Luciana Ahlf Bandini

**Infecção experimental de cães (*Canis familiaris*) com oocistos
esporulados de *Neospora caninum***

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências**

São Paulo

2009

Luciana Ahlf Bandini

**Infecção experimental de cães (*Canis familiaris*) com oocistos
esporulados de *Neospora caninum***

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.**

**Área de concentração: Biologia da Relação
Patógeno-Hospedeiro**

Orientadora: Profa Dra Solange M. Gennari

São Paulo

2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Bandini, Luciana AHLF.

Infecção experimental de cães (*Canis familiaris*) com oocistos esporulados de *Neospora Caninum* / Luciana AHLF Bandini. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Solange Maria Gennari.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Epidemiologia de parasitas.

Versão do título para o inglês: Experimental infection of dogs (*Canis familiaris*) with sporulated oocysts of *Neospora caninum* .

Descritores: 1. *Neospora caninum* 2. Oocistos esporulados 3. Infecção experimental 4. Cães
I. Gennari, Solange Maria II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0203/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Luciana AHLF Bandini.

Título da Dissertação: Infecção experimental de cães (*Canis familiaris*) com oocistos esporulados de *Neospora Caninum*.

Orientador(a): Solange Maria Gennari.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

.....

Instituição:

.....

Examinador(a): Assinatura:

.....

Nome:

.....

Instituição:

.....

Presidente: Assinatura:

.....

Nome:

.....

Instituição:

.....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Uso de oocistos de *Neospora caninum* em infecção experimental de cães", protocolado sob o nº1207/2007, utilizando 06 (seis) cães, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Solange Maria Gennari, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 21/11/07.

We certify that the Research "Use of *neospora caninum* oocysts in experimental infection in dogs", protocol number 1207/2007, utilizing 06 (six) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Solange Maria Gennari, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/21/07.

São Paulo, 22 de novembro de 2007

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **119** nas fls. **51** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Solange Maria Gennari** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Uso de oocistos de neospora caninum em infecção experimental de cães**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Luciana Ahl Bandini**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEAA)** em **24.03.2008**, com validade de três anos.

São Paulo, 25 de março de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEAA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEAA - ICB/USP

Aos meus pais, Eduardo e Ilse, pelo apoio, amor e incentivo em todos os momentos da minha vida. Obrigada sempre!

Às minhas irmãs e sobrinhas pelo apoio e pelos momentos de alegria e descontração.

Ao meu companheiro Ayres que esteve ao meu lado em todos os momentos. O grande incentivador de tudo isso.

“Dê a quem você ama: asas para voar, raízes para voltar e motivos para ficar.”

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Solange Maria Gennari pela confiança no meu trabalho, pela amizade e pelas oportunidades oferecidas.

Aos colegas de pós-graduação Guacyara e Aldo na árdua tarefa de cuidar dos cães do experimento.

Aos amigos Patrícia, Fernanda, Luciana Viero, Alex e todos os que participaram direta ou indiretamente das minhas alegrias e dos momentos difíceis.

Ao Renato Caravieri (Renatinho) um grande companheiro sempre disposto a ajudar, amigo para todas as horas.

Ao Pedrinho pela ajuda no trato dos animais.

À Hilda F. J. Pena pelos ensinamentos e pela paciência durante a execução deste trabalho.

À Priscilla Melville pelas palavras de incentivo e pelos momentos de alegria.

À Wilma e Angela da secretaria de pós-graduação do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pela dedicação.

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VPS – FMVZ – USP) pelo acolhimento, em especial à Virginia, Cristina e Danival da secretaria do departamento.

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

Aos animais, em especial aos cães, que participaram deste trabalho de forma involuntária.

À Fort Dodge pelo fornecimento das vacinas utilizadas nos cães.

Ao Dr. Geron Schares pela realização do *Western blotting* dos cães e dos gerbilos.

Ao Departamento de Patologia da FMVZ – USP, Prof. Dr. Paulo Maiorka pela realização dos testes de imuno-histoquímica dos cães.

Ao Departamento de Clínica Cirúrgica da FMVZ – USP por ceder o canil para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão de bolsa de mestrado.

“Um dia a maioria de nós irá se separar

Sentiremos saudades de todas as conversas jogadas fora, as descobertas que fizemos, dos sonhos que tivemos, dos tantos risos e momentos compartilhados.

Se isso acontecer, e cada momento for mais raro, teremos as lembranças.

E se um dia meus filhos, ou quem sabe meus netos me perguntarem, vendo aquelas fotos “antigas”, quem são estas pessoas? E estas roupas esquisitas?

Após um breve riso direi com orgulho:

- Foram meus amigos, com os quais vivi meus melhores momentos.

Neste instante a saudade vai apertar, doer de fato pela ausência.

Quem sabe algumas lágrimas de tristeza e felicidade cairão de meus olhos.”

Vinícius de Moraes

"A compaixão pelos animais está intimamente ligada a bondade de caráter, e pode ser seguramente afirmado que quem é cruel com os animais não pode ser um bom homem."

Arthur Schopenhauer

RESUMO

BANDINI, L. A. **Infecção experimental de cães (*Canis familiaris*) com oocistos esporulados de *Neospora caninum***. 2009. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Neospora caninum está amplamente distribuído no mundo e este agente é uma das maiores causas de abortos em bovinos, sendo os cães e os coiotes os hospedeiros definitivos do *N. caninum* e várias espécies de animais domésticos e silvestres os hospedeiros intermediários. Os cães podem se infectar através da ingestão de tecidos contendo cistos e então excretar oocistos nas fezes, entretanto ainda não é conhecido o potencial dos oocistos esporulados em promover a infecção de cão com a eliminação de oocistos pelas fezes. O objetivo deste estudo foi infectar experimentalmente cães com oocistos esporulados de *N. caninum*, via oral e avaliar a ocorrência ou não da infecção. Os oocistos utilizados como inóculo foram obtidos através de bioensaio em cães, usando cérebro de búfalos soropositivos para anticorpos anti-*N. caninum*. Os oocistos obtidos foram confirmados ser de *N. caninum* por métodos moleculares e por bioensaio em gerbilos. Oocistos esporulados, com no máximo 90 dias, foram utilizados na infecção de quatro cães, com oito semanas de vida e negativos para anticorpos anti-*N. caninum* e *Toxoplasma gondii*. Os cães 1 e 4 receberam um inóculo com 10.000 oocistos esporulados cada um; o cão 2 um inóculo com 5.000 oocistos esporulados e o cão 3 recebeu 1.000 oocistos esporulados de *N. caninum*. O total de fezes foi coletado e examinado diariamente durante um período de 30 dias. Nenhum oocisto foi encontrado nas fezes desses animais. Durante seis meses os cães foram acompanhados para observar uma possível soroconversão e quando esta ocorria os animais eram eliminados do experimento. Observou-se que os cães 1 e 4 soroconverteram um mês após a infecção atingindo título de 1600 e 800 respectivamente, os outros dois cães não soroconverteram. A pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* foi realizada pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e confirmada pelo *Western Blotting* (WB) este último utilizando antígeno total de *N. caninum* e antígeno de proteína de superfície purificada (p38). Os cães 1 e 2 foram eutanasiados 180 dias após a infecção para a pesquisa de *N. caninum* em tecidos (cérebro, músculo, linfonodo, fígado, pulmão, coração e medula) pela imuno-histoquímica e por PCR (gene Nc5) sendo o resultado negativo em ambas as técnicas. Bioensaio em gerbilo com cérebro desses cães também foi realizado e novamente os resultados foram negativos, confirmando que oocistos esporulados

de *N. caninum* não foram capazes de produzir infecção em cães com eliminação de oocistos nas fezes, entretanto os cães que receberam as mais altas doses de oocistos foram capazes de formar anticorpos contra o coccídeo.

Palavras-chave: *Neospora caninum*. Oocistos esporulados. Infecção experimental. Cães.

ABSTRACT

BANDINI, L. A. **Experimental infection of dogs (*Canis familiaris*) with sporulated oocysts of *Neospora caninum***. 2009. 68 f. Dissertation (Master's degree) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Neospora caninum is widely distributed in the world and this parasite is one of the major causes of abortion in cattle. Dogs and coyotes are definitive hosts of *N. caninum* and several species of domestic and wild animals the intermediate hosts. Dogs can become infected by eating tissues containing cysts and then excrete oocysts by feces, however it is not yet known the potential of sporulated oocysts in promote infection in dogs, with elimination of oocysts in feces. The objective of this study was to evaluate the acquisition of infection in dogs experimentally infected with sporulated oocysts. The oocysts used as inoculum were obtained by bioassay in dogs using brain of buffaloes positive for anti-*N. caninum* antibodies. The oocysts were confirmed to be *N. caninum* by molecular methods and by bioassay in gerbils. Sporulated oocysts with a maximum of 90 days were used in the infection of four dogs. The dogs were eight weeks old and were negative for anti-*N. caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies. Dogs 1 and 4 received an inoculum of 10,000 sporulated oocysts each, dog 2 an inoculum with 5,000 sporulated oocysts and dog 3 received 1,000 sporulated oocysts of *N. caninum*. The total feces eliminated by the dogs were collected and examined daily for a period of 30 days. No oocysts were found in the feces of these animals. For six months the dogs were monitored to observe a possible seroconversion and when this occurred the animals were eliminated from the experiment. Dogs 1 and 4 seroconverted one month after the infection with titer of 1600 and 800, respectively, and the other two dogs presented no seroconversion in the period. The detection of anti-*N. caninum* was performed by Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) and confirmed by Western Blotting (WB), the latter using total antigen of *N. caninum* and purified surface protein (p38). Dogs 1 and 2 were euthanized 180 days after infection for the detection of *N. caninum* in tissues (brain, muscle, lymph node, liver, lung, heart and bone marrow) by immunohistochemistry and PCR (gene *Nc5*) with negative results in both techniques. Bioassay in gerbils with brain of these dogs was also performed and again the results were negative, confirming that sporulated oocysts of *N. caninum* were not able to produce infection in dogs with elimination of oocysts in feces,

however dogs that received the higher dose of sporulated oocysts were able to produce antibodies against this coccidian.

Keywords: *Neospora caninum*. Sporulated oocysts. Experimental infection. Dogs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Oocisto tipo *Neospora-Hammondia* visto nas fezes do cão B..... 45
- Figura 2: Padrão do modelo de restrição das enzimas *KpnI* e *StuI*. (A) – *KpnI*: N.c. controle positivo de *N. caninum* (400pb); H.h. controle positivo de *Hammondia heydorni* (136+264pb). (B) – *StuI*: N.c. controle positivo de *N. caninum* (150+250pb); H.h. controle positivo de *Hammondia heydorni* (400pb). PM: peso molecular (100pb). 8dpi–17dpi: dias de eliminação de oocistos..... 46
- Figura 3: Análise pelo *Western Blotting* do soro dos gerbilos (1, 2 e 3) após 60 dias de infecção com oocistos esporulados de *N. caninum*. (A): Antígeno total de *N. caninum*; (B): Antígeno purificado p38 (NcSRS2) de *N. caninum*; PM: peso molecular..... 47
- Figura 4: Análise do soro dos cães experimentalmente infectados com oocistos esporulados de *N. caninum* no momento da infecção (dia 0) e aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias pós infecção, pelo *Western Blotting* (WB), utilizando antígeno total de *N. caninum*. 1, 2, 3 e 4: cães 1, 2, 3 e 4; P: positivo; N: negativo; PM: peso molecular..... 49
- Figura 5: Análise do soro dos cães experimentalmente infectados com oocistos esporulados de *N. caninum* no momento da infecção (dia 0) e aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias pós infecção, pelo *Western Blotting* (WB), utilizando antígeno purificado de *N. caninum*. 1, 2, 3 e 4: cães 1, 2, 3 e 4; P: positivo; N: negativo; PM: peso molecular..... 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identificação dos cães experimentais e tratamentos correspondentes.....	41
Tabela 2: Título de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) nos búfalos utilizados nos bioensaios em cães para obtenção de oocistos do parasito.....	44
Tabela 3: Identificação dos cães e respectivos tratamentos (número de oocistos esporulados de <i>N. caninum</i>) e presença de anticorpos pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) pelo <i>Western blotting</i> (WB).....	48

LISTA DE HISTOGRAMAS

Histograma 1: Ilustração das etapas do experimento	33
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	porcentagem
®	marca registrada
µg	micrograma(s)
µL	microlitro(s)
µm	micrometro
d	densidade
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	teste imunoenzimático (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
g	aceleração da gravidade terrestre (9,8m/s ²)
g	grama(s)
HCl	ácido clorídrico
HE	hematoxilina e eosina
Hsp	<i>heat shock protein</i>
IgG	imunoglobulina G
IHQ	imuno-histoquímica
KDa	kilodalton
Kg	kilograma(s)
<i>KpnI</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
M	Molar
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mL	mililitro(s)
mM	milimolar
Na ₂ CO ₃	carbonato de sódio
Na ₂ HPO ₄	fosfato de sódio dibásico anidro
NaCl	cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	fosfato de sódio monobásico anidro
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
NaOH	hidróxido de sódio

ng	nanograma(s)
nm	nanômetro
<i>n</i> PCR	<i>nested</i> -PCR
°C	grau Celsius
p.i.	pós infecção
p/v	peso/volume
pb	pares de bases
PBS	salina tamponada com fosfato
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pH	concentração de hidrogênio iônico
PM	peso molecular
pmoL	picomol(s)
ppp	período pré patente
RFLP	polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA gerados por enzima de restrição
RIFI	reação de imunofluorescência indireta
SDS	dodecilsulfato de sódio
<i>StuI</i>	<i>Streptomyces pneumoniae</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermophillus aquaticus</i>
TBE	tampão Tris-borato-EDTA
TE	tampão Tris-EDTA
Tris	hidroximetilaminometano
U	unidade internacional
v/v	volume/volume
WB	<i>Western blotting</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 OBJETIVO.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Doadores de tecidos – inóculo de <i>Neospora caninum</i>.....	32
3.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	34
3.3 Obtenção de oocistos de <i>N. caninum</i> – Bioensaio em cães.....	34
3.4 Reação em cadeia pela polimerase seguida de restrição enzimática (PCR-RFLP).....	36
3.5 Bioensaio em gerbilo.....	37
3.5.1 Exame histopatológico e imuno-histoquímica.....	37
3.5.2 PCR em tempo real.....	38
3.6 Western Blotting (WB).....	39
3.7 Infecção experimental dos cães.....	40
3.8 Necrópsia dos cães.....	41
3.8.1 PCR e <i>nested</i>-PCR.....	42
3.8.2 Bioensaio em gerbilo.....	42
3.8.3 Exame histopatológico e imuno-histoquímica.....	43
4 RESULTADOS.....	44
4.1 Bioensaio em cães.....	44
4.1.1 Caracterização molecular do isolado.....	45
4.1.2 Bioensaio em gerbilo (teste de viabilidade dos oocistos).....	46
4.2 Infecção dos cães com oocistos de <i>N. caninum</i>.....	48
4.3 Necrópsia, coleta e processamento do material dos cães.....	51
5 DISCUSSÃO.....	52
6 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário formador de cisto que até 1988 pode ter sido erroneamente diagnosticado como *Toxoplasma gondii*. Em 1984 foi descrita uma enfermidade neurológica em filhotes de cães da Noruega que causava encefalomielite, miosite e paresia. Embora parasitos tipo *T. gondii* tenham sido encontrados em lesões no cérebro e músculos, estes não foram infectantes para camundongos e anticorpos anti-*T. gondii* não foram detectados no soro destes cães (BJERKÅS et al., 1984). Em 1988, Dubey e colaboradores tornaram a analisar cortes histológicos de 23 cães diagnosticados como toxoplasmose e em apenas 13 desses animais confirmaram ser *T. gondii*, enquanto que nos outros 10 cortes foi identificado um novo gênero. Outros estudos retrospectivos mostraram a presença do agente em cães com lesões graves devido ao *N. caninum* (DUBEY e LINDSAY, 1993). Em 1988, uma ninhada de cães, ainda vivos, apresentando os mesmos sintomas foi encaminhada para diagnóstico e taquizoítos de *N. caninum* foram isolados de culturas de células e cistos teciduais foram observados em camundongos inoculados com tecidos de cães naturalmente infectados (DUBEY et al., 1988a). Logo em seguida a infecção por *N. caninum* foi induzida experimentalmente em cães com a inoculação de taquizoítos e um teste de imunofluorescência indireta (RIFI) foi desenvolvido para detectar anticorpos anti-*N. caninum*. O desenvolvimento de um teste de imuno-histoquímica em 1989 permitiu a identificação específica do parasito em tecidos fixados em formalina, tornando possível o diagnóstico em um grande número de animais e auxiliando na confirmação de casos inconclusivos com suspeita de *T. gondii* (LINDSAY e DUBEY, 1989).

McAllister e colaboradores demonstraram, em 1998, experimentalmente, ser o cão (*Canis familiaris*) o hospedeiro definitivo do *N. caninum*, após o consumo de carcaças de camundongos (Swiss Webster) imunossuprimidos que continham cistos teciduais do parasito. Dos quatro cães infectados, três eliminaram oocistos não esporulados tipo *Neospora-Hammondia*. Taquizoítos foram observados em órgãos de camundongos Swiss Webster imunossuprimidos e, em camundongos Knockout (BALB/c-IFN- γ) utilizados no bioensaio realizado com oocistos obtidos das fezes de cada um desses cães. Em alguns camundongos anticorpos foram encontrados, em outros, o agente foi diagnosticado pela imuno-histoquímica e pela reação em cadeia pela polimerase (PCR).

Em 2003 *N. caninum* foi diagnosticado como agente causador de abortos em bovinos e alguns anos mais tarde considerado um dos mais prevalentes agentes de abortamento nessa espécie em diferentes regiões do mundo (DUBEY et al., 2003).

Em 2004, Gondim e colaboradores infectaram três bovinos recém nascidos, negativos para anticorpos anti-*N. caninum* pela RIFI, com taquizoítos de *N. caninum* (cepas Nc-Illinois e Nc-Beef) por via intravenosa e com oocistos esporulados de *N. caninum* (cepa Nc-Beef) por via oral. Um pool de tecidos de cada bovino (cérebro, medula, coração, língua, diafragma, músculo esquelético e rim) foi administrado para quatro filhotes de coiotes (*Canis latrans*), com idade entre oito e 12 semanas de vida. Apenas um coiote eliminou oocistos de *N. caninum* diagnosticado pela PCR, confirmando, assim, a possível participação deste canídeo selvagem no ciclo do *N. caninum* como hospedeiro definitivo deste agente.

N. caninum já foi identificado em tecidos de cães, os quais são hospedeiros definitivos e intermediários (DUBEY et al., 1988b), de ovelhas (DUBEY et al., 1990; PENA et al., 2007), de bovinos (ANDERSON et al., 1991), de cabras (BARR et al., 1992), de cervídeos (DUBEY et al., 1996; VIANNA et al., 2004), de equinos (DUBEY, 1999) e de búfalos (RODRIGUES et al., 2004). Dentre os animais silvestres anticorpos anti-*N. caninum* já foram encontrados em camelos - *Camelus bactrianus* (HILALI et al., 1998), gambás - *Didelphis marsupialis* (YAI et al., 2003), capivaras - *Hydrochoerus hidrochoeris* (YAI et al., 2008), raposas - *Vulpes vulpes* (BUXTON et al., 1997) e canídeos silvestres (CAÑÓN-FRANCO et al., 2004; STEINMAN et al., 2006; SOBRINO et al., 2008) entre outros.

Embora de ocorrência relativamente frequente na natureza, o grau de patogenicidade do agente varia de acordo com a espécie do hospedeiro. Entre os animais domésticos, os bovinos se destacam por sua maior suscetibilidade, apresentando perdas na esfera reprodutiva como abortamentos, natimortalidade ou nascimento de bezerros aparentemente saudáveis, porém infectados (BARR et al., 1993; BJÖRKMAN et al., 1996; BUXTON et al., 2002; DUBEY e LINDSAY, 1996).

Até então, nenhum humano foi diagnosticado com neosporose. Nos Estados Unidos, 6,7% de 1029 amostras de soros humanos examinados foram positivos ao *N. caninum*. Das 69 amostras positivas, 50 foram negativas ao *T. gondii*, sugerindo exposição humana ao *N. caninum* (TRANAS et al., 1999). Em um estudo retrospectivo na Inglaterra com 3750 soros, avaliados pela RIFI e ELISA, não houve evidência de exposição humana ao *N. caninum* (McCANN et al., 2008). Lobato et al. (2006) testaram para *N. caninum* e *T. gondii* 256 soros sendo: 61 de pacientes com vírus da imunodeficiência humana (HIV); 50 com desordens

neurológicas (20 com cisticercose confirmada pela sorologia e imagem e 30 com sintomas neurológicos de etiologia desconhecida); 91 de cordão umbilical de recém-nascido e 54 de pacientes saudáveis, através da RIFI, ELISA e *Western Blotting*. O resultado encontrado para anticorpos anti-*N. caninum* foi de 38% em pacientes com HIV; 18% em pacientes com desordens neurológicas; 5% em recém-nascidos e 6% em pacientes saudáveis. Esses resultados indicam a exposição humana ao *N. caninum*, particularmente em pacientes infectados com o HIV e naqueles com desordens neurológicas nos quais são comuns infecções concorrentes e oportunistas pelo *T. gondii*. Não há relatos de infecção acidental com o agente em pessoas que manusearam organismos viáveis (DUBEY et al., 2007).

O ciclo biológico do *N. caninum* é composto por três estágios infecciosos: taquizoítos, bradizoítos e oocistos esporulados. Taquizoítos e cistos são encontrados nos hospedeiros intermediários. Os taquizoítos são ovóides, lunares ou globulares e medem aproximadamente 7x2 µm. Podem estar presentes em vários tipos celulares. Os cistos de *N. caninum* são encontrados principalmente em tecido nervoso (DUBEY et al., 1990; DUBEY e LINDSAY, 1996; DUBEY et al., 2002). Os bradizoítos, presentes no interior dos cistos, são alongados e medem aproximadamente 8x2 µm. O oocisto mede 11,7x11,3 µm e, quando esporulado, possui dois esporocistos e cada esporocisto contém quatro esporozoítos. O ciclo entero-epitelial, no intestino dos hospedeiros definitivos, ainda não foi elucidado (DUBEY et al., 2002).

Todos os três estágios do *N. caninum* (taquizoítos, bradizoítos e oocistos) estão envolvidos na transmissão do parasita. Os carnívoros nos quais a infecção ocorreu tornaram-se infectados pela ingestão de tecidos contendo bradizoítos e os herbívoros infectaram-se pela ingestão de alimento ou água contaminada pelos oocistos esporulados de *N. caninum*. A infecção transplacentária pode ocorrer quando taquizoítos são transmitidos da mãe infectada para seu feto durante a gestação (DUBEY et al., 2007).

O estágio resistente do parasita, o oocisto, é excretado nas fezes de cães e coiotes e no meio ambiente ocorre a esporulação dentro de 24 a 72 horas (LINDSAY et al., 1999). Os cães eliminam os oocistos ao redor de cinco dias após a ingestão de tecidos de animais experimental ou naturalmente infectados. Experimentalmente, o cão não parece ser um bom hospedeiro definitivo para *N. caninum* porque após ingerir cistos teciduais apenas poucos oocistos são eliminados de forma inconsistente e por um curto período de tempo (BASSO et al., 2001).

O diagnóstico final, pelo exame coproparasitológico, não é possível pois os oocistos de *N. caninum* e de *Hammondia heydorni*, também parasito de cães, são morfológicamente indistinguíveis. Há também o fato de que os cães podem servir de vetores mecânicos de oocistos de *Hammondia hammondi* e *T. gondii* ao ingerirem fezes de gatos e os oocistos passem íntegros pelo trato digestivo fazendo com que além do *N. caninum* e da *H. heydorni* oocistos destes dois coccídeos possam estar presentes nas fezes de cães sendo o diagnóstico morfológico inviável (FRENKEL et al., 2003; SCHARES et al., 2005).

O número de oocistos eliminados, o período pré-patente e a duração da eliminação variam bastante. Segundo Gondim et al. (2002) os cães eliminam mais oocistos após a ingestão de tecido bovino do que quando ingerem tecidos murinos infectados. Também observaram que cães jovens eliminam mais oocistos do que cães adultos e o tipo de tecido também parece influenciar a produção de oocistos (GONDIM et al., 2005). Cães que foram imunossuprimidos com corticosteróides eliminaram mais oocistos e por um período maior após serem infectados com cérebro murino contendo cistos de *N. caninum* do que aqueles que não receberam tal tratamento (LINDSAY et al., 1999).

Especula-se se o uso de um hospedeiro intermediário infectado experimentalmente, que não seja o hospedeiro ideal (por exemplo o camundongo) não produza uma boa infecção devido ao baixo número, imaturidade e atenuação de bradizoítos nesta espécie (GONDIM et al., 2002).

Sabe-se que oocistos mantidos sob refrigeração (4° C) em ácido sulfúrico por 46 meses não foram infectantes a gerbilos (UZEDA et al., 2007). Recentemente, foi demonstrado que temperatura de 100° C por 1 minuto e hipoclorito de sódio a 10% por 1 hora foram eficazes no controle de oocistos esporulados de *N. caninum* no ambiente (ALVES NETO, 2009).

Há vários estudos com infecção experimental de hospedeiros intermediários com administração de oocistos esporulados e de taquizoítos por via oral e com taquizoítos por via intramuscular, intraperitoneal, subcutânea ou intravenosa (DUBEY e LINDSAY, 1996). Trees et al. (2002) desafiaram três vacas com 10 semanas de gestação com 600 oocistos esporulados por animal, pela via oral. Não foi induzido aborto e não houve evidência de transmissão transplacentária, sugerindo que a dose para induzir infecção exceda os 600 oocistos.

De Marez et al. (1999) infectaram bovinos com oocistos (entre 10^4 - 10^5) e com estas doses não foram encontradas lesões consistentes com neosporose nos tecidos desses animais

pela imuno-histoquímica, porém todos foram positivos na PCR em pelo menos uma alíquota, indicando que os bovinos foram infectados pela inoculação oral de oocistos esporulados de *N. caninum*.

Gondim et al. (2002) infectaram um grupo de quatro bezerros com taquizoítos (entre 1×10^7 e 2×10^6), por via intravenosa, e outro grupo com oocistos de *N. caninum*, via oral (entre 300 e 1400 oocistos). Um grupo com nove cães recebeu um pool de tecidos (cérebro, medula, coração, fígado, rim, língua, diafragma e músculos esqueléticos) de cada bezerro infectado, sendo que dois cães compartilharam os tecidos de um mesmo bezerro. Dos nove cães, oito eliminaram oocistos nas fezes que foram confirmados ser de *N. caninum* em sete desses animais. Os oocistos de *N. caninum* foram, então, administrados oralmente a bezerros e em seguida os tecidos desses bezerros induziram a eliminação de oocistos em dois cães que os ingeriram. Os oocistos de um desses cães foram administrados a outro bezerro e os tecidos deste induziram a eliminação de oocistos em um novo cão, mostrando que o parasita pode ser transmitido ciclicamente entre bovinos e cães e confirmaram a infecção ser efetiva pelo carnivorismo.

Utilizando tecidos naturalmente infectados como inóculo, oocistos de *N. caninum* foram detectados nas fezes de cães após a ingestão de tecidos de bovinos (DIJKSTRA et al., 2002), bubalinos (RODRIGUES et al., 2004), ovinos (KOBAYASHI et al., 2001; KOYAMA et al., 2001; PENA et al., 2007) e cervídeos (GONDIM et al., 2004; VIANNA et al., 2004). Em tecidos de galinhas *N. caninum* já foi detectado por métodos moleculares por Costa et al. (2008), entretanto o agente ainda não foi isolado nesta espécie animal.

Cães podem se infectar experimentalmente através da ingestão de tecidos de bovinos e de camundongos infectados, naturalmente ou experimentalmente. Lindsay et al. (1999a) infectaram cães com cérebro de camundongos Swiss Webster imunossuprimidos contendo cistos de *N. caninum*. Dijkstra et al. (2001) obtiveram infecção alimentando cães com placentas de vacas soropositivas para anticorpos anti-*N. caninum*. Gondim et al. (2002) infectaram um grupo de cães com carcaças de camundongos ICR imunossuprimidos infectados e outro grupo com um pool de tecidos de bovinos infectados (cérebro, medula, coração, fígado, rim, língua, diafragma e músculos esqueléticos). Cavalcante et al. (2008) infectaram cães jovens com diferentes tecidos de bovinos: masseter e diafragma, coração, fígado e cérebro, mostrando, pela primeira vez, que não é somente o tecido nervoso que tem a capacidade de infectar cães, uma vez que os cães eliminaram oocistos de *N. caninum* confirmados por métodos moleculares após a ingestão de cada um desses tecidos.

Rodrigues et al. (2004) realizaram um estudo com búfalos naturalmente infectados no qual sete cães foram alimentados com cérebro destes animais soropositivos para anticorpos anti-*N. caninum* e quatro cães eliminaram oocistos em quantidade que variou de 20.000 a 800.000 oocistos.

Dijkstra et al. (2001) infectaram dois cães com colostro adicionado de taquizóitos de *N. caninum* derivado de cultivo celular e outros dois cães receberam placenta de vacas soropositivas. Nenhum dos cães soroconverteu no período de observação de cinco semanas e os cães que receberam placenta eliminaram oocistos nas fezes.

Há poucos relatos sobre cães que se infectaram naturalmente e que eliminaram oocistos (BASSO et al., 2001; BASSO et al., 2009; McGARRY et al., 2003; McINNES et al., 2006; SCHARES et al., 2005; SLAPETA et al., 2002). Isto pode ocorrer devido ao fato dos cães desenvolverem imunidade após a primeira infecção, prevenindo eliminações repetidas, ou devido ao baixo número de oocistos que são eliminados nas fezes em condições naturais e experimentais (BASSO et al., 2001; DIJKSTRA et al., 2001; GONDIM et al., 2005; LINDSAY et al., 1999a; McALLISTER et al., 1998; SCHARES et al., 2005).

Em 2005, Gondim e colaboradores observaram que cães que foram reinfectados dois meses depois do primeiro desafio eliminaram uma pequena quantidade de oocistos, sendo esta excreção breve. Cães re-expostos oito meses depois do desafio primário não eliminaram oocistos, sugerindo uma imunidade. Porém cães re-expostos 18 a 20 meses depois da primeira infecção eliminaram oocistos, sendo que um desses cães apresentou título de 1600 na RIFI, mostrando que um alto título de anticorpos não impede a produção de oocistos.

Os cães podem excretar oocistos e apresentarem lesões compatíveis à infecção, porém sem soroconversão detectável, assim, sorologia negativa não confirma ser o cão livre da infecção por *N. caninum* (LINDSAY et al., 1999). A presença ou ausência de soroconversão pós infecção por *N. caninum* talvez seja influenciada pela cepa. McAllister et al. (1998) observaram anticorpos em cães após 37 dias de infecção com o título de 800 e 1600 (RIFI). Lindsay et al. (1999) infectaram dois cães com tecido de camundongos Swiss Webster e estes eliminaram oocistos, porém apenas um soroconverteu aos 37 dias com título de 200 e aos 42 dias com título de 1600 (RIFI). Dijkstra et al. (2001) observaram que cães que haviam eliminado oocistos não soroconverteram cinco semanas após o experimento. Schares et al. (2001) relataram que dos 11 cães que eliminaram oocistos seis foram confirmados ser de *N. caninum* pelo bioensaio e apenas dois destes soroconverteram 120 dias pós infecção (dpi). Gondim et al. (2002) observaram que dos 14 cães infectados experimentalmente, seis

apresentavam título maior que 50, 25 dias após a infecção. Dois cães que eram soronegativos aos 25 dpi foram novamente testados oito meses depois e apresentaram título de 400. Rodrigues et al. (2004) coletaram sangue de cães experimentalmente infectados semanalmente até o primeiro mês e então a cada dois meses até o sexto mês do experimento; dois dos quatro cães que eliminaram oocistos soroconverteram (título ≥ 800) dois meses após a ingestão de cérebro de búfalos e os outros dois não apresentaram soroconversão nesse período. Gondim et al. (2004) observaram soroconversão em coiotes 28 dias pós infecção experimental.

N. caninum também pode ser transmitido aos cães verticalmente (via transplacentária) da fêmea infectada para o feto durante a gestação. Em bovinos a transmissão transplacentária exógena ocorre após uma infecção primária, através da ingestão de oocistos durante a gestação e a transmissão endógena ocorre pela reativação de uma infecção pré existente também durante a gestação. Nesta transmissão os taquizoítos atravessam a placenta e atingem o feto, tendo esta via sido demonstrada experimentalmente em bovinos, ovinos, caprinos, macacos e felinos (DUBEY e LINDSAY, 1996; TREES e WILLIAMS, 2005).

Dubey e Lindsay (1989) infectaram uma cadela com $1,5 \times 10^6$ taquizoítos de *N. caninum*, pela via subcutânea e intramuscular, no 35º dia de gestação. Oito filhotes nasceram vivos 28 dias após a infecção. O filhote 1 veio à óbito logo após o nascimento e o filhote 2, dois dias após o nascimento (dpn). Os filhotes 3, 4 e 5 foram eutanasiados 2, 3 e 20 dpn, pois estavam hipotérmicos. Os filhotes 6, 7 e 8 permaneceram clinicamente normais. *N. caninum* foi isolado em cultivo celular obtidos da placenta e dos tecidos dos cinco filhotes necropsiados e observado em cortes histológicos do coração do filhote 5.

Cole et al. (1995) infectaram seis cadelas com *N. caninum* aos 21 dias de gestação. Uma cadela pariu uma ninhada de três filhotes que apresentavam déficit de propriocepção, diminuição do tônus muscular e espasmos de membros pélvicos, entretanto, *N. caninum* não foi demonstrado em bioensaio de cultivo celular nem em cortes histológicos de tecidos desses filhotes. As outras cinco cadelas abortaram e *N. caninum* foi isolado dos tecidos de quatro delas.

A frequência da transmissão vertical em cães naturalmente infectados é variável mas muito baixa para manter a infecção sozinha (BARBER e TREES, 1998).

Cães com acesso às ruas ou contato com outras espécies de animais, como bovinos, têm se mostrado mais frequentemente infectados com *N. caninum* (GENNARI et al., 2002). Além disso, já foram verificadas diferenças na soropositividade de cães que se alimentam de

carne crua (29,5% de 71) quando comparados aos que recebiam dieta com ração comercial (7% de 65), podendo o consumo de carne crua, ser um fator potencializador de infecção pelo *N. caninum* (PATITUCCI et al., 2001). Cañón-Franco et al. (2003) também verificaram que a proporção de cães soropositivos com dieta caseira (8,6% de 151) foi maior do que a de cães alimentados com ração comercial (0% de 151).

Do ponto de vista epidemiológico a importância do hospedeiro definitivo no ambiente rural pode ser destacada pela maior ocorrência de cães soropositivos nesse ambiente quando comparado aos cães que vivem nos centros urbanos (FERNANDES et al., 2004) e pela forte associação entre a presença de cães nas propriedades e a maior soroprevalência de *N. caninum* nos rebanhos (CORBELLINI et al., 2006; DIJKSTRA et al., 2002; GUIMARÃES et al., 2004; PARÉ et al., 1998; WOUDA et al., 1999). Cunha Filho et al. (2008), em um inquérito epidemiológico no Rio Grande do Sul, observaram que cães rurais tiveram risco 3,5 vezes maior de contato com o parasito do que cães urbanos. Também observaram que cães rurais de propriedades de criação de bovinos de corte apresentaram um risco maior de infecção do que cães de propriedade de produção leiteira e a ocorrência de cães positivos foi 2,2 vezes maior em propriedades em que carcaças e fetos bovinos não eram removidos do campo.

Em algumas propriedades, a maior porcentagem de soropositividade nas vacas mais idosas em relação às mais jovens é um forte indicador da ocorrência de infecção pós-natal, reforçando a importância do cão na epidemiologia da infecção (GUIMARÃES et al., 2004).

Estudos de diagnóstico sorológico do *N. caninum* pela RIFI, realizados em diferentes espécies de hospedeiros, têm demonstrado que existe pouca reação cruzada com outros parasitas coccídeos, por isso a RIFI vem sendo considerada a prova padrão para o sorodiagnóstico de *N. caninum* (BJORKMAN; UGGLA, 1999).

O diagnóstico molecular de oocistos tipo *Neospora-Hammondia* das fezes dos cães pode ser realizado pelo uso de *primer* específico para *H. heydorni* ou *N. caninum* como aqueles descritos por Slapeta et al. (2002) e Yamage et al. (1996), respectivamente. Alternativamente, os oocistos podem ser diagnosticados pela amplificação e sequenciamento, mas essas técnicas consomem mais tempo do que a PCR-RFLP (*polymerase chain reaction coupled with restriction fragment length polymorphism*) que é uma alternativa fácil e rápida em laboratórios que necessitam diferenciar esses organismos (MONTEIRO et al., 2008).

Métodos moleculares para o diagnóstico de oocistos nas fezes e de cistos em tecidos já foram desenvolvidos (HILL et al., 2001; SLAPETA et al., 2002; SREEKUMAR et al., 2004;

PAULA et al., 2004) bem como testes histopatológicos e imuno-histoquímicos, que são utilizados para diagnóstico, porém a sensibilidade deste último para detectar *N. caninum* em tecidos é baixa (DUBEY, 1999; 2003; PESCADOR et al., 2007).

Embora *N. caninum* seja similar ao *T. gondii* o seu isolamento em cultivo celular é mais difícil; *N. caninum* cresce mais lentamente e a cultura celular não deve ser descartada até dois meses após a inoculação de material suspeito (DUBEY et al., 1998).

Dos três tipos de camundongos (Swiss Webster, BALB/c e Knockout-KO IFN- γ) usados para isolar *N. caninum*, o KO parece ser o mais suscetível (DUBEY et al., 1998). Gerbilo (*Meriones unguiculatus*) tem sido utilizado em bioensaio como uma alternativa para o estudo da neosporose não necessitando de imunossupressão, ao contrário dos camundongos (DUBEY e LINDSAY, 2000; RAMAMOORTHY et al., 2005; KANG et al., 2009), porém Basso et al. (2001) infectaram três gerbilos com oocistos, via oral, sendo que dois foram imunossuprimidos e o outro não. Apenas um dos gerbilos que recebeu o tratamento imunossupressor apresentou cistos no cérebro, os outros dois não apresentaram lesões ou parasitos. Dubey e Lindsay (2000) demonstraram que gerbilos são altamente suscetíveis a neosporose após a inoculação oral de oocistos de *N. caninum* e outros estudos utilizaram este modelo animal para demonstrar a infectividade dos oocistos (BASSO et al., 2001; DIJKSTRA et al., 2001), embora o desenvolvimento e o encontro de cistos em gerbilos seja menos evidente do que o encontro de anticorpos (BASSO et al., 2001). Cuddon et al. (1992) e Gondim et al. (1999, 2001, 2002) demonstraram que estes animais também são suscetíveis a infecção induzida por taquizoítos. A disponibilidade dos gerbilos na maioria dos países e seu custo relativamente baixo, fazem deles um bom instrumento para estudos experimentais com *N. caninum* (RAMAMOORTHY et al., 2005).

Em um estudo comparativo de infectividade de oocistos e bradizoítos de *T. gondii* para camundongos e gatos observou-se que o período pré patente (ppp) varia com o estágio do *T. gondii* ingerido pelo gato. A ingestão de bradizoítos leva a um ppp de três a 10 dias e a ingestão de oocistos e taquizoítos acarreta um ppp de 18 dias ou mais. De 29 gatos infectados oralmente com oocistos apenas um (3,44%) eliminou oocistos e o ppp foi de 23 dias e todos apresentaram-se assintomáticos. De 41 gatos infectados com bradizoítos, 15 (36,58%) eliminaram oocistos nas fezes com ppp de quatro a nove dias e também mantiveram-se assintomáticos. Todos os camundongos infectados com os mesmos oocistos (via oral) e bradizoítos (via subcutânea) utilizados no estudo morreram de toxoplasmose, confirmando que os oocistos de *T. gondii* são menos infectantes e menos patogênicos para os gatos do que

para outros hospedeiros (DUBEY et al., 2006). O inverso é verdadeiro para os bradizoítos, que são menos infectantes para camundongos do que para gatos quando administrados pela via oral.

Gatos podem eliminar milhões de oocistos após ingerir alguns bradizoítos de *T. gondii* enquanto que 100 bradizoítos podem não ser infectantes para camundongos pela mesma via (DUBEY et al., 2001). Assim, a transmissão do *T. gondii* é mais eficiente quando gatos consomem cistos (carnivorismo) ou quando o hospedeiro intermediário consome oocisto (transmissão fecal-oral).

Apesar da grande importância dos cães na cadeia epidemiológica do *N. caninum*, ainda não é conhecido o papel dos oocistos esporulados como forma de infecção do agente nessa espécie animal.

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivo estudar a possibilidade de infecção de cães (*Canis familiaris*) pela ingestão de oocistos esporulados de *N. caninum*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção dos oocistos que seriam utilizados na infecção dos cães do experimento, inicialmente realizou-se a infecção de cães doadores com tecidos de búfalos soropositivos para *N. caninum*. Somente após a obtenção dos oocistos, da confirmação do gênero do parasito por métodos moleculares e biológicos e da purificação, os oocistos esporulados foram utilizados no presente estudo.

O histograma 1 ilustra as etapas do experimento.

3.1 Doadores de tecidos – inóculo de *Neospora caninum*

Búfalos (*Bubalus bubalis*) criados na Fazenda Experimental do Campus Administrativo da Universidade de São Paulo (USP), em Pirassununga, com sorologia positiva para anticorpos anti-*N. caninum* pela RIFI (≥ 200) foram selecionados na véspera do abate, realizado no Abatedouro do próprio Campus. Quando do abate, foram colhidos os cérebros de três animais e transportados para São Paulo em caixa de isopor, refrigerados, servindo de inóculo para alimentação de cães e obtenção de oocistos de *N. caninum*.

RIFI: reação de imunofluorescência indireta; IHQ: imuno-histoquímica; WB: Western blotting; PCR: reação em cadeia pela polimerase; RFLP: *restriction fragment length polymorphism*; +: positivo; -: negativo

Histograma 1 – Ilustração das etapas do experimento.

3.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Os soros dos búfalos doadores bem como dos gerbilos do bioensaio e dos cães do estudo foram analisados através da RIFI para verificar a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* conforme descrito por Dubey et al. (1988b).

Os soros testes e os controles (positivo e negativo) foram diluídos em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) pH 7,2 (0,0084M Na₂HPO₄, 0,0018M NaH₂PO₄, 0,147M NaCl – acrescentado de soro albumina bovina 1% p/v) em placas de 96 poços com ponto de corte de 100 para os búfalos (FUJII et al., 2001) e de 50 para os gerbilos (UZEDA et al., 2007) e os cães (CHEADLE et al., 1999; MINEO et al., 2001). Estes foram distribuídos em lâminas para RIFI contendo o antígeno específico fixado (taquizoítos de *N. caninum* cepa Nc-1).

Após 30 minutos de incubação, em estufa a 37 °C e câmara úmida, as lâminas foram lavadas três vezes, por 5 minutos cada, com solução tampão carbonatada de lavagem pH 9,0 (0,108M Na₂CO₃, 0,40M NaHCO₃, 0,147M NaCl). Após as lâminas terem sido secas à temperatura ambiente, acrescentou-se, em cada poço, o conjugado marcado com isotiocianato de fluoresceína específico para cada espécie (IgG de coelho anti-IgG bovino – SIGMA F-7887, EUA; IgG de coelho anti-IgG canino – SIGMA F-7884, EUA e IgG de coelho anti-IgG de gerbilo – ICL, EUA) e foram incubadas por mais 30 minutos a 37 °C. As lâminas foram novamente lavadas como descrito anteriormente para a remoção do conjugado livre e depois de secas foram cobertas com glicerina tamponada e lamínula.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio epifluorescente (OLYMPUS BX60-FLA, EUA) e foram consideradas positivas as amostras apresentando fluorescência em toda a superfície do taquizoíto. A ausência de fluorescência ou presença de reação apical foi considerada negativa.

3.3 Obtenção de oocistos de *N. caninum* - Bioensaio em cães

Foram selecionados três cães, machos, sem raça definida, com idade aproximada de 60 dias, com sorologia negativa para *N. caninum* (RIFI <50). Estes cães foram vermifugados e vacinados contra parvovirose canina, influenza, coronavírus, leptospirose e cinomose

(Duramune® Max5CvK – Fort Dodge, Brasil). Foram mantidos em baias individuais recebendo ração comercial apropriada para a idade e peso e água *ad libitum*.

Três cérebros de búfalos, previamente selecionados, foram administrados aos cães, sendo um cérebro para cada cão. O cão A recebeu o cérebro do búfalo número 563, o cão B o cérebro do búfalo 552 e o cão C o cérebro do búfalo 562 e estes foram oferecidos em dois dias consecutivos, sendo a primeira porção ingerida no mesmo dia do abate e o restante mantido refrigerado (4 °C) até o dia seguinte.

Para obter uma quantidade maior de oocistos, os cães B e C foram imunossuprimidos com acetato de metilprednisolona 80 mg (Depo-Medrol®, Pfizer, Brasil), via intramuscular no 3º e 4º dia pós infecção (p.i.), segundo protocolo de Lindsay et al. (1999).

As fezes desses cães foram coletadas individualmente a partir do 5º dia p.i., pesadas e examinadas em triplicata pela técnica de centrífugo-flutuação em solução de sacarose ($d=1,205 \text{ g/cm}^3$) segundo Ogassawara e Benassi (1980) para a pesquisa de oocistos nas fezes. Os oocistos obtidos foram mantidos em estufa incubadora tipo B.O.D® (Eletrolab, Brasil), a 27 °C, em solução de dicromato de potássio 2% (p/v), em placas de Petri, durante 14 dias para permitir a esporulação dos mesmos. Após este período, as fezes foram coadas em tamises seriados sendo: coador convencional, 65 malhas, 100 malhas, 200 malhas e 400 malhas/polegada. Em seguida, o material coado foi transferido para cálices cônicos de 2000 mL e deixou-se em sedimentação por 24 horas. O sedimento foi distribuído em tubos cônicos de 50 mL e o material foi centrifugado (500 g por 10 minutos) a 4 °C, o sobrenadante descartado e o sedimento lavado com água destilada até a eliminação total do dicromato de potássio. Os oocistos esporulados foram armazenados refrigerados até a confirmação do gênero pela PCR segundo Basso et al. (2001). Os inóculos para a infecção dos cães foram preparados com oocistos obtidos há no máximo três meses.

3.4 Reação em cadeia pela polimerase seguida de restrição enzimática (PCR-RFLP)

No momento da observação dos oocistos nas lâminas estes foram lavados com 1 mL de tampão de TE (Tris-HCl 1 M, EDTA 0,5 M, pH 8) em placa de Petri estéril. Foram então transferidos para microtubos de 1,5 mL e lavados duas vezes com TE. Após a última

lavagem, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 500 µL de tampão de lise (Tris-HCl 1 M, EDTA 0,5 M, NaCl 5 M, SDS 10%). A suspensão de oocistos foi submetida a três ciclos de congelamento-descongelamento e, em seguida foi adicionada proteinase K na concentração de 20µg/µL e incubado por 12 hs a 37 °C. A extração de DNA foi realizada usando uma mistura de fenol-clorofórmio e etanol para a precipitação (AUSUBEL et al., 1999).

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

A análise dos produtos amplificados foi realizada através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 2,5% (p/v) em cuba horizontal com tampão de corrida TBE 0,5 x (0,045 M de Tris-borato e 0,001 M de EDTA, pH 8,0). Foram analisadas alíquotas de 10 µL da amostra amplificada, sendo que o gel foi imerso em solução de brometo de etídeo durante 15 minutos e posteriormente observado em transiluminador ultravioleta para a visualização das bandas. Essas bandas foram comparadas com o padrão de peso molecular que possuía fragmentos múltiplos de 100 pares de bases. O registro da imagem foi realizado através do AlphaImager HP Imaging System® (Alpha Innotech, EUA).

3.5 Bioensaio em gerbilo

Um grupo com três gerbilos (*Meriones unguiculatus*), provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan, com idade aproximada de quatro semanas, foi utilizado como controle da viabilidade dos oocistos de *N. caninum*. Estes foram inoculados com 1000 oocistos esporulados cada um, por via oral, através de sonda gástrica e observados por um período de 60 dias. Passado esse tempo, os gerbilos foram anestesiados com xilazina (Kensol®, König, Brasil) e quetamina (Vetaset®, Fort Dodge, Brasil) e eutanasiados com embutramida e iodeto de mebezônio (T-61®, Intervet, Brasil). Uma parte do cérebro e coração foram coletados para a pesquisa do parasito pela PCR em tempo real e outra parte pela imuno-histoquímica. Por esta última técnica também avaliou-se amostras de: baço, fígado e musculatura esquelética. Quando da necropsia, o sangue foi testado quanto à soroconversão para anticorpos anti-*N. caninum*, utilizando a RIFI nas diluições 1:50 e 1:100 e *Western Blotting* (WB) na diluição 1:100. Também foi realizado o exame direto do cérebro em busca de cistos de *N. caninum* através do esfregaço em lâmina e lamínula em três alíquotas.

3.5.1 Exame histopatológico e Imuno-histoquímica

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

Para a realização da IHQ foi aplicada uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 10 minutos para a realização do bloqueio da peroxidase endógena. Para recuperação antigênica utilizou-se tripsina 0,1% por 10 minutos a 37 °C, seguida de calor (microondas potência máxima por 2 minutos) com as lâminas imersas em tampão citrato (pH 6,0). As marcações inespecíficas foram reduzidas pela aplicação de leite desnatado a 5% por 15 minutos. O anticorpo primário foi aplicado durante uma hora à temperatura de 37 °C, seguido

do anticorpo secundário biotinalado e solução da avidina conjugada com peroxidase (Dako, EUA) por aproximadamente 20 minutos cada, à temperatura ambiente. A revelação da marcação foi obtida através da utilização do cromógeno tetra-hidrocloreto de 3,5-diaminobenzidina (DAB, Dako, EUA), por 5 a 10 minutos. Foi utilizado hematoxilina como contra-corante, por 1 minuto (CORBELLINI et al., 2000, 2001, 2006).

3.5.2 PCR em tempo real

Amostras de cérebro e coração de cada um dos gerbilos foram fragmentadas e maceradas em cadinho e pistilo com nitrogênio líquido. A seguir, os tecidos foram homogeneizados ao reagente DNazol (DNAZOL® Reagent, GIBCO, EUA) até a completa lise celular. A seguir o material foi centrifugado a 10.000 *g* durante 10 minutos para a remoção dos debris celulares. O DNA é obtido do sobrenadante pela adição de etanol absoluto induzindo a precipitação do material nucleico. Após lavagens com etanol a 70%, o DNA é solubilizado em solução de NaOH a 8 mM (AUSUBEL et al., 1990).

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

Foram empregados 50 ng de DNA em cada reação de amplificação, utilizando conjuntos de *primers* e sonda específicos para *N. caninum* (gene 5) e controle endógeno 18S (Eukariotic 18S rRNA Endogenous Control, Applied Biosystems) em tampão universal para PCR em tempo real (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, EUA) (LABARCA e PAIGEN, 1980).

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

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

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

Sequências (5'- 3') dos oligonucleotídeos para o gene 5 (Accession number AY665719) (CARDOSO et al., 2008).

Senso GCGGACGTGTCGTTGTTG

Anti-senso GTTCACACACTATAGCCACAAACAA

Sonda CCTGCGGCAGCAAGGCTCCTT

3.6 Western Blotting (WB)

O WB foi realizado no Friedrich-Loeffler-Institut, Alemanha.

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

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

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

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

Para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum*, a incubação das tiras no WB foi realizada conforme descrito por Schares et al. (1998), com algumas modificações. O soro do gerbilo foi diluído a 1:100 em PBS e como controle positivo foi utilizado o soro de um gerbilo experimentalmente infectado (SCHARES et al., 2005). Quando o WB foi realizado com o soro dos cães do experimento estes também foram diluídos 1:100 e o controle positivo utilizado foi um cão com infecção congênita por *N. caninum* (PETERS et al., 2000).

3.7 Infecção experimental dos cães

Foram selecionados quatro cães, três machos e uma fêmea, sem raça definida, com idade aproximada de 60 dias, com sorologia negativa para *N. caninum* (RIFI ≤ 50) e *Toxoplasma gondii* (RIFI ≤ 16), vermifugados e vacinados contra parvovirose canina, influenza, coronavírus, leptospirose e cinomose (Duramune® Max5CvK – Fort Dodge, Brasil). Estes foram mantidos em baias individuais, recebendo ração comercial apropriada para o peso e idade e água *ad libitum*.

Dos oocistos obtidos do bioensaio em cães foi realizada a contagem dos mesmos em câmara de Neubauer e separada quatro alíquotas sendo: duas alíquotas de 10.000 (10^4) oocistos cada, uma alíquota de 5.000 (5×10^3) oocistos e outra de 1.000 (10^3) oocistos. No momento da contagem dos oocistos observou-se que cerca de 95% destes estavam esporulados.

Os cães número 1 e número 4 receberam 10.000 oocistos cada, o cão número 2 recebeu 5.000 oocistos e o cão 3 recebeu 1.000 oocistos de *N. caninum*, via oral (Tabela 1). O dia da administração dos oocistos foi considerado o dia zero do experimento. No mesmo dia da infecção dos cães teve início o bioensaio dos gerbilos como controle de viabilidade dos oocistos, como descrito no item 3.5.

As fezes dos cães foram coletadas individualmente a partir do 5º dia p.i. e mantidas sob refrigeração (4 °C) até a realização do exame coproparasitológico para a pesquisa dos oocistos tipo *Neospora-Hammondia*. Colheitas diárias das fezes totais foram realizadas por 30 dias e o exame feito em triplicata.

Foi realizado um acompanhamento sorológico dos cães, sendo feitas colheitas mensais até o 6º mês p.i. Quando o cão tornava-se positivo à presença de anticorpos anti-*N. caninum*

este era retirado do estudo. O soro dos cães foi avaliado através da RIFI e do WB como descrito nos itens 2.2 e 2.6, respectivamente.

Tabela 1 – Identificação dos cães experimentais e tratamentos correspondentes.

Cão	Quantidade de oocistos esporulados de <i>N. caninum</i>	Peso dos cães no início do experimento (Kg)
1	10.000	2,0
2	5.000	1,5
3	1.000	1,5
4	10.000	1,0

3.8 Necrópsia dos cães

Dos quatro cães infectados, dois (cães 1 e 2) foram eutanasiados para pesquisa de *N. caninum*. Estes foram anestesiados com xilazina (Kensol®, König, Brasil) e quetamina (Vetaset®, Fort Dodge, Brasil) e em seguida receberam injeção intracardíaca de embutramida e iodeto de mebezônio (T-61®, Intervet, Brasil). Este procedimento foi realizado no final do experimento, seis meses após a inoculação dos oocistos. Tecidos (cérebro, músculo, linfonodo, fígado, pulmão, coração e medula) foram coletados para imuno-histoquímica e PCR (gene Nc-5) em duplicata. Uma parte do cérebro também foi separada para a realização de bioensaio em gerbilos.

3.8.1 PCR e *nested*-PCR

A cada amostra de tecido dos cães eutanasiados (números 1 e 2) foi adicionado um tampão de lise (Tris-HCl 1 M, EDTA 0,5 M, NaCl 5 M, SDS 10%) e proteinase K e incubado por 12 hs a 37 °C. Para a extração de DNA foi utilizado fenol-clorofórmio e etanol para a precipitação (AUSUBEL et al., 1999).

As condições de amplificações da PCR foram: 5 µL de DNA extraído em volume final de 50 µL, contendo 1,25 mM de cada dNTP, 10 pmol/µL de cada primer externo (Np4 e Np7), 50 mM de MgCl₂ e 0,3 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, EUA). O ciclo utilizado foi 94 °C por 3 minutos seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 57 °C por 30 segundos e 72 °C por 60 segundos e extensão final de 72 °C por 10 minutos. A *nested*-PCR foi realizada utilizando 1 e 5 µL do produto da PCR e os primers internos (Np6 e Np7). O ciclo foi o mesmo utilizado para a PCR. O produto da *nested*-PCR foi analisada pela eletroforese em gel de agarose 2% e corado com brometo de etídeo (PAULA et al., 2004).

3.8.2 Bioensaio em gerbilo

Cerca de 10 g de cérebro do cão 1 e 2 foram individualmente macerados em cadinho e pistilo com 15 mL de solução de tripsina (0,25%), transferidos para tubo de centrifugação e incubados por 50 minutos a 37 °C, sendo homogeneizados a cada 10 minutos. Esse material foi lavado três vezes com PBS para a retirada da tripsina e centrifugado a 2000 g por 10 minutos a 4 °C.

Foram formados dois grupos, com dois gerbilos cada. O grupo 1 foi inoculado pela via intraperitoneal com a suspensão do cérebro do cão 1 e o grupo 2 com a suspensão de cérebro do cão 2. Esses animais foram observados durante 90 dias e eutanasiados. Seus tecidos (cérebro, coração, fígado, pulmão, linfonodo, músculo e medula) foram coletados para a realização de PCR (gene Nc-5) e o sangue para a realização da RIFI (≥ 50). No momento da eutanásia foi realizado, em triplicata, o exame direto do cérebro em busca de cistos de *N. caninum*.

3.8.3 Exame histopatológico e imuno-histoquímica

Fragmentos de cérebro, fígado, coração, músculo esquelético, linfonodo, medula e pulmão dos cães foram preservados em solução de formol tamponado e enviados ao Departamento de Patologia Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo para a realização exames histopatológicos. O exame histopatológico foi realizado em cortes teciduais corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) e a pesquisa de *N. caninum* foi feita pelo teste de imuno-histoquímica (IHQ) com anticorpo primário anti-*N. caninum* (VMRD, Pullman, EUA), como descrito no item 3.5.1.

4 RESULTADOS

A identificação dos búfalos doadores de inóculo e o título na RIFI são apresentados na tabela 2. Os três búfalos utilizados apresentaram títulos superiores a 200.

Tabela 2 – Título de anticorpos anti-*Neospora caninum* pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) nos búfalos utilizados nos bioensaios em cães para obtenção de oocistos do parasito.

Número dos búfalos	Título na RIFI	Cão
563	200	A
552	200	B*
562	400	C*

* Imunossupressão no 3º e 4º dia pós ingestão do cérebro

4.1 Bioensaio em cães

Dos cães imunossuprimidos, o cão C veio a óbito no 5º dia p.i e do 8º ao 17º dia p.i. O cão B eliminou oocistos semelhantes aos de *N. caninum* (forma esférica/subesférica, não esporulado, medindo aproximadamente 11,3 µm de diâmetro) como ilustrado na Figura 1.

Figura 1- Oocisto tipo-*N. caninum* visto nas fezes do cão B.

O cão A não eliminou oocistos durante os 30 dias de observação.

4.1.1 Caracterização molecular do isolado

Os oocistos eliminados pelo cão B foram testados pela PCR-RFLP sendo cada dia de eliminação analisado separadamente. Os oocistos examinados, procedentes de amostras obtidas do 8º ao 17ºdpi, foram identificados como *N. caninum* (Figura 2).

(A) - Enzima *KpnI* (B) - Enzima *StuI*

Figura 2 - Padrão do modelo de restrição das enzimas *KpnI* e *StuI*. (A) - *KpnI*: N.c. controle positivo de *N. caninum* (400pb); H.h. controle positivo de *H. heydorni* (136 e 264pb). (B) - *StuI*: N.c. controle positivo de *N. caninum* (150 e 250pb); H.h. controle positivo de *H. heydorni* (400pb). PM: peso molecular (100pb); 8 dpi - 17 dpi: dias de eliminação de oocistos pelo cão B.

4.1.2 Bioensaio em gerbilo (teste de viabilidade dos oocistos)

Os três gerbilos inoculados com os oocistos eliminados pelo cão B apresentaram anticorpos anti-*N. caninum* pela RIFI (≥ 100) e pelo WB quando examinados no dia 60 p.i. (Figura 3). Os resultados do WB utilizando antígeno total e proteína purificada foram semelhantes e confirmaram todos os resultados da RIFI.

Figura 3 – Análise pelo *Western blotting* do soro dos gerbilos (1, 2 e 3) após 60 dias de infecção com oocistos esporulados de *N. caninum*. (A): Antígeno total de *N. caninum*; (B): Antígeno purificado p38 (NcSRS2) de *N. caninum*; PM: peso molecular.

Os cérebros dos três gerbilos, quando examinados pela PCR em tempo real, foram positivos e o coração foi negativo para *N. caninum*. No exame direto do cérebro, realizado logo após a eutanásia, não foi observada a presença de cistos e estes mesmos tecidos (coração e cérebro) também não foram positivos na imuno-histoquímica.

4.2 Infecção dos cães com oocistos de *N. caninum*

Não foram observados oocistos nas fezes de nenhum dos cães que receberam oocistos de *N. caninum* durante o período de observação de 30 dias.

Os cães 1 e 4, que receberam 10.000 oocistos, apresentaram anticorpos anti-*N. caninum* 30 dias p.i. com título de 1600 e de 800, respectivamente (Tabela 3). Os cães 2 e 3, acompanhados durante seis meses para avaliar a soroconversão, não apresentaram anticorpos anti-*N. caninum* até o final do período de observação.

Todos os cães permaneceram clinicamente saudáveis durante o experimento.

Tabela 3 – Identificação dos cães e respectivos tratamentos (número de oocistos esporulados de *N. caninum*) e presença de anticorpos pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e pelo *Western blotting* (WB).

Cão No.	No. de oocistos (inóculo)	Soroconversão (dias p.i.)	Título na RIFI	WB	Eliminação de oocistos
1	10.000	30°	1600	P	N
2	5.000	não	<50	N	N
3	1.000	não	<50	N	N
4	10.000	30°	800	P	N

p.i. = pós infecção; N = negativo; P = positivo.

O WB apresentou bandas reconhecendo antígenos imunodominantes presentes no extrato total de taquizoítos, bem como o antígeno recombinante p38, sendo os resultados com estes dois antígenos semelhantes e confirmaram os achados da RIFI (Figuras 4 e 5).

Figura 4 – Análise do soro dos cães experimentalmente infectados com oocistos esporulados de *N. caninum*, no momento da infecção (dia 0) e aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias pós infecção, pelo *Western blotting* (WB), utilizando antígeno total de *N. caninum*.

1, 2, 3, 4 = cães 1, 2, 3, 4

P = controle positivo; N = controle negativo

PM = peso molecular

Figura 5 – Análise do soro dos cães experimentalmente infectados com oocistos esporulados de *N. caninum*, no momento da infecção (dia 0) e aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias pós infecção, pelo *Western blotting* (WB), utilizando antígeno purificado p38 (NcSRS2) de *N. caninum*.

1, 2, 3, 4 = cães 1, 2, 3, 4

P = controle positivo; N = controle negativo

PM = peso molecular

4.3 Necrópsia, coleta e processamento do material dos cães

Todos os tecidos examinados (cérebro, músculo, linfonodo, fígado, pulmão, coração e medula) dos cães 1 e 2, testados pela PCR (gene Nc-5) e pela histopatologia e IHQ, foram negativos quanto à presença de *N. caninum*.

O resultado do bioensaio em gerbilos com o material dos cães 1 e 2 também foi negativo, sem o encontro de cistos cerebrais pelo exame direto, nem do DNA do agente pela PCR, bem como a ausência de anticorpos anti-*N. caninum* quando mensurada pela RIFI.

5 DISCUSSÃO

O uso de oocistos esporulados de *N. caninum*, via oral em cães, não causou infecção patente com produção de oocistos, entretanto a formação de anticorpos parece ter sido dose dependente.

Este foi o primeiro estudo com este objetivo.

Para a obtenção dos oocistos utilizados no estudo, cérebros de búfalos soropositivos para *N. caninum* serviram como inóculos. Estes búfalos se mostraram bons doadores como observado por Rodrigues et al. (2004).

Dos três cães utilizados para obtenção de oocistos, dois foram imunossuprimidos e destes, um veio à óbito e o outro eliminou oocistos nas fezes por 10 dias. Esses três cães eram animais jovens, com aproximadamente 60 dias de idade nos quais a infecção pelo *N. caninum* associada à imunossupressão e a presença de infecção concomitante por outros parasitos (*Cystoisospora canis*, *C. ohioensis* e *Giardia* spp), provavelmente foram a causa do óbito de um dos cães.

O cão que não recebeu tratamento imunossupressor não eliminou oocistos durante os 30 dias de observação. Lindsay et al. (1999) utilizaram dois cães em infecção experimental com cistos de *N. caninum* sendo que um deles foi imunossuprimido. Estes cães receberam cérebro de camundongos e observou-se a eliminação de oocistos nas fezes. O cão que recebeu o tratamento imunossupressor eliminou oocistos por mais tempo, do 5º ao 10º dia pós infecção (dpi) e no 17ºdpi, e em maior quantidade (cerca de $4,5 \times 10^6$ oocistos). O cão que não recebeu tal tratamento, eliminou oocistos em apenas dois momentos, no 6º e no 9ºdpi e, em ambos os momentos, poucos oocistos. Assim, como observado no presente estudo, o tratamento imunossupressor é indicado quando se necessita de uma grande quantidade de oocistos de *N. caninum*.

O período pré patente de oito dias, observado neste estudo, está em concordância com trabalhos de infecção experimental em cães (GONDIM et al., 2002; McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999; RODRIGUES et al., 2004). A quantidade de oocistos eliminada pelo cão durante os 10 dias foi de aproximadamente 80.000 oocistos. Rodrigues et al. (2004) também infectaram cães com cérebro de búfalos e estes eliminaram oocistos em quantidade que variou de 20.000 a 800.000 oocistos. Os cães eram jovens, porém não imunossuprimidos.

A utilização de cães jovens em infecções experimentais com *N. caninum* para a obtenção de oocistos já foi relatada por Gondim et al. (2005), mostrando que estes eliminam mais oocistos que os animais adultos sendo também importante o uso de cães jovens para tal finalidade.

Os oocistos observados nas fezes dos cães doadores, por serem morfologicamente similares, foram diagnosticados como sendo *Neospora-Hammondia* (DUBEY, 1999; DUBEY et al., 2002; SCHARES et al., 2001). Assim, amostras foram analisadas, por dia de eliminação, pela PCR-RFLP, método que os identificou como sendo *N. caninum*. Só então um *pool* destes oocistos foi realizado para compor o inóculo utilizado no presente estudo.

Gerbilos foram utilizados para testar a viabilidade destes oocistos. Dubey e Lindsay (2000) demonstraram ser essa espécie animal um bom modelo de infecção oral com oocistos e vários outros estudos já os utilizaram com tal finalidade. Ramamoorthy et al. (2005) realizaram um estudo de infecção experimental em gerbilos com diferentes doses de taquizoítos de *N. caninum* inoculados intraperitonealmente, de 1×10^6 a 5×10^6 , sendo os gerbilos observados durante 20 dias. Todos tornaram-se menos ativos ao redor do 4º a 5ºdpi e todos os gerbilos do grupo infectado com 5×10^6 taquizoítos morreram entre o 7º e 10ºdpi. Dubey et al. (2007) inocularam gerbilos com tecido nervoso de cães naturalmente infectados e estes apresentaram soroconversão, porém não foram observados cistos teciduais quando os gerbilos foram eutanasiados três meses após a infecção. Resultado semelhante foi encontrado por Basso et al. (2001) que infectaram três gerbilos com oocistos de *N. caninum*, via oral, e imunossuprimiram dois deles. Apenas um dos gerbilos imunossuprimidos apresentou cistos no cérebro.

Kang et al. (2009) realizaram um estudo infectando gerbilos com taquizoítos de *N. caninum* (de 5×10^1 a 4×10^7 taquizoítos), intraperitonealmente, e determinaram a distribuição tecidual e as lesões histológicas nos gerbilos infectados num período de horas a até nove dias pós infecção. Através dos resultados da PCR observaram que o cérebro foi o último órgão a ser invadido pelo parasito, e que estes inicialmente penetram no fígado, baço e rim e, subsequentemente, espalham-se para órgãos adjacentes. As lesões histológicas foram observadas apenas no fígado e no baço. Assim, a inclusão desses órgãos juntamente com o cérebro, na pesquisa do parasito, é medida recomendada.

A infecção dos cães e dos gerbilos foi feita simultaneamente e com o mesmo inóculo, pois o tempo de observação da infecção nos roedores é de, no mínimo, oito semanas e os oocistos poderiam não estar apresentando a mesma viabilidade após este período. O encontro

de anticorpos séricos, seja pela RIFI ou pelo WB e de DNA, pela PCR em tempo real dos tecidos dos gerbilos, confirmaram a viabilidade dos oocistos de *N. caninum* utilizados como inóculos. Entretanto, cistos de *N. caninum* não foram observados nos cérebros desses animais semelhante ao observado em outros estudos (DUBEY et al., 2007; BASSO et al., 2001)

Uma explicação para o não encontro de cistos teciduais pode ser a quantidade de tecido examinada, mesmo utilizando três alíquotas para cada gerbilo a amostra ainda é reduzida. Dubey (1988) avalia que deva existir um cisto de *T. gondii* por 50g de tecido em grandes animais, entretanto para *N. caninum* este dado não é conhecido, podendo ser ainda menor, visto que cistos desse agente são pouco observados em órgãos que não o sistema nervoso central. Com *T. gondii* sabe-se que a cepa pode ser mais ou menos formadora de cistos e este fato também pode ocorrer com *N. caninum*. Mesmo com o resultado negativo no exame direto, recomenda-se que se realize esta pesquisa no tecido nervoso uma vez que em alguns estudos, com esses animais, cistos foram encontrados e auxiliam muito na confirmação do diagnóstico (GONDIM et al., 2001; PENA et al., 2007).

A pesquisa de DNA do *N. caninum* pela PCR em tempo real mostrou-se sensível na detecção do agente no cérebro dos gerbilos infectados com oocistos, porém não teve o mesmo sucesso em relação ao coração. Dubey et al. (1998) analisaram amostras de tecido (cérebro e músculo) de cães infectados naturalmente e ambos foram positivos pela PCR. De Marez et al. (1999) detectaram DNA no cérebro e medula de bezerros infectados, mas o mesmo tecido analisado em duplicata foi positivo em uma reação e negativo em outra. Trees et al. (2002) realizaram um *pool* de tecidos (cérebro e coração) das vacas infectadas e detectaram a presença do parasito, também pela PCR.

O uso da IHQ para detecção de DNA nos tecidos dos gerbilos inoculados com oocistos mostrou ser esta técnica de baixa sensibilidade. Como o agente é pesquisado em tecidos e apenas uma pequena quantidade é analisada, os cistos podem não estar presentes nessas amostras. Rosa et al. (2001) demonstraram que caprinos infectados experimentalmente com *T. gondii* e com diagnóstico da infecção confirmado por provas sorológicas e biológicas e, inclusive, com sintomatologia clínica de toxoplasmose nos animais, não conseguiram encontrar o agente pela técnica de IHQ.

Não há lesões patognômicas de neosporose. Embora o diagnóstico presuntivo possa ser feito pelo exame de seções de cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (HE), a IHQ é necessária porque há poucos parasitos presentes nos tecidos e muitas vezes não visíveis no HE. Raramente há parasitos de *N. caninum* em número suficiente em cada corte

histológico, portanto, a sensibilidade da técnica para detectar o parasito nos tecidos é baixa (DUBEY, 1999). Cérebro, coração, fígado, placenta e sangue são as melhores amostras para diagnóstico e este aumenta se múltiplos tecidos são examinados em conjunto (DUBEY, 2003).

As técnicas sorológicas (RIFI e WB) mostraram-se úteis com resultados semelhantes, sendo que o WB foi utilizado como confirmatório da RIFI, tanto para os gerbilos como para os cães. Ambas as técnicas foram mais sensíveis que os outros métodos utilizados (PCR, IHQ e exame direto).

Os achados deste estudo com infecção de cães com oocistos de *N. caninum* não foram similares ao que ocorre com *T. gondii*. A ingestão de oocistos esporulados de *T. gondii*, pelos gatos, é capaz de produzir infecção e consequentemente a eliminação de oocistos nas fezes. O período pré patente é maior (18 dias ou mais) e um pequeno número de gatos eliminam esses oocistos e em um número reduzido. Estes achados foram observados por Dubey (2006) que infectou 29 gatos com oocistos, via oral, com doses variando de 10^1 a 10^6 , e apenas um gato (3,44%), que recebeu a dose de 10^3 , eliminou oocistos nas fezes e o período pré patente foi de 23 dias. Assim, oocistos de *T. gondii* não são patogênicos para os gatos, mas são para camundongos. Todos os gatos que receberam a maior dose soroconverteram sugerindo que a infectividade dos oocistos de *T. gondii* foi dose dependente e que o período pré patente depende do estágio e não da dose do parasito.

Assim, para *T. gondii* e *N. caninum* como em outros coccídeos formadores de cistos (como *Sarcocystis cruzi*), a forma mais eficiente de transmissão do agente é pelo carnivorismo quando o hospedeiro definitivo ingere cistos teciduais contendo bradizoítos (DUBEY et al., 2001; 2006).

No presente estudo os cães receberam doses variando de 10^3 a 10^4 oocistos e apenas os cães que receberam 10^4 oocistos soroconverteram. Esta dose foi considerada alta, uma vez que cães natural ou experimentalmente infectados eliminam poucos oocistos nas fezes (BASSO et al., 2001, 2008; McGARRY et al., 2003; McINNES et al., 2006; SCHARES et al., 2005; SLAPETA et al., 2002) e, como visto com *T. gondii*, uma dose de 10^3 oocistos foi capaz de produzir infecção em um gato. Sabe-se que em gerbilos uma dose de 10^3 oocistos de *N. caninum* foi capaz de causar a infecção e a morte entre seis e 13 dpi (DUBEY e LINDSAY, 2000). De Marez et al. (1999) infectaram bezerros com oocistos de *N. caninum* (10^4 e 10^5) e todos soroconverteram quatro semanas p.i e DNA foi detectado pela PCR. Trees et al. (2002) infectaram vacas prenhes com 600 oocistos de *N. caninum*; esta dose foi

suficiente para infectar esses animais, confirmado pela PCR e pela soroconversão três semanas p.i., porém não foi capaz de causar aborto e não houve evidência de transmissão transplacentária.

Sabe-se que a ausência de anticorpos não significa que o cão esteja livre da infecção. Cães infectados experimentalmente podem eliminar oocistos sem apresentarem soroconversão (DIJKSTRA et al., 2001; LINDSAY et al., 1999; RODRIGUES et al., 2004; SCHARES et al., 2001) e já foi observada a formação de anticorpo em cães em intervalo superior a sete meses (GONDIM et al., 2002).

Pela predileção do parasito pelo sistema nervoso e sabendo-se ser o gerbilo um modelo biológico útil na pesquisa do *N. caninum*, optou-se por realizar bioensaio em gerbilo com o cérebro de um cão que soroconverteu e com o cérebro de outro cão soronegativo. Também foi realizada a PCR (Nc5) e a IHQ, tanto do cérebro como de outros tecidos (músculo, linfonodo, fígado, pulmão, coração e medula) desses cães. Mais uma vez os resultados foram negativos, confirmando a não infecção de cães com oocistos esporulados de *N. caninum*.

6 CONCLUSÃO

Oocistos esporulados e viáveis de *N. caninum* não causaram infecção com produção de oocistos em cães, entretanto foram capazes de promover a formação de anticorpos quando a dose do inóculo foi de 10^4 oocistos esporulados.

REFERÊNCIAS*

ALVES NETO, A. F. **Avaliação da viabilidade de oocistos de *Neospora caninum* a diferentes condições de temperatura e ação de desinfetantes.** 2009. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ANDERSON, M. L.; BLANCHARD, P. C.; BARR, B. C.; DUBEY, J. P.; HOFFMAN, R. L.; CONRAD, P.A. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.198, p. 241-244, 1991.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology.** New York: John Wiley & Sons, Inc., 1990. v. 2, p. A.1.5.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Ed.). **Short protocols in molecular biology.** 4th ed. New York: Wiley, 1999. sections 2.3 – 2.7.

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

BARR, B. C.; ANDERSON, M. L.; WOODS, L. W.; DUBEY, J. P.; CONRAD, P. A. *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, p. 365–367, 1992.

BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; BREITMEYER, R.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M. L.; REYNOLDS, T.; CHAUVET, A. E.; DUBEY, J. P.; ARDANS A. A. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992). **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 202, n. 1, p. 113-117, 1993.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

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

BASSO, W.; HERRMANN, D. C.; CONRATHS, F. J.; PANTCHEV, N.; VRHOVEC, M. G. First isolation of *Neospora caninum* from the faeces of a dog from Portugal. **Veterinary Parasitology**, v. 159, n. 2, p. 162-166, 2009.

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

BJÖRKMAN, C.; JOHANSSON, O.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O. J.; UGGLA, A. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 208, p. 1441-1444, 1996.

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

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

BUXTON, D.; McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 546-552, 2002.

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

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

CARDOSO, J. M. S.; NISHI, S. M.; VIERO, L. M.; GENNARI, S. M. Detecção de *Neospora caninum* em fetos bovinos pela PCR em tempo real. CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 15, 2008, Curitiba. p. 57.

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

CHEADLE, M. A.; LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 85, p. 325-330, 1999.

COLE, R. A.; LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; SORJONEN, D. C.; DUBEY, J. P. Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. **The Journal of Parasitology**, v. 81, p. 208-211, 1995.

CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.; DIAS, M. M. Aborto bovino por *Neospora caninum* no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, p. 863-868, 2000.

CORBELLINI, L. G.; COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D. Granulomatous encephalitis in a neurologically impaired goat kid associated with degeneration of *Neospora caninum* tissue cysts. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, p. 416-419, 2001.

CORBELLINI, L. G.; PESCADOR, C. A.; FRANTZ, F.; WUNDER, E.; STEFFEN, D.; SMITH, D. R.; DRIEMEIER, D. Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection: Importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 172, n. 1, p. 114-120, 2006.

COSTA, K. S.; SANTOS, S. L.; UZÊDA, R. S.; PINHEIRO, A. M.; ALMEIDA, M. A. O.; ARAÚJO, F. R.; MCALLISTER, M. M.; GONDIM, L. F. P. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 157-159, 2008.

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

CUNHA FILHO, N. A.; LUCAS, A. S.; PAPPEN, F. G.; RAGOZO, A. M. A.; GENNARI, S. M.; LUCIA JUNIOR, T.; FARIAS, N. A. R. Fatores de risco e prevalência de anticorpos anti-

Neospora caninum em cães urbanos e rurais do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 301-306, 2008.

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

DIJKSTRA, T.; 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 for Parasitology**, v. 31, p. 747-752, 2001.

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

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 192, p. 1269-1285, 1988a.

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

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, p. 1578-1579, 1989.

DUBEY, J.P.; HARTLEY, W.J.; LINDSAY, D.S.; TOPPER, M.J. Fatal congenital *Neospora caninum* infection in a lamb. **Journal of Parasitology**, v. 76, p. 127-130, 1990.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis. **Parasitology Today**, v. 9, p. 452-458, 1993.

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

DUBEY, J. P.; RIGOLET, J.; GEORGE, C.; LAGOURETTE, P.; LONGEART, L.; LENET, J. L. Fatal transplacental neosporosis in a deer (*Cervus eldi siamensis*). **Journal of Parasitology**, v. 82, p. 338-339, 1996.

DUBEY, J. P.; DOROUGH, K. R.; JENKINS, M. C.; LIDDELL, C. A.; SPEER, C. A.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1293-1304, 1998.

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

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

DUBEY, J. P. Oocysts shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 215-219, 2001.

DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTAC, J. R.; BJERKÅS, I.; BJÖRKMAN, C.; BLAGBURN, B. L.; BOWMAN, D. D.; BUXTON, D.; ELLIS, J. T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D. E.; HOWE, D. K.; JENKINS, M. C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELAM, B.; MARSHO, A. E.; MATTSSON, J. G.; McALLISTER, M. M.; MODRÝ, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L. D.; SPEER, C. A.; TREES, A. J.; UGGLA, A.; UPTON, S. J.; WILLIAMS, D. J. L.; LINDSAY, D. S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidian. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 929-946, 2002.

DUBEY, J. P. Neosporosis in cattle. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 42-56, 2003.

DUBEY, J. P. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 69-75, 2006.

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

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

FRENKEL, J. K.; SMITH, D. D. Determination of the genera of cysts-forming coccidia. **Parasitology Research**, v. 91, p. 384-389, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

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

HILALI, M.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; KWOK, O. C.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from camels from Egypt. **Veterinary Parasitology**, v. 28, p. 269-271, 1998.

HILL, D. E.; LIDDELL, S.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. Specific detection of *Neospora caninum* oocysts in fecal samples from experimentally-infected dogs using the polymerase chain reaction. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 395-398, 2001.

KANG, S. W.; PARK, S. S.; CHOE, S. E.; JEAN, Y. H.; JUNG, S. C.; KIM, K.; QUYEN, D. V. Characterization of tissue distribution and histopathological lesions in *Neospora caninum* experimentally infected gerbils. **Parasitology Research**, v. 104, p. 1261-1268, 2009.

KOBAYASHI, Y.; YAMADA, M.; OMATA, Y.; KOYAMA, T.; SAITO, A.; MATSUDA, T.; OKUYAMA, K.; FUJIMOTO, S.; FURUOKA, H.; MATSUI, T. Naturally occurring *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses. **Journal Parasitology**, v. 87, p. 434-436, 2001.

KOYAMA, T.; KOBAYASHI, Y.; OMATA, Y.; YAMADA, M.; FURUOKA, H.; MAEDA, R.; MATSUI, T.; SAITO, A.; MIKAMI, T. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of pregnant sheep. **Journal Parasitology**, v. 87, p. 1486-1488, 2001.

LABARCA, C.; PAIGEN, K. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. **Analytical Biochemistry**, v. 102, p. 344-352, 1980.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, p. 1981-1983, 1989.

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

LOBATO, J.; SILVA, D. A. O.; MINEO, T. W. P.; AMARAL, J. D. H. F.; SEGUNDO, G. S.; COSTA-CRUZ, J. M.; FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S.; MINEO, J. R. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.13, p. 84-89, 2006.

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

McCANN, C. M.; VYSE, A. J.; SALMON, R. L.; THOMAS, D.; WILLIAMS, D. J. L.; McGARRY, J. W.; PEBODY, R.; TREES, A. J. Lack of serologic evidence of *Neospora caninum* in humans, England. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 978-980, 2008.

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

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

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

MONTEIRO, R. M.; RICHTZENHAIN, L. J.; PENA, H. F.; SOUZA, S. L.; FUNADA, M. R.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SREEKUMAR, C.; KEID, L. B.; SOARES, R. M. Molecular phylogenetic analysis in *Hammondia*-like organisms based on partial Hsp70 coding sequences. **Parasitology**, v. 134, p. 1195-1203, 2007.

MONTEIRO, R. M.; PENA, H. F.; GENNARI, S. M.; SOUZA, S. L.; RICHTZENHAIN, L. J.; SOARES, R. M. Differential diagnosis of oocysts of *Hammondia*-like organisms of dogs and cats by PCR-RFLP analysis of 70-kilodalton heat shock protein (Hsp70) gene. **Parasitology Research**, v. 103, p. 235-238, 2008.

OGASSAWARA, S.; BENASSI, S. Infecção experimental de gatos com coração de bovino parasitado por *Sarcocystis* sp. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 47, p. 27-32, 1980.

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

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

PAULA, V. S. O.; RODRIGUES, A. A. R.; RICHTZENHAIN, L. J.; CORTEZ, A.; SOARES, R. M.; GENNARI, S. M. Evaluation of a PCR based on *primers* to NC5 gene for

the detection of *Neospora caninum* in brain tissues of bovine aborted fetuses. **Veterinary Research Communications**, v. 28, p. 581-585, 2004.

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

PESCADOR, C. A.; CORBELLINI, L. G.; OLIVEIRA, E. C.; RAYMUNDO, D. L.; DRIEMEIER, D. Histopathological and immunohistochemical aspects of *Neospora caninum* diagnosis in bovine aborted fetuses. **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 259-163, 2007.

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

RAMAMOORTHY, S.; SRIRANGANATHAN, N.; LINDSAY, D. S. Gerbil model of acute Neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 111-114, 2005.

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

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

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

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

SCHARS, G.; HEYDORN, A. O.; CÜPPERS, A.; CONRATHS, F. J.; MEHLHORN, H. Cyclic transmission of *Neospora caninum*: serological findings in dogs shedding oocysts. **Parasitology Research**, v. 87, p. 873-877, 2001.

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

ŠLAPETA, J. R.; MODRÝA, D.; KYSELOÝA, I.; HOTEIS, R.; LUKES, J.; KOUDELA, B. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 157-167, 2002.

SOBRINO, R.; DUBEY, J. P.; PABÓN, M.; LINAREZ, N.; KWOK, O. C.; MILLÁN, J.; ARNAL, M. C.; LUCO, D. F.; LÓPEZ-GATIUS, F.; THULLIEZ, P.; GORTÁZAR, C.; ALMERÍA, S. *Neospora caninum* antibodies in wild carnivores from Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 155, p. 190-197, 2008.

SREEKUMAR, C.; HILL, D. E.; MISKA, K. B.; ROSENTHAL, B. M.; VIANNA, M. C.; VENTURINI, L.; BASSO, W.; GENNARI, S. M.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Hammondia heydorni*: evidence of genetic diversity among isolates from dogs. **Experimental Parasitology**, v. 107, p. 65-71, 2004.

STEINMAN, A.; SHPIGEL, N. Y.; MAZAR, S.; KING, R.; BANETH, G.; SAVITSKY, I.; SHKAP, V. Low seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in wild canids in Israel. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 155-158, 2006.

TRANAS, J.; HEINZEN, R.A.; WEISS, L. M.; McALLISTER, M. M. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, p. 765-767, 1999.

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

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

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

VIANNA, M. C. B.; SREEKUMAR, C.; MISKA, K. B.; HILL, D. E.; DUBEY, J. P. Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Veterinary Parasitology**, v. 129, p. 253-257, 2004.

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

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

YAI, L. E. O.; CAÑON-FRANCO, W. A.; RAGOZO, A. M. A.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in capybaras (*Hydrochoeris hydrochoeris*) from São Paulo state, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 94, p. 766, 2008.

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