses. Na necropsia nenhuma lesão macroscópica foi evidenciada (CHEADLE et al., 1999). O parasito foi isolado em cultivo celular e mais tarde caracterizado, através de testes moleculares, como *N. hughesi* (MARSH et al., 1999).

Até o presente pouco se conhece acerca da patogenicidade e prevalência deste agente em equinos em todo mundo. Nos Estado Unidos é reconhecido como causador de abortamento, enfermidade neonatal e encefalites em equinos. Fazem-se necessários maiores estudos na população equina para conhecer e entender o real impacto deste agente na saúde desta espécie. Lindsay (2001) abre algumas questões acerca deste agente como causador de enfermidade em equinos. Ele questiona que se deve conhecer a causa de enfermidades nervosas em equinos e que se o *N. hughesi* causaria aborto ou enfermidade nervosa nos equino além de que se deve questionar como foi que o animal adquiriu a infecção e se o agente pode ser transmitido verticalmente.

N. hughesi é morfollogicamente similar, mas estruturalmente, antigenicamente e geneticamente diferente do *N. caninum* (MARSH et al., 1998, 1999) e ainda hoje não se conhece muito sobre o ciclo de vida deste parasita.

O primeiro caso de EPM causado pelo *Neospora hughesi* fora dos estados Unidos foi relatado por Wobeser et al. (2009). O protozoário foi identificado como *N. hughesi* tendo sido encontrado em lesões inflamatórias de SNC de um equino adulto com 10 anos de idade, no Canadá. O animal apresentou sinais neurológicos como ataxia, dificuldade em erguer-se, ele foi sacrificado. Os órgãos foram fixados em formalina tamponada 10% e os cortes corados pela hematoxilina eosina. Lesões significantes foram encontradas na porção cervical e SNC, tais como agregado linfocitário multifocal ou circunferencial à massa encefálica. Na medula e cérebro, foram observados linfócitos acumulados ao redor de vasos sanguíneos,

áreas focais de malácia estavam presentes ao redor do neurópilo. Também visualizaram cistos do protozoário medindo de 2 a 4 μm de diâmetro próximo às áreas de malácia. Estes cistos quando realizada a imunohistoquímica com anticorpos monoclonais foram positivos para o *Neospora* spp. e negativo para o *Sarcocystis*. A espécie de *Neospora* foi determinada através de identificação molecular empregando-se sequências ITS1.

Outro relato de caso de mieloencefalite causada pelo *N. huguesi* é o de uma mula com enfermidade motora, anormalidades oculares e andar cambaleante. Neste animal os autores observaram anisocoria, estrabismo, ptose palpebral, déficit do reflexo pupilar, dentre outros. Anormalidades neurológicas incluíam paralisia do nervo facial, atrofia muscular, ataxia e andar cambaleante. Foi realizada biopsia muscular revelando uma atrofia muscular neurogênica o que determina a doença do neurônio motor dos equinos. Para afirmar tratar-se de mieloencefalite pelo *N. huguesi* foram realizados neste caso, apenas testes sorológicos para presença de anticorpos anti-*Sarcocystis neurona* com resultado negativo (título < 5) e imunofluorescência indireta para o *Neospora huguesi* com título de 40, o teste foi realizado com amostras LCRI (FINNO et al., 2010).

Finno et al. (2007) através da sintomatologia clínica e pesquisa de anticorpos anti-*N. hughesi* em soro de três equinos, associaram à EPM como causada por este agente. Os autores concluem ainda que o curso clínico da EPM associado ao a este agente é semelhante ao associado ao *Sarcocystis neurona* devendo os casos suspeitos serem testados para os dois agentes excluindo-se também outras causas de enfermidades neurológicas.

É limitado o número de informações acerca da associação entre infecção por *Neospora* spp. e a ocorrência de abortamentos em equinos, bem como o número de estudos para se avaliar a soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora* em equinos.

Pitel et al. (2003) realizaram um estudo de frequência de ocorrência de anticorpos anti-*Neospora* spp. em éguas que apresentavam falhas reprodutivas, na Normandia, França, usando o teste de aglutinação (NAT). Neste estudo a prevalência de anticorpos no soro de éguas que recentemente haviam abortado foi significativamente mais alta do que a prevalência observada nas amostras de soro

de éguas amostradas para sorodiagnóstico de arterite viral equina e no grupo de animais amostrados para teste de *Fasciola hepatica*.

Um estudo de caso-controle foi realizado por Mc Dole e Gay (2003) para determinar a soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora* spp. determinada pela Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com ponto de corte a diluição de 1:50 e sua possível associação com transtornos reprodutivo, utilizando soro de éguas que apresentaram abortamento (caso) e soro de equinos encaminhados para diagnóstico de anemia infecciosa equina (controle). A variação de títulos no grupo que apresentou abortamento foi de 50 a 12.800 e no grupo de animais sem problemas reprodutivos foi de 50 a 800. Oito por cento dos 160 soros controle e 13% dos 140 soros caso mostraram-se positivos. O valor da “odds ratio” de 1,67(95% CI de 0,79-3,62) indicou segundo os autores, uma fraca correlação entre soropositividade e ocorrência de problemas reprodutivos e que a presença de títulos positivos está associada com a perda fetal em equinos, embora o risco não deva ser elevado como nos bovinos. Os autores concluem que a doença reprodutiva ocorre como consequência de infecção fetal em equinos indicando que mais investigações sobre a participação de *Neospora* spp. na gênese de distúrbios reprodutivos em equinos devam ser conduzidas.

Com o objetivo de verificar a existência de associação entre a presença de anticorpos séricos anti-*Neospora* spp. e a apresentação de história recente de falhas reprodutivas em animais da espécie equina, Villalobos et al. (2006), realizou um estudo com 1106 amostras de soros de equinos divididas em dois grupos, denominados grupos “com falhas reprodutivas” (500 animais) e grupo “sem falhas reprodutivas” (606 animais), pela RIFI para pesquisa de anticorpos anti-*Neospora* spp. Identificou-se 114 animais positivos pela RIFI para o sorodiagnóstico de infecção por *Neospora* spp., dentre os 1106 animais analisados (10,3%). Considerando-se somente as fêmeas, 92 dentre 808 animais (11,3%) foram positivas. A frequência de ocorrência de anticorpos anti-*Neospora* spp. no grupo “com falhas reprodutivas” foi de 15,4% (77/500), valor superior a aproximadamente 2,5 vezes do que o encontrado no grupo “controle” que foi de 6,1% (37/606). Os valores estatísticos obtidos indicam que houve uma associação positiva entre positividade para *Neospora* spp. e a presença de distúrbios reprodutivos. Concluiu-

se que infecção por *Neospora* spp. encontra-se presente na população equina estudada.

A frequência de fêmeas equinas com anticorpos anti-*Neospora* spp. foi significativamente superior na população de animais com problemas reprodutivos em comparação com os animais sem sintomatologia clínica em outro estado do Brasil (LOCATELLI-DIETRICH et al., 2006). Neste estudo os autores revelam também os resultados sobre pesquisa de anticorpos anti- *Neospora* sp. e *T. gondii* em éguas e em potros na fase pré-colostral, através da RIFI. A frequência de *Neospora* sp. foi de 47% (17/36) no ano de 2003 e de 30% (11/36) no ano de 2004, apenas uma égua foi reagente ao *T. gondii* (2,7%), sendo que esta animal era negativo para o *Neospora* spp. Apenas dois potros clinicamente normais, nascidos de mães positivas apresentaram anticorpos anti-*Neospora* spp. Os autores concluem que pelo pequeno conhecimento acerca da patogenicidade destes agentes em enfermidades neurológicas e reprodutivas de equinos é muito importante realizar cultura do material de feto abortado ou SNC, à PCR.

1.3 *Toxoplasma gondii*

A toxoplasmose é uma antroponose parasitária causada pelo *Toxoplasma gondii*. Este agente é um parasita intracelular obrigatório, capaz de infectar vários tecidos de mamíferos e aves (ACHA; SZYFRES, 2003). Este parasita tem distribuição cosmopolita com importância médica e veterinária. O ciclo de vida do parasita envolve o gato e outras espécies de felídeos na sua fase sexuada e como hospedeiros intermediários se incluem os mamíferos e dentre eles os equinos. Nesta espécie a infecção por *T. gondii* é geralmente subclínica e o diagnóstico é feito por técnicas para detectar a presença de anticorpos no soro dos animais (AKCA et al., 2004). Entretanto sintomas como febre, ataxia, degeneração da retina e severa encefalomielite podem ser observados ocasionalmente (McDONALD; CLEARY, 1970; BEECH, 1974; CUSIK et al., 1974).

No sistema nervoso central e na musculatura esquelética dos hospedeiros intermediários podem ser encontrados cistos contendo os bradizoítos

(REMINGTON; CANAUAUGH, 1965). Os hospedeiros definitivos (felídeos) excretam através das fezes oocistos contendo os esporozoítos que quando ingeridos pelos equinos ou outras espécies se transformam em taquizoítos que é a forma invasiva do parasito. O ciclo se completa quando felídeos ingerem cistos teciduais ou oocistos (DUBEY, 1977).

Nos herbívoros a transmissão se dá principalmente pela ingestão de alimentos tais como gramíneas e ração contaminados pelos oocistos. Nos carnívoros e no homem a infecção ocorre pela ingestão de carne crua ou mal cozida com cistos teciduais de *T. gondii* (DUBEY, 1994) (Fig. 3).

Figura 3 Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*.

Fonte: (Dubey et al. 1998)

A participação dos equinos na cadeia epidemiológica da Toxoplasmose tem sido questionada mundialmente. Evidências de que este agente possa causar enfermidades neurológicas em equinos são poucas. Muitos autores assinalam a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em soros de equinos (MACRUZ

et al., 1975; VIDOTTO et al., 1997; DUBEY et al., 1999; MENDONÇA et al., 2001; AKCA et al., 2004; SILVA et al., 2005; VILLALOBOS et al., 2005) mas são raros os isolados deste agente em órgãos desta espécie (MAYER et al., 1968; AL-KHALIDI et al., 1979).

O *Toxoplasma gondii* pode causar encefalomielites em animais de produção, companhia e de laboratório e os equinos estão dentre as espécies domésticas mais resistentes à infecção pelo parasita caracterizada por hiperirritabilidade, incoordenação motora, distúrbios oculares e abortamento (TURNER; SAVVA, 1991).

Embora não existiam evidências definitivas de que *T. gondii* causasse doença clínica em cavalos até o final deste século, em tecido muscular de cavalos saudáveis foram isoladas formas bradizoíticas do agente fato indicativo de que o consumo de carne desta espécie, inadequadamente preparada, possa constituir em via de transmissão para a espécie humana (DUBEY et al., 1985). Este estudo foi reforçado por Dubey et al. (1999) realizando pesquisa de anticorpos através testes de aglutinação direta modificado (MAT) que encontrou uma frequência de 6,9% de animais sorologicamente positivo em matadouros nos Estados Unidos da América (EUA).

Uma das primeiras referências sobre toxoplasmose em equinos foi de Macruz et al. (1974) que observou lesões de hepatite com presença de pseudocistos de *T. gondii* em fetos abortados de 5 a 6 meses de gestação. Neste mesmo ano Dubey et al. (1974) encontraram 4 animais com incoordenação motora e lesões de encefalomielite causadas por protozoários semelhante ao *T. gondii*.

Cusick et al. (1974) constatou a presença destes parasitas em dois equinos com ataxia e incoordenação dos membros posteriores. Mc Donalds e Cleary (1970) relatam que um equino com cegueira e ataxia teve os títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* aumentados na reação de Sabin-Feldman. Eles afirmaram que outro equinos com coriorretinite os títulos destes mesmos anticorpos foram maior ou igual a 1:16.

No Brasil, Macruz et al. (1975) relata o surgimento em equinos Puro sangue Inglês do Estado de São Paulo de casos clínicos caracterizados por incoordenação motora, andar em círculo, abortamento e irritabilidade excessiva

sugerindo tratar-se de toxoplasmose, após eliminação de outras causas. Foram realizadas provas sorológicas nos soros destes animais revelando 100% de positividade ao teste de Sabin-Feldman. A conclusão dos autores foi de que estes animais estavam acometido de toxoplasmose recém-introduzida neste rebanho.

Vários estudos sorológicos para a pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* foram realizados no Brasil, evidenciando a presença do agente em equinos sem sintomatologia clínica. Através da técnica de imunofluorescência indireta foram analisadas 561 amostras de soros de equinos abatidos em matadouros no Estado do Paraná com uma frequência de 31,55% de positividade (VIDOTTO et al., 1997). Na Bahia um inquérito sorológico foi realizado em equídeos procedentes de duas regiões do Estado revelando uma prevalência de 1,5% (5/343), esta baixa prevalência se revelou pelas condições ambientais desfavoráveis para manutenção do agente (MENDONÇA et al., 2001). Villalobos et al. (2005) pesquisou a ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* através da RIFI, em soro de equinos procedentes de propriedades da região do Vale do Ribeira abatidos em matadouros e observou uma alta frequência de anticorpos (47,05%) evidenciando um forte risco de transmissão desta infecção para a espécie humana pela ingestão da carne e manipulação das carcaças. Neste mesmo ano uma pesquisa de anticorpos através do teste de aglutinação indireta (MAT) para o mesmo agente foi realizada no Pantanal, Brasil com uma frequência de positividade de 1,33% (SILVA, 2005).

Atualmente considera-se que os equinos estão entre as espécies domésticas mais resistentes à infecção por *T. gondii*, *embora* nesta espécie tenham sido observados sinais como abortamento, nascimento de fetos com baixa viabilidade, incoordenação e cegueira. Como em muitas outras espécies, o agente pode parasitar o hospedeiro equino sem causar sintomatologia clínica, porém pode ser capaz de causar doença severa na forma congênita (semelhante ao homem) A literatura é muito escassa com relação á Toxoplasmose equina, principalmente porque esta espécie não é uma fonte alimentar importante para o homem (TURNER; SAVVA, 1991; VIDOTTO et al., 1997; DUBEY et al., 1999)

A detecção de doenças causadas por protozoários somente é conclusiva quando é feito o diagnóstico histopatológico conjuntamente com o diagnóstico etiológico, isto porque as lesões neurológicas ou em órgãos fetais que

são encontradas por métodos histopatológicos na ausência do diagnóstico da etiologia, podem ser decorrentes de outras causas que não aquelas promovidas por protozoários. O mesmo raciocínio vale para o encontro de evidências da presença do parasita na ausência de lesões histopatológicas, pois os protozoários da família Sarcocystidae podem ser encontrados em hospedeiros causando lesões crônicas latentes e por isso sem lesões teciduais.

Pelos motivos apresentados apontamos a relevância deste estudo que tem como finalidade pesquisar nestes materiais a presença dos protozoários formadores de cistos: *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp. e *Sarcocystis neurona* em SNC de equinos com sinais clínicos neurológicos bem como em tecido nervoso de feto abortado. Em todos os casos foram realizados estudos histopatológicos para que se pudesse ser associado à lesão com a presença do agente.

O diagnóstico etiológico de protozoários da família Sarcocystidae pode ser feito por meio da PCR. Um dos marcadores mais empregados para este tipo de estudo são os loci ribossômicos. Estes loci são caracterizado por sequências conservadas codificadoras de RNA ribossômico intercaladas por regiões variáveis que por sua vez permitem a discriminação entre as diversas espécies de Sarcocystidae (SILVA et al., 2009; MURADIAN, 2009)

Assim primers direcionados a regiões conservadas neste locus e que franqueiam regiões variáveis permitem amplificar sequências gênicas de uma grande variedade de organismos. O sequenciamento dos produtos da PCR gerados com este procedimento permitirá por sua vez conhecer o fragmento variável e, por conseguinte a espécie do parasito em investigação.

Em razão da necessidade que se tem de verificar a etiologia dos muitos casos inconclusivos de encefalopatia dos equinos, é necessária a investigação de outras patologias que afetam diretamente o sistema nervoso.

No caso de abortamento também é de grande importância o esclarecimento destas causas com a realização de pesquisa sobre possíveis agentes

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Identificar protozoários formadores de cistos: *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp e *Sarcocystis neurona*, com potencial para causar doença neurológica e reprodutiva, em amostras de tecido encefálico de equinos com diagnóstico clínico de encefalopatias e de fetos abortados.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

No período de janeiro de 2006 a junho de 2011 foram encaminhadas ao INSTITUTO BIOLÓGICO (IB) 165 amostras de sistema nervoso central de equinos para diagnóstico de raiva, encefalomielite equina tipo leste e oeste e herpesvírus equino. Foram realizados, diagnóstico virológico para a raiva, PCR para o herpesvírus equino e para os vírus causadores de encefalomielite equina, tipo leste e oeste, exame bacteriológico e histopatológico, segundo procedimento operacional padrão de cada laboratório.

Para o diagnóstico laboratorial de raiva a técnica utilizada foi a imunofluorescência direta, utilizando-se os conjugados anti-rábico, marcados com isotiocianato de fluoresceína, segundo DEAN et al. (1996) e para o isolamento do vírus rábico foram empregados camundongos da linhagem albina CH-3 Rockfeller, adultos jovens, com peso de 11 a 15 gramas e idade aproximada de 21 dias (KOPROWSKY, 1996). A técnica de PCR para a detecção do vírus da encefalomielite do leste foi realizada segundo preconizado por Bronzoni et al. (2004). Para a detecção do HVE-1 nas amostras será utilizada a reação em cadeia pela PCR, conforme propõem Kirisawa et al. (1993). As amostras também serão analisadas para detecção do DNA da *Listeria monocytogenes* pela técnica de PCR descrita por Blais e Philippe (1995).

Encéfalos de equinos negativos para a raiva na prova de imunofluorescência direta (IFD) foram aliquotados em pequenos fragmentos, fixados em formol 10% tamponado e encaminhados para o Laboratório de Anatomia Patológica do IB para diagnóstico histopatológico. O processamento histopatológico seguiu os passos, segundo Barros e Marques, (2003).

Os exames bacteriológicos foram realizados no Laboratório de Bacteriologia Geral do IB. As amostras de fragmentos de SNC de equinos foram submetidas aos seguintes processamentos bacteriológicos segundo Carter et al. (1991); Curtis e Lee, (1995) e WHO (1998).

No ano de 2010 foram encaminhadas para elucidação de causas de abortamento, 21 amostras de feto equino abortado. Foram realizados exames bacteriológicos para pesquisa de *Leptospira* spp e *Brucella* spp.; exame virológico

para pesquisa do HVE-1 e histopatológico, também seguindo o procedimento operacional padrão para cada uma das técnicas.

Os exames bacteriológicos para pesquisa de bactérias causadoras de abortamento a partir de material coletado de feto abortado foram realizados no Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do IB segundo Songer e Post (2005) e OIE (2010). Para a pesquisa de *Leptospira* spp, foi realizada a PCR conforme protocolo descrito por Mérien et al. (1992).

3.1 AMOSTRAS

Foram analisadas 165 amostras de SNC de equinos e 21 amostras de SNC de fetos abortados. Alíquotas de todas as amostras foram armazenadas in natura, a uma temperatura de -80°C, para posterior identificação molecular conforme descrito nos itens que se seguem.

3.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE PROTOZOÁRIOS EM AMOSTRAS DE SNC DE EQUINOS

As etapas de extração de DNA das amostras de SNC e tecidos fetais, PCR, detecção do produto amplificado e sequenciamento dos produtos de PCR correspondem a protocolos estabelecido por Soares et al. (2011).

3.2.1 **Extração do DNA**

Para a extração do DNA. Cada amostra de SNC foi homogeneizada com TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) na proporção de 80% de TE para 20% de tecido. Foram feitas duas alíquotas de homogeneizados de SNC no intuito

de aumentar a chance de detecção desde que existem variações na distribuição e quantidade do parasita nos tecidos a avaliar, segundo proposto por Muradian (2009).

O protocolo para a extração do DNA foi realizado como proposto por Ausubel et al. (1999), em gral e pistilo, por extração enzimática com proteinase K e purificação com solventes orgânicos (fenol – clorofórmio), permanecendo estocado à temperatura de -20°C até a execução das reações de *nested* PCR-ITS1 cada alíquota submetida a extração de DNA acima descrita constituía-se de 500µL de homogeneizado.

3.2.2 Amplificação das amostras

Para a amplificação das sequências de DNA dos protozoários da família Sarcocystidae foi empregada a *nested* PCR- ITS1.

A *nested* PCR ITS1 foi realizada utilizando-se na primeira etapa os primer JS4 (SLAPETA et al., 2002), e CT2c (SOARES et al., 2011), e na segunda etapa, JS4b e CT2b (SOARES et al., 2011), segundo quadro 2.

Quadro 2 Sequências dos *primers* utilizados nas reações de *nested* PCR ITS1 para identificação de protozoários da família Sarcocystidae

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

Para a realização da PCR, com uma reação de 25µL, foi utilizada a seguinte mistura:

- 15,6 µL de água ultrapura
- 2,5 µL de tampão de reação (KCl 8mM: tris-HCl 10mM, pH 9,0, Invitrogen ®)
- 0,5 µL da mistura de dNTPs (10mM de cada nucleotídeo: dATP, dTTP, dCTP, dGTP, Invitrogen ®)
- 1,5 µL do *primer* JS4
- 1,5 µL do *primer* CT2c
- 0,75 µL de MgCl₂ (50mM, Invitrogen ®)
- 0,15 µL de taq DNA polimerase (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen ®)

As amostras foram diluídas na proporção de 22,5 µL da mistura acima e 2,5 µL do DNA extraído, sendo utilizados tubos tipo “Eppendorf” de 200 µL.

Os produtos da PCR foram utilizados como amostras numa segunda etapa (*nested* PCR) utilizando a mesma mistura da reação descrita, exceto pelo uso dos *primers* (nesse caso, JS4b e CT2). Nesse caso as amostras foram diluídas na proporção de 24,5 µL da mistura e 1 µL do produto da PCR, sendo utilizados os mesmos tipos de tubos e termociclador (Mastercycler personal Eppendorf).

O ciclo da PCR e da *nested* PCR consistiu em:

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

Esse ciclo se repetiu mais 35 vezes a partir da desnaturação até a extensão na PCR e na *nested* PCR

Extensão final _____ 72°C por 5 min

A cada corrida foi incluído um controle positivo (DNA extraído de cepa RH de *Toxoplasma gondii*) mantida em nosso laboratório, para PCR e o produto obtido da reação de PCR do DNA extraído de cepa RH, na *nested* e pelo menos dois controles negativos (água ultrapura autoclavada).

Os produtos originados pela *nested* PCR-ITS1 foram dispostos em um gel de agarose a 2% em cuba horizontal com solução tampão TBE pH 8,0 (Tris-borato 0,045 M: EDTA 0,001 M) juntamente com um marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de base e em seguida foram submetidos à eletroforese. Foram analisadas alíquotas de 20 µL de cada amostra. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com banho de solução de brometo de etídeo (solução a 0,5 µg/mL) por 30 minutos e documentado sob transiluminação com luz ultravioleta para visualização das bandas.

3.2.3 Sequenciamento

Nos itens abaixo estão descritas as metodologias realizadas para a obtenção das sequências.

3.2.3.1 Purificação dos produtos amplificados

Os produtos da *nested* PCR-ITS1 de tamanhos esperados foram purificados com a enzima ExoSAP[®] (Affymetrix) conforme instruções do fabricante.

3.2.3.2 Reação de sequenciamento

Para a reação do sequenciamento utilizou-se o “kit” ABI PRISM Big Dye Terminator (Applied Biosystems, CA, USA). Misturou-se 6ng de DNA purificado,

2 μ L Big DyeTM, 1 μ L de Tampão SaveMoney 5x (Tris-HCL 400mM, MgCl₂ 10 mM, 2pmol de cada um dos primer (senso e anti senso) e água q.s.p. 10 μ L. As sequencias do cromatograma foram editadas usando o programa Sequencer 4.1 (Genocodes Corp.).

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

Desnaturação inicial: _____ 96°C por 1 min
Desnaturação: _____ 96°C por 15 seg
Rampa: 1,0°C/seg
Hibridização: _____ 50°C por 15 seg
Rampa: 1,0°C/seg
Extensão: _____ 60°C por 4 min
Rampa: 1,0°C/seg

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 precipitação.

3.2.3.3 Precipitação do DNA

Após o ciclo de sequenciamento, adicionou-se 40 μ L 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 g por 25 minutos.

O sobrenadante foi descartado com o auxílio de pipeta e em seguida adicionou-se 300 μ L de etanol a 60% (v/v em água). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 14.000g por 25 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 em local escuro a -20°C até o sequenciamento.

3.2.3.4 Eletroforese de sequenciamento

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 sequenciamento. Este foi realizado a partir do protocolo do manual técnico do equipamento ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

3.2.3.5 Análise das sequências

Os produtos do sequenciamento resolvidos no sequenciador automático ABI377 (Applied Biosystems, CA, USA). As sequencias derivadas foram submetidas à busca BLAST (blastn, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), a fim de identificar a espécie do parasita, e as sequencias mais similares baixadas e importadas para o software Clustal X. E finalmente, a identidade de nucleotídeos entre cada par de sequências calculada usando o software versão MEGA 4.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Dentre as 165 amostras de SNC, 20 amostras foram positivas para a raiva, três amostras foram positivas para o HVE-1 e nenhuma para encefalomielite equina.

Na tabela 1 constam os totais por ano de amostras de SNC enviadas ao laboratório, número de amostras positivas para cada agente diagnosticado e número de amostras negativas para a presença destes agentes.

Das 165 amostras de SNC de equinos analisadas, 13 (7,9%) foram identificadas como positivas na reação de *nested* PCR-ITS1 e após sequenciamento os agentes identificados, descritos na tabela 1. Os agentes identificados no exame bacteriológico das amostras de SNC de equinos com sintomas neurológicos e positivas na PCR foram: *Corynebacterium* sp, Enterobactéria, *Staphylococcus* sp, Bacilo Gram negativo não fermentador, *Escherichia coli*, Bacilo não fermentador móvel oxidase positivo, *Proteus* sp, *Edwardsiella ictaluri* e *Pantoea agglomerans*.

Das 21 amostras de SNC de feto abortado, duas foram positivas para o herpesvírus equino, cinco positivas para a presença de bactérias patogênicas como: *Rhodococcus equi*, *Enterobacter* spp., *Streptococcus* spp. (beta hemolítico) associado à *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp. associado ao *Bacillus* spp. e *Escherichia coli* (cultura pura) e duas pela reação de *nested* PCR ITS1 para identificação de protozoários da família Sarcocystidae. Após identificação molecular, estas duas amostras revelaram-se sequências de *T. gondii*.

Nas amostras positivas para o HVE-1 as principais lesões histopatológicas encontradas no sistema nervoso central foram: meninge congesta com infiltrado inflamatório mononuclear, marginalização linfocitária, além de congestão e edema do neurópilo com manguito perivascular mononuclear. Estas lesões caracterizam quadro de meningoencefalite não purulenta inespecífica, sugestivas de aborto infeccioso.

Tabela 1 Amostras de SNC de equinos enviadas ao Laboratório de Raiva e Encefalites do Instituto Biológico no período de janeiro de 2006 a junho de 2011 e resultados obtidos

Enfermidade	Ano						total
	2006	2007	2008	2009	2010	2011	
Raiva	5	0	7	4	4	0	20
Encefalomyelitis equina	0	0	0	0	0	0	0
Herpesvírus equino	0	1	1	1	0	0	3
<i>Toxoplasma gondii</i>	0	0	4	0	7	1	12
<i>Sarcocystis neurona</i>	0	0	0	0	1	0	1
negativas	21	29	20	23	30	6	129
Total	26	30	32	28	42	7	165

Os protozoários identificados nas amostras de tecido nervoso de origem equina foram reveladas por identificação molecular. As bandas produzidas pela *nested* PCR-ITS1 em todas as amostras exceto a de número 42 permitiram identificar uma sequência de 393 nucleotídeos idênticos aos de sequências de *T. gondii* disponíveis no Genbank sob os números AY259045, AY259044 e AY1431139. Na eletroforese estas bandas possuíam cerca de 500 pares de base.

A banda produzida pela *nested* PCR-ITS1 na amostra 42 era de cerca de 1000 nucleotídeos. Entretanto apenas 300 nucleotídeos foram sequenciados e a sequência produzida revelou >99% de identidade com sequência homóloga de *S. neurona* (AY009113).

No quadro 3 encontram-se informações referentes ao sexo e a sintomatologia apresentada pelos animais positivos na *nested* PCR-ITS1 para a presença de DNA de protozoários da família Sarcocystidae, bem como o agente determinado através do sequenciamento.

Quadro 3 Identificação dos equinos positivos à presença de protozoários da família Sarcocystidae pela *nested* PCR-ITS1 e sequenciamento.

<i>Amostra</i>	<i>Sexo</i>	<i>Sintomatologia clínica</i>	<i>Agente</i>
26	NI	paralisia progressiva com óbito em 3 dias	<i>T. gondii</i>
46	F	sintomatologia nervosa	<i>S. neurona</i>
48	F	desconforto abdominal, convulsão e morte em 21h	<i>T. gondii</i>
120	M	hipertermia, ataxia, postura incorreta da cabeça, andar cambaleante e em círculos, evoluindo para paralisia, decúbito lateral e morte seis dias	<i>T. gondii</i>
121	M	depressão, membros abertos e cabeça voltada para o solo, lábios flácidos, andar em círculo, inquietação, incoordenação motora, sialorréia, sonolência e choque com obstáculos, midríase, inapetência e morte	<i>T. gondii</i>
122	F	sintomatologia nervosa sugestiva de raiva	<i>T. gondii</i>
123	M	convulsão, alteração de comportamento, tremores, dismetria, cegueira, incoordenação e espasmos musculares	<i>T. gondii</i>
124	NI	NI	<i>T. gondii</i>
133	M	sintomatologia nervosa	<i>T. gondii</i>
28	F	paralisia de trem posterior e anterior por 10 dias	<i>T. gondii</i>
38	F	NI	<i>T. gondii</i>
42	F	incoordenação, ataxia, convulsões, tremores, nistagmo, alteração comportamental	<i>T. gondii</i>
50	F	aparecimento repentino de incoordenação motora (trem posterior) evoluindo em 48h para paralisia desorientação e morte em 3 dias	<i>T. gondii</i>
146	F	Abortamento: entre 5º e 6º mês de gestação	<i>T. gondii</i>
150	F	Abortamento: 4º e 5ª mês de gestação	<i>T. gondii</i>

NI = não informado

Os quadros histopatológicos observados nas amostras negativas e positivas na *nested* PCR-ITS1 para identificação de protozoários da família Sarcocystidae: *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp. e *Sarcocystis neurona* em amostras de SNC de animais com sinais clínicos neurológicos, encontram-se descritas na tabela 2.

Tabela 2 Quadro histopatológico observado nas amostras de sistema nervoso central de equinos com sinais clínicos neurológicos, dos casos negativos para enfermidades virais, bacterianas e parasitárias e positivos para a pesquisa de protozoários da família Sarcocystidae.

Quadro histopatológico	Negativos		Positivos	
	Número	Frequencia (%)	Número	Frequencia (%)
Encefalite não purulenta	5	3,9	1	7,7
Meningoencefalite não purulenta inespecífica	26	20,2	6	46,10
leucoencefalomalácia	21	16,3	2	15,4
Edema e congestão cerebral	8	6,2	2	15,4
Meningite supurada	3	2,3	-	-
Meningoencefalite purulenta	5	3,9	-	-
Edema cerebral	2	1,5	-	-
Congestão cerebral	-	-	1	7,7
Choque séptico	2	3,1	-	-
Meningite não supurativa	2	1,5	-	-
Processo infeccioso por bactéria piogênica	6	4,7	-	-
Encefalite granulomatosa por <i>Cryptococcus neoformans</i>	1	0,8	-	-
Processo infeccioso	2	1,5	1	7,7
Lesões inespecíficas	1	0,8	-	-
Sem alterações	41	31,8	-	-
Impróprio para exame	2	1,5	-	-
Total	129	100	13	100

Na tabela 3 estão agrupadas as principais lesões histopatológicas de cada amostra positiva na *nested* PCR-ITS1, com a finalidade de identificar as lesões mais frequentes nos casos de encefalite e abortamento por protozoários. Nas figuras 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 podem ser observadas estas lesões conforme legenda.

Tabela 3 Lesões histopatológicas identificadas nas amostras de SNC de equinos e fetos abortados positivas na PCR, quanto ao tipo de infiltrado inflamatório, alterações vasculares e necrose.

<i>Amostra</i>	<i>Lesões histopatológicas</i>						
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>G</i>
26	-	-	+	+	-	-	+
28	+	+++	+	+	+	-	-
38	+	-	+	+	-	-	-
42	+	-	+	+	-	-	-
46	+	+++	+	+	+	+++	-
48	+	+	+	+	+++	-	-
50	+	+	+	+	-	-	+
120	+	+	+	+	-	-	-
121	+	-	+	+	-	-	+
122	-	+	+	+	+	+	-
123	-	-	+	+	+++	-	-
124	+	-	+	+	+	-	+
133	+	-	+	+	+	-	-
I46*	-	-	+	+	+++	-	-
I50*	+	+	+	+	-	+	-
TOTAL	11	7	15	15	8	3	4
Frequência	73,3	46,7	100	100	53,3	20	26,6

* feto abortado

Legenda: A Infiltrado inflamatório mononuclear meníngeo
 B Infiltrado inflamatório mononuclear no neurópilo e ou manguito perivascular
 C Congestão meníngea e do neurópilo
 D Edema do neurópilo
 E Hemorragia do neurópilo
 F Necrose multifocal com infiltrado inflamatório mononuclear
 G Área de malácia com infiltrado de macrófagos espumosos

Figura 4 - Corte histológico de SNC (4 μ m): edema perivascular do neurópilo (aumento 200X).

Figura 5 - Corte histológico de SNC (4 μ m): edema perivascular do neurópilo (aumento 200X).

Figura 6 - Corte histológico de SNC (4 μ m): hemorragia do neurópilo (aumento 200X).

Figura 7 - Corte histológico de SNC (4 μ m): hemorragia perivascular do neurópilo (aumento 200X)

Figura 8 - Corte histológico de SNC (4 μ m): infiltrado inflamatório perivascular mononuclear intenso no neurópilo (aumento 200X)

Figura 9 - Corte histológico de SNC (4 μ m): congestão meníngea e infiltrado inflamatório (aumento 200X)

Figura 10 - Corte histológico de SNC (4 μ m): necrose multifocal do neurópilo com infiltrado inflamatório mononuclear (aumento 200X).

Figura 11 - Corte histológico de SNC (4 μ m): área de malácia com infiltrado de macrófagos espumosos (aumento 400X).

Figura 12 Corte histológico de SNC (4 μ m): congestão e edema do neurópilo (aumento 200x).

No gráfico 1 estão ilustradas as frequências de diversos tipos de lesões histopatológicas nas amostras de SNC positivos pela *nested* PCR-ITS1.

Gráfico 1 - Frequência de diversos tipos de lesões histopatológicas nas amostras de SNC positivos pela *nested* PCR-ITS1.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

No período de estudo das amostras encaminhadas suspeita de raiva, encefalomielite equina e HVE-1 apenas 13,9% (23/165) tiveram diagnóstico conclusivo, sendo que, 20 amostras foram positivas para raiva e três para o HVE-1. Nas 20 amostras positivas para raiva não foi realizado exame histopatológico, seguindo as normas dos laboratórios. Estes resultados concordam com os encontrados por Hamir et al. (1992) que num período de cinco anos (1985-1989) encontrou uma frequência de 14,7% (14/95) dos casos suspeitos de enfermidade neurológica de etiologia viral, onde sete eram positivos para HVE-1, quatro para raiva e três para encefalomielite equina.

Com relação à presença de protozoário, no nosso estudo, 7,9% dos casos neurológicos investigados foram confirmados com a presença de parasitos Sarcocistideos pela PCR e sequenciamento O DNA do *T. gondii* estava presente em 12 e *Sarcocystis neurona* em uma amostra de SNC dos equinos com sinais clínicos neurológicos. Na pesquisa de Hamir et al. (1992) esta frequência foi muito maior, onde 24% dos casos eram de mieloencefalite por protozoários, apenas diagnosticadas clinicamente. Entretanto o estudo destes autores é inteiramente baseado em dados de natureza clínica, sem qualquer confirmação diagnóstica o que torna a conclusão destes autores de pouca confiabilidade.

No Brasil houve um decréscimo do número de casos de raiva em equinos nas últimas duas décadas, mais ainda o vírus rábico é o maior causador de encefalopatias nesta espécie (BRASIL, 2012), o que corrobora com este estudo, no qual em 20 das 165 amostras (12,1%), o vírus foi encontrado.

Muito embora a participação dos equinos na cadeia epidemiológica da Toxoplasmose seja questionada mundialmente e que evidências de que este agente possa causar enfermidades neurológicas em equinos sejam poucas, neste estudo ele se mostrou como sendo o parasita Sarcocistideo mais freqüente dentre os pesquisados. Concordando com Turner e Savva (1991) que afirmaram que esta agente pode causar na espécie, encefalomielite caracterizada pó hiperirritabilidade, incoordenação motora, distúrbios oculares e abortamento. Na literatura existem muitos estudos que assinalam a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em soros de

equinos (MACRUZ et al., 1974; VIDOTTO et al., 1997; DUBEY et al., 1999; MENDONÇA et al., 2001; AKCA et al., 2004; SILVA et al., 2005; VILLALOBOS et al., 2005) mas são raros os isolados deste agente em órgãos desta espécie (MAYER et al., 1968; AL-KHALIDI et al., 1979).

No Brasil existem muitas evidências sorológicas da presença do *Toxoplasma gondii* na espécie equina (MENDONÇA et al., 1997; MENDONÇA et al., 2001; SILVA, 2005; VILLALOBOS et al., 2005) e também um estudo de prevalência de anticorpos para o *S. neurona* e *Neospora* spp. realizado por Hoane et al. (2006) que encontrou uma prevalência de 69,6% para a presença de anticorpos anti-*S. neurona* e baixa para o *Neospora* spp. (2,5%). Concordamos com este autor, que no Brasil a presença de *S. neurona* no meio ambiente resulta em exposição desta espécie ao parasita principalmente, pela presença de gambás da espécie *Didelphis albiventris*, já comprovada com hospedeiro definitivo deste protozoário (DUBEY et al., 2001). As evidências sorológicas puderam ser confirmadas pelos resultados dos testes moleculares e histopatológicos realizados neste trabalho.

Os exames bacteriológicos das amostras de sistema nervoso central de animais com sinais neurológicos e positivos na PCR para protozoários da família Sarcocystidae não revelaram a presença de bactérias em cultura predominante ou cultura pura que justificassem ser causa de encefalopatias. Nos animais que tiveram uma sintomatologia nervosa mais acentuada foi possível evidenciar várias lesões ao exame histopatológico que concordam com o diagnóstico molecular.

Os sinais clínicos neurológicos observados nos casos positivos aqui estudados (Quadro 3) se assemelham aos descritos por Mc Donalds e Cleary (1970); Beech, (1974); Cusick et al. (1974); Masri et al. (1992); Mersh et al. (1996); Granstrom et al. (1998); Cheadle et al. (1999); Dubey et al. (2001); Mackay et al. (2001); Katayama et al. (2003) e Daft et al. (2007).

Os resultados de provas biomoleculares sensíveis e específicas para os agentes da família Sarcocystidae devem ser complementadas pela associação dos achados histopatológicos, pois a presença de lesões no SNC auxilia na interpretação do caso, se havia infecção ativa, ou animal era apenas portador assintomático. Todos os materiais positivos para *S. neurona* ou *T. gondii* apresentaram algum tipo de alteração (infiltrado inflamatório meníngeo/neurópilo), congestão/edema, hemorragia, necrose, malácia, indicando a ação de patógeno

neurotrópico, sendo que 93,3% (14/15) indivíduos foram positivos para *Toxoplasma gondii* pela PCR. Em especial, apenas o animal 46 (6,7%) foi positivo para *Sarcocystis neurona* pela PCR e as lesões observadas neste indivíduo corroboram com os achados de Paixão et al. (2007).

As principais lesões histopatológicas encontradas nas amostras de SNC de equinos com sintomatologia nervosa e negativas para a presença de parasitas Sarcocistídeos foram 20,2% de meningoencefalite não purulenta inespecífica, 16,3% de leucoencefalomalácia, sendo que a maior frequência foi de amostras sem alteração histopatológica (31,8%). Quadro diferente foi encontrado nas amostras positivas para a presença de protozoários da família Sarcocystidae: todas amostras apresentaram alguma alteração, 46,10% apresentaram quadro de meningoencefalite não purulenta inespecífica seguida de leucoencefalomalácia e congestão cerebral, cada uma com uma frequência de 15,4%.

Vale ressaltar que nos casos de EPM relacionados à *S. neurona*, o parasito predomina em áreas de medula e não de encéfalo (FENGER, 1997), e nas amostras analisadas neste estudo todas eram provenientes de encéfalo. Por essa razão a frequência de ocorrência de *S. neurona* nas amostras do presente estudo pode ter sido subestimada.

As lesões inflamatórias, áreas de necrose, edema e hemorragia observadas por nós concordam com as relatadas por Hahn et al. (1999); Dubey et al. (2001) e Wobeser et al. (2009). Não foi possível observar cistos dos protozoários nos cortes histológicos reforçando a ideia de Mayhew et al. (1976) que afirmou que nem sempre os parasitas são visualizados nos casos positivos para EPM. Barros et al. (1986) também relata lesões inflamatórias e degenerativas em um caso de EPM além de observar a presença de parasitos protozoários nos cortes histológicos.

Este trabalho reforça a ideia de Macruz et al. (1975) de que o *Toxoplasma gondii*, pode determinar casos clínicos caracterizados por incoordenação motora, andar em círculo, abortamento e irritabilidade dentre outros principalmente após eliminação de outras causas. Dubey et al. (1974) encontraram quatro animais com incoordenação motora e lesões de encefalomielite causadas por protozoários semelhantes ao *T. gondii*.

Com relação às amostras de feto abortado, os exames virais e bacteriológicos permitiram elucidar a causa de abortamento em sete das 21 amostras analisadas. Além destes resultados duas amostras foram positivas pela PCR para a presença de protozoários da Família Sarcocystidae, sendo que pela investigação molecular, o parasito revelado foi *Toxoplasma gondii*. Assim, a frequência de abortamento por causa infecciosa foi de 42,9% (9/21) incluindo agentes virais bacterianos e parasitários, e de casos inconclusivos de 57,1 % (12/21).

Das amostras de SNC de feto abortado analisadas detectou-se a presença do *T. gondii* em duas delas o que corrobora com os resultado de Macruz et al. (1974) que observou lesões de hepatite com presença de pseudocistos de *T. gondii* em fetos abortados de 5 a 6 meses de gestação, mesma faixa gestacional dos fetos analisados e com Turner e Savva (1991) que afirma que o agente pode causar abortamento nas espécie domésticas, dentre elas o equino.

As lesões histopatológicas observadas nos dois casos de abortamento positivos na *nested* PCR-ITS1(Tabela 3) sugerem tratar-se de abortamento infeccioso a ser esclarecido. Estes materiais foram negativos para *Brucella* spp. e *Leptospira* spp., concluímos então tratar-se de abortamento infeccioso pelo *T. gondii*.

Com relação aos resultados dos exames histopatológicos as principais lesões encontradas nos matérias positivos na *nested* PCR-ITS1 para presença de protozoários da família Sarcocystidae foram: infiltrado inflamatório mononuclear, congestão meníngea e congestão, edema e hemorragia do neurópilo, estas lesões concordam com os resultados encontrados por Clark et al. (1981) em dois animais do Canadá e no Brasil por Paixão et al. (2007). Nos matérias analisados por estes dois autores também não foram isolados nenhum agente viral, bacteriano e micótico.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Pouco se conhece no Brasil acerca da frequência de agentes que causam enfermidades neurológicas dos equinos. Este trabalho permitiu conhecer parte deste universo pela análise de resultados de exames negativos para enfermidades virais dos equinos que é um grande problema em nosso país, revelando a presença de DNA de *Toxoplasma gondii* e *Sarcocystis neurona* em amostras de SNC de equinos que desencadearam sintomatologia nervosa e vieram a óbito. Em amostras de feto abortado detectou-se o DNA do *Toxoplasma gondii* confirmando a prevalência deste agente também na espécie equina, causando abortamento.

O *Toxoplasma gondii* foi o agente mais frequentemente encontrado nas amostras analisadas seguido do *Sarcocystis neurona*. Com relação ao *Neospora hughesi* não foi evidenciada a sua presença nas amostras estudadas indicando que mais estudos devam ser realizados.

Casos de doença neurológica em equinos com sinais clínicos semelhantes aos descrito neste estudo e abortamento, não são incomuns em nosso meio, porém a etiologia nestes casos nem sempre é adequadamente investigada. A incidência da EPM e abortamento por protozoários poderia revelar-se maior, caso o estudo do SNC de equinos fosse executado rotineiramente para a conclusão de casos clínicos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Toxoplasmosis. In: ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes ao hombre y los animales**. 3. ed. Washington: Organización Panamericana de La Salud, 2003. v. 3, p. 88-100.
- AKCA, A.; BABUR, C.; ARSLAND, M. O. GICIK, Y.; KARA, M.; KILIC, S. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in horses in the province of Kars, Turkey. **Veterinarni Medicina**, v. 49, n. 1, p. 9-13, 2004.
- AL-KHALIDI, N. W.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in horses. **Journal of Parasitology**, v. 68, p. 331-334, 1979.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SIEDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Short protocols in molecular biology**. 4. ed. New York: Wiley e Sons, 1999. 1512 p.
- BARROS, C. S. L.; BARROS, S. S.; SNATOS, M. N.; SILVA, C. A. M.; WAIHRICH, F. Mileoencefalite equina por protozoário. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 6, n. 2, p. 45-49, 1986.
- BARROS, C. S. L.; MARQUES, G. H. F. **Procedimentos para o diagnóstico das doenças do sistema nervoso central de bovinos**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal, 2003. 50 p.
- BEECH, J. Equine protozoon encephalomyelitis. **Veterinary Medicine & Small Animal Clinician**, v. 69, p.1562-1566, 1974.
- BEECH, J.; DODD, D. C. Toxoplasma-like encephalomyelitis in the horse. **Veterinary Pathology**, v. 11, p. 87-96, 1974.
- BENTZ, B. G.; GRANSTROM, D. E.; STAMPER, S. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in a country of southeastern of Pensilvania. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 210, p. 517-518, 1997.
- BJERSKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Undetified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeithschrift Fuer Parasitenkunde**, v. 70, n. 2, p. 271-274, 1984.
- BJERSKAS, I.; PRESTHUS, J. A neuropathology in Toxoplasma-like infection caused by a newly recognized cyst forming sporozoan in dogs. **Acta Pathologica Immunology Scandinavica**, v. 97, p. 459-488, 1982.
- BLAIS, B. W.; PHILLIPPE, L. M. Identification of presuntive positive *Listeria monocytogenes* from foods polymerase chain reaction. HPB Laboratory Procedure (MFLP-78). Ottawa: Polyscience Publications, Morin Heights, P. Q., 1995. (**Compendium of Analytical Methods**, v. 3).

BLYTHE, L. L.; GRANSTROM, D. E.; HANSEN, D. E.; WALKER, I. I.; BARTLETT, J.; STAMPER, S. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in Oregon. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 210, p. 525-527, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura pecuária e Abastecimento. Programa nacional de Controle da raiva dos herbívoros e outras Encefalopatias. **Dados sobre a Raiva em herbívoros e Suínos no Brasil**. 30 de outubro de 2011. Disponível em: http://agricultura.gov.br/sanidade_animal. Acesso em 11 de fev. 2012.

BRONZONI, R. V. M.; MORELI, M. L.; CRUZ, A. C. R.; FIGUEIREDO, L. T. M. Multiplex nested PCR for Brazilian *Alphavirus* diagnosis. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, p. 456-461, 2004.

CARTER, R. G.; CHENGAPPA, M. M. **Essentials of veterinary bacteriology and mycology**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. 284 p.

CLARK, E. G.; TOWNSEND, H. G. G.; MCKENZIE, N. T. Equine protozoal myeloencephalitis: a report of two cases from Western Canada. **Canadian Veterinary Journal**, v. 22, p. 140-144, 1981.

CUNHA, E. M. C.; LARA, M. C. C. S. H.; VILLALOBOS, E. M. C.; NASSAR, A. F. C.; SCANAPIERO, E. M.; CUNHA, M. S.; MORI, E.; GOMES, M. N. Diagnóstico de la rabia: una herramienta para la detección de otras encefalitis em equinos In: INTERNATIONAL MEETING ON RABIES IN THE AMÉRICA, 21., 2010, México. **Abstracts...**, 2010. Pen drive.

CURTIS, G. D. W.; LEE, W. H. Culture media and methods for the isolation of *Listeria monocytogenes* **International Journal Food Microbiology**, v. 26, p. 1-13, 1995.

CUSICK, P. K.; SELLS, D. M.; HAMILTON, D. P.; HARDEBROOK, H. J. J. Toxoplasmosis in two horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.164, p.77-80, 1974.

CHEADLE, M. A.; LINDSAY, D. S.; ROWE, S.; DIKSTRA, C. C.; WILLIAMS, M. A.; SPENCER, J. A.; TOLVIO-KINNUCAN, M. A.; LENZ, S. D.; NEWTON, J. C.; BLAGBURN, B. L. Prevalence of antibodies in horses from Alabama and characterization of one isolate recovered from naturally infected horse. **International Journal of Parasitology**, v. 29, p. 1537-1543, 1999.

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

DAVIS, S. W.; DAFT, B. M.; DUBEY, J. P. *Sarcocystis neurona* cultured in vitro from a horse with equine protozoal myelitis. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, p. 315-317, 1991a.

DAVIS, S. W.; SPEER, C. A.; DUBEY, J. P. In vitro cultivation of *Sarcocystis neurona* from the spinal cord of a horse with equine protozoal myelitis. **Journal of parasitology**, v. 77, p. 789-792, 1991b.

DEAN, D. J.; ALBELSETH, M. K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKY, H. **Laboratory techniques in rabies**. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 80-87.

DEAN, D.J.; ALBELSETH, M. K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKY, H. **Laboratory techniques in rabies**. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 80-87.

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

DUBEY J. P.; PORTERFIELD, M. L. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in aborted equine foetus. **Journal of Parasitology**, v. 76, p.732-734, 1990.

DUBEY, J. P. Neosporosis - the first decade of research. **Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1485-1488, 1999.

DUBEY, J. P. *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnoitia*, *Sarcocystis* and other tissue cyst-forming coccidian of man and animals. In: KREIGER, J. P. (Ed.). **Parasitic protozoa**. New York: Academic Press, 1977. p. 101-237.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, n. 11, p. 1593-1598, 1994.

DUBEY, J. P. A review of *Sarcocystis* of domestic animals and of other coccidian of cats and dogs **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 169, p. 1061-1078, 1976.

DUBEY, J. P. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in tissues of equids fed oocysts. **American Journal Veterinary Research**, v. 46, p. 1753-1754, 1985.

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

DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERSKAS, I.; BJORKMAN, C.; BLAGBURN, B. L.; BOWMAN, D. D.; BUXTON, D.; ELLIS, J. T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D. E.; HOWE, D. K.; EKINS, M. C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A. E.; MATTSSON, J.; MCALLISTER, M. M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L. D.; SPEER, C. A.; TREES, A. J.; UGGLA, A.; UPTON, S. J.; WILLIAMS, D. J. L.; LINDSAY, D. S. Redescription of *Neospora caninum* DUBEY, CARPENTER, SPEER, TOPPER, UGLA, 1988 and its differentiation from related coccidian. **Journal of Parasitology**, v. 32, n. 8, p. 929-946, 2002.

DUBEY, J. P.; DAVIS, G. W.; KOESTNER, A.; KIRYU, K. Equine encephalomyelitis due to a protozoan parasite resembling *Toxoplasma gondii*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 165, n. 3, p. 249-255, 1974.

DUBEY, J. P.; DAVIS, S. W.; SPERR, C. A.; BOWNMAN, D. D.; DE LANHUTA, A.; GRANSTROM, D. E.; TOPPER, M. J.; HAMIR, A. N.; CUMMINGS, J. F.; SUTER, M. M. *Sarcocystis neurona* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa), the etiologic agent of equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of Parasitology**, v. 77, p. 212-218, 1991.

DUBEY, J. P.; HATTEL, A. L.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 10, p. 1259-1263, 1988.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SAVILLE, W. J. A.; REED, S. M.; GRANSTROM, D. E.; SPEER, C. A. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, v. 95, p. 89-131, 2001.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPERR, C. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n.2, p. 267-299, 1998.

DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P.; ROMAND, S.; KNOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; GAMBLE, H. R. Serologic prevalence of *Toxoplasma gondii* in horses slaughtered for food in North America. **Veterinary Parasitology**, v. 86, p. 235-238, 1999.

FENGER, C. K. Equine protozoal myeloencephalitis. In: ROBINSON, N. R. **Current therapy in equine medicine**. Philadelphia:W.B. Saunders Company, 1997. v. 4, p.329-332.

FINNO, C.J.;ALEMAN, M.;PUSTERDA, N. Equine protozoal myeloencephalitis associated with neosporosis in 3 horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 88, p. 1405-1408, 2007.

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

GRANSTROM, D. E. Recent advances in the laboratory diagnosis of equine parasitic diseases. *Veterinary Clinics of North America*. **Equine Practice**, v. 11, n. 5, p. 437-442, 1995.

GRANSTROM, D. E.; DUBEY J. P.; DAVIS, S. W.; FAYER, R.; FOX,J. C.; POONACHA, K. B.; GILES, R. C.; COMER,P. F. Equine protozoal myeloencephalitis; antigen analysis of cultured *Sarcocystis neurona* merozoites. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, p. 88-90, 1993.

GRANSTROM, D. E.; REED, S. M. Equine protozoal myeloencephalitis. **Equine Practice**, v. 16, p. 23-26, 1994.

GRANSTRON, D. E.; SAVILLE, W. J. Equine protozoal myeloencephalitis. In: REED, S. M.; BAYLY, W. M. (Ed.). **Equine internal medicine**. Philadelphia: WB Saunders Company, 1998. p. 486-491.

GRAY, M. L.; HARMON, B. G.; SALES, L.; DUBEY, J. P. Visceral neosporosis in a 10-year-old horse. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, p. 130-133, 1996.

HAHN, C. N.; MAYHEW, L. G.; MACKAY, R. J. Diseases of multiple or unknown sites. In: COLAHAN, P. T.; MERRITT, A. M.; MOORE, J. N.; MAYHEW, I. G. **Equine medicine and surgery**. 5th ed. St Louis: Mosby, 1999. v. 1, p.895-898,1999.

HAMIR, A. N.; MOSER, G.; RUPPRECHT, C. E. A five year (1985-1989) retrospective study of equine neurological diseases with special reference to rabies. **Journal of Comparative Pathology**, v. 106, p. 413-421, 1992.

HAMIR, A. N.; TORNQUIST, S. J.; GEROS, T. C.; TOPPERR, M. J.; DUBEY, J. P. *Neospora caninum* associated equine protozoal myeloencephalitis. **Veterinary Parasitology**, v. 79, p. 269-274, 1998.

HOANE, J. S.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; RIBEIRO, M. G.; BORGES, A. S.; YAI, L. E. O.; AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; BONESI, G. L.; HOWE, D. K. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora* spp. Infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p. 155-159, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção pecuária Municipal (PPM), 2009. Disponível em http://ibge.gov.br/home/estatística/economia/ppm/2009/default_pdf.shtm> Acesso em 27/05/2011

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sistema IBGE de recuperação Automática (SIDRA). **Banco de Dados Agregados**; Efetivo/Rebanhos. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2&z=24&u1=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1&u2=3>> Acesso em 30/05/2011

KATAYAMA, Y.; WADA, R.; KANEMARU, T.; SASAGAWA, T.; UCHIYAMA, T.; MATSUMAR, T.; ANZAI, T. First case of *Sarcocystis neurona* induced equine protozoal myeloencephalitis in Japan. **Journal of Medical Veterinary Science**, v. 65, n. 6, p. 757-759, 2003.

KIRISAWA, R.; ENDO, A.; IWAI, H.; KAWAKAMI, Y. Detection and identification of equine herpesvirus 1 and 4 by polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v. 36, n. 1-2, p. 57-67, 1993.

KOPROWSKY, H. Routine laboratory procedures: The mouse inoculation test. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKY, H. **Laboratory techniques in rabies**. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 88-96.

LINDSAY, D. S. Neosporosis: an emerging protozoal disease of horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 33, n. 2, p. 116-118, 2001.

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

LINDSAY, D. S.; UPTON, S. J.; DUBEY, J. P. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. **International Journal of Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1521-1523, 1999.

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

MACKAY, R. Equine protozoal myeloencephalitis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 13, p. 79-86, 1997..

MACKAY, R. J.; GRANSTROM, D. E.; SAVILLE, W.; Reed, S. M. Equine protozoal myeloencephalitis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice** v. 16, p. 405-425, 2000.

MACKAY, R.; DAVIS, S. W.; DUBEY, J. P. Equine protozoal myeloencephalitis. **Compendium on Continuing Education Practice Veterinary**, v. 14, n. 10, p. 1359-1367, 1992.

MACRUZ, R.; HUTYRA, V.; CENCI, O.; ISHIZUKA, M. M. Ocorrência da toxoplasmose em equinos: In; CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo.[Anais...] São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1974. 656p.

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

MARSH A, E.; HOWE, D. K.; WANG, G.; BARR, B. C.; CANNOM, N.; CONRAD, P. A. Differentiation of *Neospora hughesi* from *Neospora caninum* based on their immunodominant surface antigen, SAG1 and SRS2. **International Journal of Parasitology**, v. 29, p. 1575-1582, 1999.

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

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

MASRI, M. D.; LOPEZ DE ALDA, J.; DUBEY, J. P. *Sarcocystis neurona*-associated ataxia in horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 44, p. 311-314, 1992.

MAYER, H. F.; BOEHRINGER, I. K. Nuevos aislamientos de *Toxoplasma gondii* de material humano x animal. **Revista da la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata**, v. 10, p. 175-180, 1968.

MAYHEW, L. G.; DELAHUNTA, A.; WHITLOCK, R. H.; POLLOCK, V. H. Equine protozoal myeloencephalitis. In: ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONER, 22, 1976, Dallas. **Proceedings...** Dallas: AAEP; 1976, p. 107-114.

MC ALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; McGUIRRE, A. Dog are the definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, 1998.

MC DONALD, D. R.; CLEARY, D. J. Toxoplasmosis in the equine. **Southwest Veterinary**, v. 23, p. 212-214, 1970.

MCDOLE, M. G.; GAY, J. M. Seroprevalence of antibodies against *Neospora caninum* in diagnostic equine serum samples and their possible association with fetal loss. **Veterinary Parasitology**, v.105, p. 257-260, 2002.

McDONALDS, D. R.; CLEARY, D. C. Toxoplasmosis in the equine. **Soutwest Veterinary**, v. 23, p. 213-214, 1970.

MENDONÇA, A. O.; CERQUEIRA, J. L.; ARAUJO, W. N.; SILVA, M. S.; SHIMABUKURO, F. H.; SARKIS, D. T.; SHERLOCK, I.; LANGONI, H. Inquérito sorológico para toxoplasmose em eqüídeos procedentes de duas regiões da Bahia, Brasil. **Semina: Ciencias Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 115-118, 2001.

MÉRIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SANINT-GIRONS, T. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 2219-2224, 1992

MUGRIDGE, N. B.; MORRISON, D. A.; HECKEROTH, A. R.; JOHNSON, A. M.; TENTER, A. M. 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 of Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1545-1556, 1999.

MULLANEY, T.; MURPHY, A. J.; KIUPEL, M.; BELL, J. A.; ROSSANO, M. G.; MANSFIELD, L. S. "Evidence to support horses a natural intermediate host for *Sarcocystis neurona*". **Veterinary Parasitology**, v.133, p. 27-36, 2005.

MURADIAN, V. **Isolamento e caracterização molecular e biológica de *Toxoplasma gondii* e pesquisa de *Neospora caninum* em roedores urbanos da Grande São Paulo**. 2009. 109 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PAIXÃO, T. A. S.; RÊGOL, I. O. P.; SANTOS, R. L. Anti-Sarcocystis neurona immunostaining associated with equine protozoal myeloencephalitis in Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 6, p. 1820-1823, 2007.

PITEL, P.H.; PRONOST, S.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; FORTIER, G.; BALLEST, J. J. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horses in France. **Equine Veterinary Journal**, v. 33, p. 205-207, 2001.

PRONOST, S.; PITEL, P. H. ; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; COLLOBERT, C.; FORTIER, G. *Neospora caninum* première mise en évidence en France sur un avorton équin, analyse et perspectives. **Pratique Veterinaire Equine**, v. 31, p. 31-34, 1999.

RADOSTITIS, M.; GAY, C.; BLOOD, C.; HINCHCLIFF, W. Clínica Veterinária; Um Tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 1187-1189.

REMYINGTON, J. S.; CAVANAUGH, E. N. isolation of the encysted form of *Toxoplasma gondii* from human skeletal muscle and brain. **New England Journal of Medicine**, v. 273, p.1308-1310, 1965.

ROONEY, J. R.; PRICKET, M. E.; DELANEY, F. M.; CROWE, F. W. Focal myelitis-encephalitis in horses. **Cornell Veterinary**, v. 50, p. 78-79, 1970.

SAVILLE, W. J.; REED, S. M.; GRANSTRON, D. B.; HINCHCLIFF, K. W.; KOHN, C. W.; WITTUN, T. E.; STAMPER, S. Seroprevalence of antibodies to sarcocystis neurona in horses residing in Ohio. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 210, p. 519-525, 1997.

SELLON, D. C.; DUBEY, J. P. Equine protozoal myeloencephalitis. In: SELLON, D. C.; LONG, M. T. **Equine infectious diseases**. St. Louis, MO: Saunders-Elsevier, 2007. p. 4653-464.

SILVA, A. M. S. S. Antibodies to *Toxoplasma gondii* in horses from Pantanal, Brazil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 12, n. 1/2, p. 20-24, 2005.

SILVA, M. S. A.; UZÊDA, R. S.; COSTA, K. S.; SANTOS, S. L.; MACEDO, A. C. C.; ABE-SANDES, K.; GONDIM, L. F. P. Detection of *Hammondia heydorni* and related coccidia (*Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*) in goats slaughtered in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.162, p.156-159, 2009.

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

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

SONGER, J. G.; POST, K. W. **Veterinary microbiology. Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease**. Ed. Elsevier Saunders, St Louis, Missouri, 434 p.

SPEER, C. A.; DUBEY, J. P. Ultrastructure of tachyzoites, bradizoites, and tissue cysts of *Neospora caninum*. **Journal of Protozoology**, v. 36, p. 458,463, 1989.

TILLOTSON, K. Mc; CUE, P. M.; GRANSTROM, D. E.; DARGATZ, D. A.; SMITH, M. O.; TRAUBA-DARGATZ, J. I. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in northern Colorado. **Journal of equine Veterinary Science**, v. 19, p. 122-126, 1999.

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

VIDOTTO, O.; KANO, F. S.; FREIRE, R. L.; MITSUKA, R.; OGAWA, L.; BONESI, G.; NAVARRO, I. T.; FRANCISCON, F. S. G. Ocorrência de anticorpos anti- *Toxoplasma gondii* em equinos procedentes de quatro Estados (SP, PR, MS e MT) abatidos em Apucarana, PR. Brasil, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.18, n.1, p. 9-13, 1997.

VILLALOBOS, E. M. C.; UENO, T. E.; SOUZA, S. L.; CUNHA, E. M. S.; LARA, M. C. C. S. H.; GENNARI, S.; SOARES, R. M. Association between the presence of serum antibodies against *Neospora* spp. and fetal loss in equines. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3-4, p. 372-375, 2006

VILLALOBOS, E. M. C.; LARA, M. C. C. S. H. L.; CUNHA, E. M. S.; SOARES, R. M. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em soro de equídeos oriundos de propriedades da região do vale do Ribeira, Estado de São Paulo e abatidos em matadouro no Estado do Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 24, 2005. Suplemento, 2.

WOBESER, B. K.; GODSON, D. L.; REJKMANEK, D.; DOWLING, P. Equine protozoal myeloencephalitis caused by *Neospora hughesi* in an adult horse in Saskatchewan. **Canadian Veterinary Journal**, v. 50, p. 651-653, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of epidemic meningococcal disease: WHO Practical Guidelines, 2 ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1998, 84 p.