GUACYARA TENÓRIO CAVALCANTE

**Infecção experimental por *Neospora caninum* em cães
(*Canis familiaris*) jovens, adultos e em cadelas gestantes**

Tese apresentada do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2010

GUACYARA TENÓRIO CAVALCANTE

**Infecção experimental por *Neospora caninum* em cães
(*Canis familiaris*) jovens, adultos e em cadelas gestantes**

Tese apresentada do Programa de Pós-Graduação do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

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

Orientadora: Profa Dra Solange Maria Gennari

São Paulo
2010

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

© reprodução total

Cavalcante, Guacyara.

Infecção experimental por *Neospora caninum* em cães (*Canis familiaris*) jovens, adultos e em cadelas gestantes / Guacyara Cavalcante. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Solange Maria Gennari.

Tese (Doutorado) – 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 with *Neospora caninum* in young and adult dogs (*Canis familiaris*), adults and pregnant bitches.

Descritores: 1. *Neospora caninum* 2. Oocistos 3. Infecção transplacentária 4. Cães I. Gennari, Solange Maria II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. III. Título.

ICB/SBIB078/2010

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Candidato(a): GUACYARA TENÓRIO CAVALCANTE

Título da Dissertação: Infecção experimental por *Neospora caninum* em cães (*Canis familiaris*) jovens, adultos e em cadelas gestantes.

Orientador: Solange Maria Gennari.

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:.....
Nome:
Instituição:

Aos meus pais, João e Sônia, pelo amor, incentivo e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Sem vocês, nada disso seria possível.

Aos meus irmãos, Tayguara e Aymberê, pelo carinho, ajuda e paciência.

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra Solange Maria Gennari pela oportunidade, confiança no meu trabalho e amizade. Isto resultou num sentimento de imensa gratidão e admiração.

À Dra Sandra M. Nishi pela ajuda na elaboração e execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr Rodrigo Martins Soares pelo auxílio e ensinamento em todas as etapas das técnicas de biologia molecular.

Ao programa de pós graduação do Instituto de Ciência Biomédicas- ICB-USP

À Dra Hilda F. Pena pelos ensinamentos em técnicas de laboratório e ajuda na análise dos exames copro-parasitológicos.

Aos colegas de pós- graduação Aldo, Luciana, Patrícia e Anaiá, no cuidado com os cães do experimento e a todos os demais que tenham direta ou indiretamente contribuído para o bem estar dos animais.

À Renata, Michelle e Juliana pelo auxílio na realização das extrações de DNA e PCR.

À Sheila pela realização dos seqüenciamentos das amostras.

Ao Pedrinho pela ajuda no cuidado com os animais e limpeza do canil.

À Wilma e Ângela da Secretaria de Pós-graduação do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pela dedicação.

À Secretaria do Departamento de Medicina Veterinária e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VPS-FMVZ-USP) pelo acolhimento, e em especial, ao Danival, pela amizade e carinho.

Aos funcionários Antônio Santa Roza, João Augusto Metzner e José Roberto Devitto do VPS-FMVZ-USP, campus Pirassununga, pelo carinho e ajuda na execução do trabalho.

Ao Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP, Prof. Dr. Paulo Maiorka, pela realização da técnica de Imunoistoquímica e histopatologia dos animais.

Ao Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP, Prof. Dr. Stéfano Carlo Filippo Hagen, pela ajuda na realização e avaliação dos exames ultrassonográficos das cadelas.

Ao Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP, Profa Dra Camila Infantoni Vannuchi e pós graduandas Cristina de Fátima Lúcio, Liege Cristina Garcia Silva e Fernanda Machado Regazzi pelo auxílio nas técnicas de avaliação reprodutiva animal.

Ao Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP, Profa Dra Clair Motos Oliveira pela ajuda no acompanhamento obstétrico das cadelas.

Aos funcionários do Departamento de Radiologia da FMVZ-USP, pelo acompanhamento radiográfico das cadelas.

Aos Departamentos de Clínica Cirúrgica da FMVZ-USP e VPS- FMVZ-USP (campus de Pirassununga) por cederem o canil para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP em ceder a casa do residentes durante minha permanência no campus de Pirassununga.

Ao Departamento de Patologia Veterinária da UNESP- campus de Jaboticabal, Profa Dra Rosângela Zacarias Machado pelo oferecimento do laboratório para a realização da técnica de imunofluorescência indireta dos soros bovinos.

Aos Frigoríficos Barra Mansa, Taquaritinga e da USP- campus de Pirassununga pelo fornecimento dos tecidos e amostras de sangues bovinos.

À Fort Dodge pelo fornecimento das vacinas utilizadas nos cães.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPQ, pela concessão de verba para a execução deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP, pela concessão de bolsa de doutorado.

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

Às minhas amigas de longa data Cynthia, Raffaella, Kazumi, Lúcia, Mimi e Janny pelo carinho e apoio.

Aos meus tios e primos pelo amor e incentivo.

“A compaixão para com os animais é das mais nobres virtudes da natureza humana”.

Charles Darwin

RESUMO

CAVALCANTE, G.T. **Infecção experimental por *Neospora caninum* (*Canis familiaris*) em cães jovens, adultos e em cadelas gestantes.** 2010. 105 f. Dissertação (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Neospora caninum está amplamente distribuído mundialmente e é um dos maiores causadores de abortos em bovinos, sendo os cães e os coiotes os hospedeiros definitivos. Várias espécies de animais domésticos e silvestres são acometidas, sendo que a infecção dos cães ocorre através da ingestão de tecidos contendo cistos, levando à excreção de oocistos nas fezes ou verticalmente pela transmissão transplacentária. Este estudo objetivou avaliar a transmissão transplacentária por *N. caninum* em diferentes fases da gestação (Experimento I); e, ainda, avaliar diferentes tecidos de bovinos infectados pelo coccídio como meio de transmissão de *N. caninum* em cães jovens e adultos (Experimento II). No Experimento I, seis cadelas foram inoculadas com 10^8 taquizoítos de *N. caninum* (cepa Nc-1) por via subcutânea sendo três inoculadas na 3ª semana de gestação (GI) e três na 6ª semana de gestação (GII) e uma permaneceu como controle. Os filhotes nascidos foram clinicamente avaliados quanto à sua condição física e neurológica e sacrificados ao 35º dia pós-nascimento, para a pesquisa de *N. caninum* em amostras de Sistema Nervoso Central (SNC), linfonodos poplíteos, musculatura esquelética (coxa), cérebro, pulmões, coração e fígado. Amostras dos mesmos tecidos foram coletadas das mães, incluindo a placenta, obtida quando possível. Estes tecidos foram analisados para a pesquisa de DNA do parasita por *nested* PCR e RFLP (restriction fragment length polymorphism) e do agente por imunistoquímica (IHQ) e histopatologia (HE). Observou-se que todas as cadelas infectadas, e pelo menos um de seus filhotes, apresentaram soroconversão a anticorpos anti-*N. caninum* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). O parasita foi verificado pela HE em amostra de SNC e através de métodos moleculares (*nested* PCR ITS-1 e RFLP) em tecido de linfonodo, cérebro, coração e fígado. No Experimento II, 17 cães com aproximadamente 60 dias de idade e 12 cães com 12 meses de idade receberam diferentes tecidos coração, cérebro, masseter e fígado de bovinos

naturalmente infectados com *N. caninum*. O total de fezes eliminado por cada um dos cães foi coletado e examinado diariamente durante 30 dias, e os oocistos obtidos foram contados e analisados através de Reação de PCR com *primers* específicos e Seqüenciamento para confirmação do gênero coccídio. Nenhum dos cães jovens e adultos soroconverteu, e apenas os cães jovens eliminaram oocistos de *N. caninum* ao ingerirem masseter (2 cães, 40%), coração (2 cães, 40%), fígado (1 cão, 33%) e cérebro (3 cães, 75%). A média de oocistos eliminados foi de 1152, 2704, 317 e 959, respectivamente, para masseter, coração, fígado e cérebro ingeridos pelos cães. DNA de *H. heydorni* foi encontrado em dois cães que ingeriram coração e em dois cães que ingeriram masseter, entretanto co-infecção por *N. caninum* e *H. heydorni* não foi observada. Os achados permitiram concluir que cérebro, coração, masseter e fígado, podem ser possíveis fontes de infecção de *N. caninum* para cães jovens.

Palavras- chave: *Neospora caninum*. Oocistos. Infecção transplacentária. Cães.

ABSTRACT

CAVALCANTE, G. T. **Experimental infection with *Neospora caninum* in young dogs (*Canis familiaris*), adults and in pregnant bitches.** 2010. 105 p. Dissertation (Doctor of Sciences) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Neospora caninum is widely distributed worldwide and is a major cause of abortion in cattle, and dogs and coyotes are the definitive hosts. Several species of domestic and wild animals are affected, and the infection of dogs occurs through ingestion of tissues containing cysts, leading to the excretion of oocysts in feces or vertically by transplacental transmission. The objectives of this study were to evaluate transplacental transmission of *N. caninum* in different stages of gestation (Experiment I) and examine various tissues of cattle infected by the coccidian as a means of transmission of *N. caninum* in young and adult dogs (Experiment II). In Experiment I, six bitches were inoculated with 10^8 tachyzoites of *N. caninum* (Nc-1 strain) subcutaneously. Three were inoculated in the third week of gestation (GI) and three in the sixth week of gestation (GII) and one remained as non- infected, control. The offspring were clinically evaluated for their physical and neurological condition and sacrificed at 35 days post-birth, for the detection of *N. caninum* in samples of central nervous system (CNS), popliteal lymph nodes, skeletal muscle (thigh), brain, lungs, heart and liver. Samples from the same tissues were collected from mothers, including the placenta, obtained when possible. These tissues were analyzed for the presence of DNA of the parasite by nested PCR and RFLP (restriction fragment length polymorphism) and the agent by immunohistochemistry (IHC) and histopathology (HE). It was observed that all the infected dogs, and at least one of their offspring, seroconverted to anti-*N.caninum* antibodies by Immunofluorescence Assay (IFA). The parasite was found by HE in a sample of CNS and by molecular methods (PCR and RFLP ITS-1) in lymph node tissue, brain, heart and liver. In Experiment II, 17 dogs approximately 60 days old and 12 dogs around 12 months old received different tissues of cattle naturally infected with *N. caninum*, being heart, brain, liver and masseter. The total feces eliminated by each of the dogs were collected and examined daily for 30 days, and the oocysts were counted and analyzed the PCR reaction with specific primers and sequencing for confirmation of the coccidian genus. None of the young and adult dogs seroconverted, and only the young dogs shed oocysts of *N. caninum* by eating

masseter (2 dogs, 40%), heart (2 dogs, 40%), liver (one dog, 33%) and brain (3 dogs, 75%). The mean number of oocysts eliminated was 1152, 2704, 317 and 959, respectively, for masseter, heart, liver and brain ingested by the dogs. DNA of *H. heydorni* was found in two dogs that had ingested heart and two dogs that had ingested masseter, however co-infection with *N. caninum* and *H. heydorni* was not observed. The findings revealed that brain, heart, liver and masseter may be possible sources of infection of *N. caninum* for young dogs.

Keywords: *Neospora caninum*, Oocysts, Transplacental Infection, Dogs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Resultado da *Hemi-nested* PCR(*hn* PCR-Nc5) direcionada ao gene Nc5 para detecção de *N. caninum* em oocistos eliminados por cães experimentalmente infectados com diferentes tecidos bovinos. Gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídio.....49

Figura 2- Resultado da *Hemi-nested* PCR(*hn* PCR-Nc5) direcionada ao gene Nc5 para detecção de *N. caninum* em oocistos eliminados por cães experimentalmente infectados com diferentes tecidos bovinos. Gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídio.....74

Figura 3- Resultado da PCR direcionada ao locus ITS-1 para detecção de *N. caninum* em oocistos eliminados por cães experimentalmente infectados com diferentes tecidos bovinos. Gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídio.....75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Observações reprodutivas das gestantes, controle e infectadas com 10^8 taquizoítos de <i>N. caninum</i> (sc), na 3 ^a e 6 ^a semana de gestação.....	52
Tabela 2- Título de anticorpos anti- <i>N. caninum</i> em cadelas infectadas na 3 ^a semana de gestação (GI), na 6 ^a semana de gestação (GII) e controle sem infecção (GIII) e de suas respectivas crias pela RIFI no 35 ^o dias pós-parto.....	53
Tabela 3- Relação dos filhotes das cadelas infectadas durante a 3 ^a (GI) e a 6 ^a (GII) semana de gestação com <i>N. caninum</i> , nos quais se encontraram, em diferentes tecidos, DNA de <i>N. caninum</i> pela nested PCR e alterações pela hematoxilina-eosina (HE).....	54
Tabela 4- Quantidade de tecido ingerido por órgão oferecido aos cães que eliminaram oocistos de <i>N. caninum</i>	71
Tabela 5- Isolamento de <i>N. caninum</i> e <i>H. heydorni</i> em cães alimentados com diferentes tecidos de bovinos soropositivos a <i>N. caninum</i>	72
Tabela 6- Quantidade e dias de eliminação de oocistos de <i>N. caninum</i> pelos cães alimentados com diferentes tecidos bovinos.....	73

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1-** Delineamento experimental da infecção por *N. caninum* (10^8 taquizoítos via sc) em cadelas em diferentes períodos da gestação.....40
- Quadro 2-** Seqüências dos *primers* usados nas reações de PCR e nested PCR ITS-1 para identificação de *N. caninum*.....45
- Quadro 3-** Representação esquemática da atividade das enzimas de restrição RsaI e TaqI para diferenciar os produtos das reações da *nested* PCR ITS-1.....47
- Quadro 4-** Número de cães alimentados com diferentes órgãos de bovinos naturalmente infectados com *N. caninum* e número de cães controle, não infectados, nos estudos 1 e 2.....62
- Quadro 5-** Seqüências dos *primers* usados nas reações de *hemi-nested*.....66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	porcentagem
®	marca registrada
µg	micrograma(s)
µL	microlitro(s)
µm	micrometro
d	densidade
d.p.i	dias pós infecção
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	teste imunoenzimático(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
EUA	Estados Unidos da América
<i>et al.</i>	e outros; e colaboradores
<i>g</i>	aceleração da gravidade terrestre (9,8m/s ²)
g	grama(s)
<i>hn</i>	<i>hemi-nested</i>
HCL	ácido clorídrico
HE	hematoxilina e eosina
IHQ	imunoistoquímica
ITS	Internal Transcribed Spacer
Kg	kilograma
M	Molar
MG	miligramas
MgCl ₂	cloreto de magnésio

Min	minuto
mL	mililitro(s)
mM	milimolar
N	normal
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
nm	nanômetros
°C	grau Celsius
p/v	peso/volume
pb	pares de bases
PBS	salina tamponada com fosfato
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	concentração de hidrogênio iônico
PM	peso molecular
RFLP	restriction fragment length polymorphisms
RIFI	reação de imunofluorescência indireta
SDS	dodecilsulfato de sódio
Seg	segundo
<i>Taq</i>	<i>Thermophillus aquaticus</i>
TBE	tampão Tris-borato-EDTA
TE	tampão Tris- EDTA
U	unidade internacional
v/v	volume/volume

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2 OBJETIVOS.....	39
3 EXPERIMENTO I.....	40
3.1 Material e métodos.....	40
3.1.1 Delineamento experimental.....	40
3.1.2 Cães.....	40
3.1.3 Coleta de soro e pesquisa de anticorpos anti- <i>N. caninum</i>	42
3.1.4 Extração de DNA de amostras de tecidos.....	43
3.1.5 PCR.....	44
3.1.6 Restrição enzimática.....	46
3.1.7 Imunoistoquímica e histopatologia.....	49
3.2 Resultados	52
3.3 Discussão	55
4 EXPERIMENTO II.....	61
4.1 Material e métodos.....	61
4.1.1 Delineamento experimental.....	61
4.1.2 Bovinos doadores.....	62
4.1.3 Exame coproparasitológico.....	62
4.1.4 Colheita de sangue.....	63

4.1.5 Diagnóstico molecular.....	63
4.1.5.1 Recuperação de oocistos nas amostras de fezes.....	64
4.1.5.2 Extração de DNA dos oocistos.....	64
4.1.5.3 PCR.....	65
4.1.5.4 Detecção do produto amplificado.....	67
4.1.5.5 Seqüenciamento.....	68
4.2 Resultados	70
4.2.1 Estudo 1.....	70
4.2.2 Estudo 2.....	76
4.3 Discussão.....	76
5 CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS.....	85

1 REVISÃO DE LITERATURA

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório, formador de cistos, pertencente ao filo Apicomplexa, causador da doença conhecida por neosporose. Este coccídio acomete vários animais domésticos e silvestres, notadamente nas espécies canina e bovina. Em 1988, foi reconhecido como nova espécie e gênero (DUBEY et al., 1988a). Em 1984, na Noruega, cães foram diagnosticados com uma doença neurológica, com quadro semelhante à toxoplasmose. Taquizoítos foram encontrados no cérebro e músculos, porém a presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* não foi detectada no soro destes cães, os quais, tampouco responderam ao bioensaio em camundongos (BJERKAS; MOHN; PRESTHUS, 1984). Alguns anos mais tarde nos Estados Unidos, em 1988, verificou-se que esse agente causava em cães uma forma clínica mais severa do que a causada pelo *T. gondii* e foram constatadas diferenças estruturais e histopatológicas entre ambos (DUBEY e LINDSAY, 1993).

O primeiro isolado foi obtido de cães (DUBEY et al., 1988b), e o agente nomeado *Neospora caninum*. O exame de amostras teciduais armazenadas revelou que este parasito já acometia cães com sinais neurológicos desde a década de 50 (DUBEY e LINDSAY, 1993). Nos anos posteriores, deu-se o desenvolvimento e a padronização de métodos de diagnóstico os quais viabilizaram a realização de estudos epidemiológicos (PARE; HIETALA; THURMOND, 1995; BJÖRKMAN; UGGLA, 1999).

Embora a ocorrência seja relativamente freqüente na natureza, o grau de patogenicidade do *N. caninum* varia com a espécie do hospedeiro. Dentre os animais domésticos, os bovinos se destacam por sua maior suscetibilidade e estes

apresentam perdas na esfera reprodutiva como abortamentos, natimortalidade ou nascimento de bezerros aparentemente saudáveis, porém infectados. A infecção também pode ser transmitida da vaca para o bezerro pela via transplacentária e pode ocorrer ao longo de sucessivas gestações e, assim sendo, disseminar a infecção no rebanho.

Desde sua descrição, *N. caninum* vem sendo implicado como um dos principais causadores de aborto em bovinos em praticamente todo o mundo. O impacto econômico da infecção por esse parasito está relacionado tanto ao valor dos fetos abortados, quanto aos custos indiretos como: auxílio profissional, redução da vida produtiva da vaca, aumento do tempo de lactação, possíveis quedas na produção de leite e custo de técnicas de diagnóstico (THURMOND e HIETALA, 1997). Mesmo sendo difícil obter valores precisos sobre as perdas econômicas da indústria pecuária devido à neosporose, estima-se que seja de milhões de dólares. Na Califórnia, foi estimado que esse protozoário possa causar prejuízos de 35 milhões de dólares americanos por ano aos produtores de leite (LINDSAY, 1998). No Canadá, a perda total anual foi estimada em 2.304 dólares canadenses para um rebanho leiteiro de 50 vacas (CHI et al., 2002). Na Nova Zelândia e Austrália, acredita-se que essas perdas possam passar de 100 milhões de dólares australianos anualmente (REICHEL, 2000). Na Suíça, a neosporose é considerada uma doença de notificação obrigatória e as perdas econômicas no gado leiteiro chegam a 9,7 milhões de Euros anualmente (HASLER et al., 2006a, b).

No Brasil, *N. caninum* foi diagnosticado a partir de 1999, em fetos abortados e vem sendo descrito através de levantamentos sorológicos de cães e bovinos de todas as regiões pesquisadas (GENNARI, 2004).

Mesmo em laboratórios de alta tecnologia de diagnóstico, a causa de mais de 50% dos abortos em bovinos permanece sem diagnóstico (ANDERSON et al., 1997; ANDERSON et al., 2000). O estabelecimento de uma relação de causa-efeito entre o aborto e *N. caninum* em bovinos é muito complexo, porque as infecções congênitas assintomáticas por *N. caninum* são comuns e a presença do parasito ou o DNA do parasito não significa que *N. caninum* causou o aborto. Deve-se também levar em conta que os anticorpos no rebanho bovino podem flutuar substancialmente e podem até cair abaixo do ponto de corte do teste sorológico usado. Cardoso et al.

(2009) demonstraram que o anticorpo colostrar para *N. caninum* pode ser detectado nos bezerros por até 21 semanas após a ingestão do mesmo.

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

Dentre os animais domésticos, anticorpos anti- *N. caninum* já foram verificados no gato doméstico (DUBEY et al., 2002; FERROGLIO et al., 2005; BRESCIANI et al., 2007), nos suínos (HELMICK et al., 2002; DAMRIYASA et al., 2004), nos ovinos (HELMICK et al., 2002; HÄSSIG et al., 2003; FIGLIUOLO et al., 2004; VOGEL et al., 2006; ROMANELLI et al., 2007), nos caprinos (DUBEY et al., 1996; OOI et al., 2000; NAGULESWARAN et al., 2004; FIGLIUOLO et al., 2004), em búfalos (FUJII et al., 2001; DE SOUZA et al., 2001; GENNARI et al., 2005) e em eqüinos (DUBEY et al., 1999; HOANE et al., 2006; LOCATELLI-DITRICH et al., 2006; VILLALOBOS et al., 2006).

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

Os coiotes também foram confirmados como hospedeiros definitivos do coccídio, eliminando oocistos em suas fezes (GONDIM et al., 2004a). Recentemente, na Austrália, King et al. (2010) verificaram que o cão australiano dingo (*Canis lupus dingo*) também é hospedeiro definitivo do *N. caninum*. É desconhecido se outros

canídeos ou até mesmo outras espécies animais possam atuar como hospedeiros definitivos do *N. caninum*.

Isolados de *N. caninum* em cães foram obtidos nos Estados Unidos (MARSH et al., 1998; DUBEY et al., 1998; CUDDON et al., 1992; HAY et al., 1990; DUBEY et al., 1988b), Reino Unido (BARBER et al., 1995), Alemanha (PETERS et al., 2000), Brasil (GONDIM et al., 2001) e Argentina (BASSO et al., 2001).

No Brasil, valores de ocorrência em cães (revisado por Gennari, 2004) variam de 4,3 a 58,9%.

Até o momento, não há modelos animais adequados para realizar bioensaio com intuito de isolar o agente. Embora camundongos *Knockout* (KO) do gene interferon-gama sejam altamente susceptíveis à inoculação parenteral com taquizoítos de *N. caninum* e cistos teciduais (DUBEY e LINDSAY, 1996), são eles menos susceptíveis à inoculação oral com oocistos. Camundongos de diferentes linhagens têm sido usados no isolamento do *N. caninum*, entre elas, Balb/c e nude, com graus de patogenicidade diferentes.

Gerbilos (*Meriones unguiculatus*) mostraram-se susceptíveis à infecção por oocistos e taquizoítos de *N. caninum* (DUBEY e LINDSAY., 2000; BASSO et al., 2001a; SCHARES et al., 2001), sendo estes vastamente utilizados como modelos de neosporose aguda, através de inoculação intraperitoneal de diferentes concentrações de taquizoítos (LINDSAY et al., 2005). Outras espécies de gerbilos, *Meriones tristami* e ratos “sand” (*Psammomys uesus*) são também susceptíveis à infecção por taquizoítos (PIPANO et al., 2002).

Atkinson et al. (1999) mostraram diferenças em relação às características biológicas das cepas de *N. caninum*. Compararam os isolados Nc- Liverpool e Nc-SweB1, verificando que a Nc- Liverpool causou danos mais severos aos camundongos Balb/c, indicando uma possível variabilidade no tocante ao potencial de patogenicidade aos roedores em geral, entre os isolados de *N. caninum*. Em outro estudo, o isolado Nc-MalB1 foi mais patogênico a camundongos Balb/c, ocasionando óbito em quatro de 10 camundongos (CHEAH et al., 2004). Rojo-Montejo et al. (2009) verificaram maior ocorrência de morte fetal, lesões histopatológicas em placenta e órgãos fetais em vacas infectadas com a cepa Nc-1 do que com o isolado Nc- Espanha 1H.

Apesar de anticorpos anti-*N. caninum* já terem sido reportados em humanos (LOBATO et al., 2006; STEINMAN et al., 2006), o parasito ainda não foi demonstrado em tecidos. Assim sendo, o potencial zoonótico é incerto. Nos Estados Unidos, 6,7% de 1029 amostras de soros humanos examinadas foram positivas ao *N. caninum*. Das 69 amostras positivas, 50 foram negativas ao *T. gondii*, sugerindo exposição humana ao *N. caninum* (TRANAS et al., 1999). Em Minas Gerais, Lobato et al. (2006) investigaram a presença de anticorpos anti- *N. caninum* em indivíduos tanto soropositivos quanto negativos a anticorpos anti- *T. gondii*. Esse estudo compreendeu pacientes saudáveis, HIV positivos, recém nascidos e adultos com problemas neurológicos. Os resultados indicaram a presença da infecção por *N. caninum* ou exposição em humanos, principalmente em pacientes HIV positivos ou com problemas neurológicos. Benetti et al. (2009), ao avaliarem anticorpos anti- *N. caninum* em 67 humanos de 24 propriedades de bovinos leiteiros, no Mato Grosso, verificaram soropositividade em sete humanos (10,5%).

O ciclo de vida do parasita é heteroxênico e envolve, de um lado, um hospedeiro definitivo e de outro um hospedeiro intermediário herbívoro. Os cães atuam tanto como hospedeiros definitivos quanto intermediários para o *N. caninum* (McALLISTER et al., 1998; DUBEY et al., 2002a). Os coiotes, apesar de também serem hospedeiros definitivos do *N. caninum*, são hospedeiros relativamente ineficientes, visto que eliminam níveis baixos de oocisto após infecção experimental (GONDIM et al., 2004).

O ciclo enteroepitelial do *N. caninum*, no intestino dos hospedeiros definitivos, ainda não foi completamente elucidado. Os oocistos excretados, que são a forma de resistência no ambiente pelo hospedeiro definitivo, irão esporular no ambiente entre 24 e 72 horas, dependendo de condições de temperatura, oxigenação e umidade. Cães eliminam os oocistos ao redor do quinto dia após ingestão de tecidos de animais naturalmente ou experimentalmente infectados (GONDIM et al., 2002).

Ao exame microscópico, os oocistos de *N. caninum* são morfologicamente similares aos de *Hammondia heydorni*, os quais também são encontrados nas fezes dos cães (DUBEY et al., 2002a). Os oocistos medem 11,7 X 11,3 µm e apresentam, após esporulação, formato esférico a subesférico com dois esporocistos alongados com medidas de 7,0 – 8,0 µm x 3,0 µm sendo que cada esporocisto possui quatro

esporozoítas (LINDSAY; UPTON; DUBEY, 1999a). A diferenciação entre esses dois gêneros de coccídios pode ser feita por meio de ensaios biológicos em gerbilos ou camundongos com supressão do gene IFN-gama, nos quais *N. caninum* se desenvolve e *Hammondia heydorni* não. Também é possível a realização de cultura em células ou análises moleculares como a PCR, a qual diferencia os dois agentes, podendo posteriormente ser feito o seqüenciamento (DUBEY e LINDSAY, 2000; BASSO et al., 2001a; SCHARES et al., 2005).

O ciclo de vida é caracterizado por três estágios infecciosos: taquizoítos, cistos teciduais e oocistos. Taquizoítos e cistos teciduais são os estágios encontrados nos hospedeiros intermediários, sendo esses últimos observados primariamente no sistema nervoso central. Os taquizoítos são detectados em várias células como hepatócitos, células epiteliais renais, macrófagos, fibroblastos, células do endotélio vascular, miócitos e células nervosas (DUBEY et al., 1988a).

Sabendo-se que os cães estão envolvidos na epidemiologia do *N. caninum* e que, pela falta de informação sobre o comportamento deste agente, tanto na transmissão vertical quanto horizontal nos cães, mais estudos para uma melhor compreensão da infecção por *N. caninum* são imprescindíveis. Até o momento, há mais informações sobre a transmissão vertical em bovinos do que em cães, desconhecendo-se ainda se nos cães *N. caninum* atua de forma similar, isto é, se abortos ocorrem caso a cadela se infecte durante a gestação e se há uma fase da gestação de maior importância.

A neosporose experimental em vacas gestantes revela a importância da fase da gestação na transmissão da infecção e na produção de lesões no feto. A primoinfecção em fases precoces da gestação produz lesões inflamatórias intensas na placenta, morte e reabsorção fetal, enquanto que, em fases mais tardias da gestação, o feto é capaz de produzir uma resposta de defesa diminuindo o impacto da infecção (INNES et al., 2001). O grau de lesão no feto depende da quantidade de parasitas infectantes, podendo ocasionar abortamentos ou geração de bezerros congenitamente infectados, que podem se apresentar doentes ou aparentemente saudáveis (MACALDOWIE et al., 2004; MALEY et al., 2003).

Acredita-se que a variação de resposta à infecção ao longo da gestação esteja associada à modulação da resposta imune no período gestacional, gerando

condições favoráveis à transmissão placentária (INNES et al. 2001; QUINN; ELLIS; SMITH, 2002; INNES et al. 2005). Embora a transmissão vertical seja apontada como a principal via de transmissão do agente na ocorrência de casos endêmicos da infecção em bovinos, suspeita-se que a infecção horizontal, através da ingestão de oocistos esporulados contaminantes de água e alimento, esteja ligada aos surtos epidêmicos de abortamentos por *N. caninum* nessa espécie (McALLISTER et al., 1996; THURMOND et al., 1997).

Na Espanha, Almeria et al. (2010) sugeriram que a severidade das lesões placentárias e a forte resposta imune em alguns fetos bovinos, seja possivelmente uma forma de tentar controlar a alta parasitemia, podendo até resultar em morte fetal.

Num rebanho na Suécia, Björkman et al. (1996) traçaram a história familiar das vacas de leite e verificaram que todos os animais infectados eram da progênie de duas vacas que haviam sido compradas quando do estabelecimento do rebanho há 16 anos atrás.

A infecção crônica persistente pode ser passada para a progênie através da transmissão transplacentária endógena (ANDERSON et al., 1997). Após o nascimento, a ingestão de oocistos esporulados de *N. caninum* do meio ambiente é o único meio natural de infecção demonstrado (GONDIM et al., 2004a). Experimentalmente, bezerros neonatos se infectaram através da ingestão de leite e colostro contaminados com taquizoítos (DAVISON et al., 2001; MOSKWA et al., 2007).

A ausência de anticorpos anti-*N. caninum* não confirma a ausência de infecção, porque o feto pode ter sido infectado no fim da gestação, deixando tempo insuficiente para a síntese de anticorpos. Raramente é possível uma vaca soronegativa gerar um bezerro soropositivo (FRÖSSLING; UGGLA; BJÖRKMAN, 2005).

Apesar de vários tópicos relativos à epidemiologia da transmissão do *N. caninum* em vacas já terem sido estudados, como comentado anteriormente, poucas informações são conhecidas em cães.

Ainda pouco se sabe sobre a frequência da eliminação de oocistos pelos cães e a sobrevivência dos oocistos no meio ambiente, visto que são poucos os relatos de eliminação de oocistos por cães naturalmente infectados (BASSO et al., 2001a; SLAPETA et al., 2002; McGARRY et al., 2003; RODRIGUES et al., 2004; McINNES et al., 2006). Esta falta de informação se deve à dificuldade de se encontrar oocistos em fezes de cães sob condições naturais. (BASSO et al., 2001; McGARRY et al., 2003). Os fatores que afetam a eliminação de oocistos são difíceis de investigação, em virtude dos custos envolvidos em manter os cães em canis apropriados, pelo baixo número de oocistos eliminados e pelo fato da eliminação ser inconstante. Aparentemente, os cães eliminam mais oocistos após a ingestão de tecidos bovinos, do que quando são alimentados com tecidos murinos, e cães jovens eliminam mais oocistos do que adultos (GONDIM et al., 2002). Relatos sugerem que cães imunossuprimidos eliminam mais oocistos do que cães imunocompetentes (LINDSAY et al., 1999; LINDSAY et al., 2001).

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

A eliminação de oocistos de *N. caninum* por cães naturalmente infectados provavelmente seja baixa devido ao desenvolvimento de imunidade após infecção primária, prevenindo excreções repetidas (DIJKSTRA et al., 2001; GONDIM et al., 2005) e também pelo baixo número de oocistos excretados, tanto sob condições naturais quanto experimentais (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999a; BASSO et al., 2001; DIJKSTRA et al., 2001). McAllister et al. (1999) relataram que a quantidade de oocistos eliminados nas fezes pode ser afetada pelo número de cistos ingeridos, tipo e quantidade de alimento usado como inóculo. Desta forma, a ingestão de poucos cistos pode prevenir a infecção e influenciar na quantidade de oocistos eliminados.

O consumo de feto bovino por cães não parece ser uma importante fonte de infecção por *N. caninum* como verificado por Bergeron et al. (2001) e Dijkstra et al. (2002). No experimento de Bergeron et al. (2001), cães filhotes (2-4 meses de idade) foram alimentados com fetos naturalmente infectados por *N. caninum* e houve

ausência de eliminação de oocistos, de soro-conversão, de sinais clínicos e de lesões compatíveis com infecção por *N. caninum*. Dijkstra et al (2001) realizaram infecção experimental para determinar se colostro bovino ou placenta poderiam ser uma fonte de infecção de *N. caninum* em cães. Dois cães receberam colostro bovino derivado de cultura com taquizoítos de *N. caninum* e três foram alimentados com tecido cotiledonário da placenta de vacas soropositivas. Todos os cães alimentados com tecido cotiledonário eliminaram oocistos de *N. caninum*, porém, nenhum dos cães apresentou anticorpos anti-*N. caninum* no período de observação de 60 dias.

O consumo de membranas placentárias pode ser uma fonte de *N. caninum* para os cães, uma vez que o agente já foi encontrado em placenta de vacas que abortaram (MALEY et al., 2003; MACALDOWIE et al., 2004; GIBNEY et al., 2008) e que não abortaram (BERGERON et al., 2001). Já foi realizado o isolamento de *N. caninum* em cotilédones placentários de um bezerro clinicamente saudável, contudo com neosporose congênita (FIORETTI et al., 2000).

A participação dos cães como hospedeiros definitivos eficientes de *N. caninum* já foi questionada (LINDSAY et al., 2001). Em infecção experimental, a baixa produção de oocistos por cães alimentados com carcaças de camundongos infectados por *N. caninum* pode estar relacionada com a imaturidade, baixo número e atenuação dos bradizoítos pela passagem em um hospedeiro intermediário não comum, segundo Gondim et al. (2002).

O primeiro isolamento de *N. caninum* em fezes de um cão naturalmente infectado foi feito por Basso et al. (2001), num cão da raça rootweiler de 45 dias de idade na Argentina. Oocistos de *N. caninum* viáveis foram recuperados de gerbilos que haviam sido alimentados com esses oocistos, e homogenado de cérebro e coração de camundongos KO foram cultivados em cultura de células M617 com sucesso. Slapeta et al. (2002) encontraram um milhão de oocistos em fezes frescas de um pastor alemão da República Checa, com detecção da presença do *N. caninum* através da PCR e seqüenciamento .

No Reino Unido, McGarry et al. (2003) examinaram 15 amostras fecais de cães de dois canis, sendo dez de um canil com um total de 80 cães e cinco do outro com um total de 60 cães. Uma das amostras (do canil de 80 cães) foi identificada como *N. caninum* baseada na PCR e havia 378 oocistos por grama de fezes. Quatro

meses depois, uma segunda amostra fecal desse cão foi examinada e revelou a presença de oocistos confirmadas pela PCR como *N. caninum*. Após cinco meses da primeira coleta, mais uma amostra de fezes desse mesmo cão foi testada quanto à presença de *N. caninum*, desta vez oocistos não foram detectados.

Na Nova Zelândia, McInnes et al. (2006) detectaram DNA de *N. caninum* nas fezes de um cão da raça west highland white terrier de dois anos e meio após terem isolado *N. caninum* de uma lesão de pele da perna desse animal. O cão apresentou título inicial de 1: 400.000. O título obtido após seis e 14 meses foi de 1: 20.000 e 30 meses após o isolamento do *N. caninum*, o título aumentou para 1: 40.000.

Na Alemanha, Schares et al. (2005) examinaram 24.089 amostras fecais de cães e oocistos tipo *N. caninum* foram encontrados em 47. Vinte e oito dessas amostras foram testadas em bioensaio em gerbilos e cinco amostras foram identificadas positivamente quanto à presença de *N. caninum* através da realização do cultivo celular. O número de oocistos de *N. caninum* encontrados nas fezes variou de poucos a 114.000 por grama (em um cão de 13 anos de idade que tinha sido esplenectomizado). A verificação deste alto número de oocistos neste animal pode sugerir que a intensidade de eliminação possa ser influenciada por fatores imunológicos. Os soros dos cães testaram negativos quanto à presença de anticorpos anti-*N. caninum*. A sorologia foi realizada três a cinco semanas após o exame da amostra fecal. Alguns cães que eliminaram oocistos de *N. caninum* haviam ingerido tecidos bovinos, segundo relato dos proprietários. Porém, outros cães, que também eliminaram oocistos de *N. caninum*, não haviam consumido material potencialmente contaminado. Schares et al. (2005) sugeriram o hábito de coprofagia como uma fonte alternativa de contaminação. Relataram a dificuldade em resolver o enigma que envolve, de um lado, a infecção aguda por *N. caninum* de rebanhos bovinos pela presença de oocistos na água e silagem e, de outro, o insuficiente número de oocistos de *N. caninum* eliminados pelos cães para explicar tal contaminação no ambiente e infecção no rebanho.

No México, Cedillo et al. (2008), ao estudarem modelos para infecção experimental de cães alimentados com tecido fetal e neonatal de bovinos infectados naturalmente com *N. caninum*, constataram que nenhum dos cães jovens eliminou oocistos de *N. caninum* e, tampouco, soroconverteram após cinco meses da

infecção. Experimentalmente, cães tornam-se infectados por *N. caninum* e excretam oocistos após a ingestão de tecido nervoso (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999b; RODRIGUES et al., 2004) ou de uma mistura de tecidos bovinos infectados, tais como: cérebro, músculo esquelético, placenta e coluna vertebral (SCHARES et al., 2001; DIJKSTRA et al., 2001; GONDIM et al., 2002; GONDIM et al., 2004).

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

Em infecções experimentais com cistos teciduais, observou-se que a eliminação de oocistos pelos cães variou de cinco a 30 dias (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007). Já foram relatados casos de cães que reexcretaram um baixo número de oocistos dois meses após o desafio primário, pela ingestão de tecidos de bezerros infectados experimentalmente com *N. caninum*. Porém, essa excreção foi breve e em quantidade inferior a primo eliminação. Uma reexposição, depois de oito meses, mostrou que não houve excreção de oocistos, inferindo que a imunidade, no caso de exposição única ao agente, pode persistir por mais de oito meses. Diferentemente, dois dos três cães excretaram oocistos quando re-desafiados entre 18 e 20 meses após a primeira infecção. Um dos cães que reexcretou oocistos apresentou título de anticorpo de 1600 no segundo desafio, sugerindo que alto título de anticorpos não impede a produção de oocistos (GONDIM et al., 2005).

Não se sabe ao certo qual o tecido onde ocorre maior formação de cistos e qual o melhor tecido para a transmissão do parasita aos carnívoros (GONDIM; McALLISTER; GAO, 2005).

Na literatura são praticamente nulas publicações sobre a resistência do *N. caninum* às diversas condições ambientais e em relação à ação da temperatura e de desinfetantes sobre os oocistos. Recentemente, Alves Neto (2009) verificou que oocistos de *N. caninum* são inviabilizados sob tratamento com hipoclorito de sódio a 10% durante 1 hora à temperatura ambiente e tratamento físico com temperatura de

100 °C por 1 minuto. No mesmo estudo, vários outros desinfetantes e temperaturas foram avaliados e mostraram-se ineficazes.

Os cães também podem se infectar por via vertical, ou seja, pela transmissão transplacentária durante a gestação. Fêmeas com infecção sub-clínica podem transmitir o parasita aos seus fetos e sucessivas ninhadas, da mesma fêmea, podem nascer infectadas. Barber e Trees (1998) mostraram que a frequência de transmissão vertical em cães infectados naturalmente é variável, mas muito baixa, com aproximadamente 3% de filhotes infectados nascidos de cadelas soropositivas.

Na maior parte dos casos de neosporose neonatal em cães, sinais clínicos não são aparentes até cinco a sete semanas após o nascimento (DUBEY e LINDSAY, 1996). Essas informações sugerem que *N. caninum* é transmitido da mãe para os neonatos nos estágios finais da gestação ou através do leite. A transmissão transplacentária em cães experimentalmente infectados já foi demonstrada (DUBEY e LINDSAY, 1989; COLE et al., 1995; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Dubey e Lindsay (1989) infectaram uma fêmea beagle com $1,5 \times 10^6$ taquizoítos de *N. caninum* ao 35º dia gestacional. A cadela permaneceu clinicamente normal. Três dos oito filhotes nascidos não apresentaram alterações clínicas até o 49º dia pós-nascimento, porém anticorpos anti-*N. caninum* foram detectados ao exame sorológico. Houve tanto morte fetal e filhotes nascidos normais, quanto a presença de morte após dois dias do nascimento. Os cães apresentaram títulos a anticorpos anti-*N. caninum* que variaram de <50 a 800 sendo o maior título o da mãe aos 17 dias após o nascimento dos filhotes. *Neospora caninum* foi recuperado em cultura de células e detectado ao exame histopatológico em corte de coração do filhote que foi eutanaziado 20 dias após o nascimento. Neste estudo, segundo Dubey e Lindsay (1989) a não detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em um dos filhotes sugere que não houve transferência transplacentária de anticorpos anti-*N. caninum*, uma vez que esse filhote não ingeriu colostro materno. A cadela, ao parto, apresentou um título de 800, e, assim sendo, alguns anticorpos nos filhotes foram provavelmente adquiridos pelo colostro, como sugerem os autores. A ausência de anticorpos anti-*N. caninum* para a diluição 1:50 em um dos filhotes versus alto título da mãe sugere que os anticorpos adquiridos via colostrar decaíram para títulos mais baixos, quando da realização do teste, 17 dias pós nascimento.

É bem documentada a morte pós-natal no período de amamentação em filhotes congenitamente infectados. A morte uterina devido à neosporose em cão é rara e se *N. caninum* causa morte fetal, aborto, esterilidade em animais naturalmente infectados e, se há transmissão transmamária, ainda requer mais investigações.

Estudos em bezerros mostram que foram classificados como infectados se o soro pré-colostral ou soro obtido a partir da quinta semana pós nascimento tiver título ≥ 50 (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007), entretanto Cardoso et al. (2008) observaram, também em bezerros, que anticorpos colostrais podem ser detectados por período superior a cinco meses.

Barber e Trees (1998) realizaram um estudo soroepidemiológico de infecções por *N. caninum* em 373 raças de cães no Reino Unido. Cinquenta (13,4%) das 373 cadelas tiveram valores de títulos iguais ou superiores a 50 ao teste de imunofluorescência indireta. Inicialmente, aproximadamente 50% dos filhotes foram positivos e cerca de 25% dos filhotes nascidos de mães positivas desenvolveram doença semelhante à neosporose. Três cadelas produziram sucessivas ninhadas com filhotes infectados por *N. caninum*. Nas criações subseqüentes apenas três dos 118 filhotes de mães negativas foram positivos. Este estudo mostrou que a frequência da transmissão vertical de cães naturalmente infectados é variável, mas muito baixa para manter a infecção sozinha. Infecção pós-natal deve ocorrer para manter a infecção nas proporções de soroprevalência verificadas em populações de cães (BARBER et al., 1998).

Dubey e Lindsay (1989), numa fêmea da raça beagle infectada com taquizoítos de *N. caninum* na 5ª semana de gestação, verificaram 25% de óbito dos filhotes dois dias após o nascimento.

Cole et al. (1995) verificaram ocorrência de mumificação, maceração ou reabsorção fetal em cadelas infectadas com taquizoítos de *N. caninum* na 3ª semana de gestação.

É sabido que os cães podem se infectar através da ingestão de tecidos infectados, por carnivorismo. Recentemente, Bandini (2008) infectou experimentalmente quatro cães com oito semanas de vida com diferentes quantidades de oocistos esporulados de *N. caninum*, via oral. Nenhum cão eliminou

oocistos de *N. caninum* nas fezes, porém um mês após a infecção, dois cães que receberam as mais altas doses de oocistos (10.000) soroconverteram atingindo título de 800 e 1600.

Tem-se observado maior soroprevalência de *N. caninum* em cães procedentes de fazendas criadoras de bovinos, do que naqueles de áreas urbanas, sugerindo uma associação epidemiológica entre bovinos e cães (BASSO et al., 2001; PATITUCCI et al., 2001; FERNANDES et al., 2004; CUNHA et al., 2008). Cunha Filho et al. (2008), no Rio Grande do Sul, observaram valores de ocorrência 2,2 vezes maiores em cães de fazendas nas quais as carcaças de bovinos mortos e fetos abortados não eram adequadamente removidas do campo. Gennari et al. (2002) também encontraram prevalências maiores em cães errantes (25% de 611) do que em cães domiciliados (10% de 500). Fernandes et al. (2004) obtiveram maior soro prevalência de neosporose em cães de áreas periurbanas e rurais do que de áreas urbanas. Em algumas propriedades, a maior ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em vacas mais idosas em relação às mais jovens é um forte indicador de infecção pós-natal (GUIMARÃES et al., 2004), reforçando a importância do cão na epidemiologia do agente.

Cães com acesso às ruas ou contato com outras espécies de animais poderiam ser mais freqüentemente infectados com *N. caninum* (GENNARI et al., 2002; AZEVEDO et al., 2005; BENETTI et al., 2008). Além disso, já foram verificadas diferenças na soropositividade de cães que se alimentam de carne crua (29,5% de 71), quando comparados aos que não recebem esta dieta (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) e Bresciani et al. (2006) verificaram que a proporção de cães soropositivos alimentados com dieta caseira, 8,6% e 31,3%, foi maior do que a de cães alimentados com ração comercial, 0% e 7,9%, respectivamente.

Vários estudos demonstram que a soroprevalência de anticorpos anti-*N. caninum* aumenta com a idade, inferindo que a maioria dos cães infecta-se após o nascimento (GONDIM et al., 2005; PARADIES et al., 2007; VÁCLAVEK., 2007; COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2008; MORAES et al., 2008; CUNHA FILHO et al., 2008). Wouda et al. (1999) observaram uma leve diminuição da soroprevalência em

cães com idade superior a oito anos, sugerindo que anticorpos possam declinar com o tempo. Durante um estudo de quatro anos, Barber e Trees (1998) verificaram que em alguns cães, os anticorpos para *N. caninum* persistiram por todo o experimento, porém cães com baixos títulos soronegativaram em até dois anos. Exposição pós-natal ao *N. caninum* foi demonstrada na Argentina por Basso et al. (2001) com o encontro de anticorpos em maior proporção em animais mais velhos (47,7% de 222 cães com mais de um ano de idade e 12,7% de 86 cães com idade inferior a 12 meses). Resultado semelhante foi observado por Souza et al. (2002) em cães de fazendas leiteiras no Paraná, com soroprevalência mais baixa nos animais com menos de um ano de idade (9% de 33) do que em cães mais velhos (25,7% de 101).

Cañón-Franco et al. (2003) constataram tendência de uma maior soroprevalência em cães com mais de seis meses de idade (9,6 % de 136) do que em cães mais jovens (nenhum dos 21) na região amazônica brasileira. Em contraste, estudos realizados no Chile por Patitucci et al. (2001) e em Uberlândia, por Fernandes et al. (2004) não revelaram diferenças nos valores de prevalência com a variação da idade dos cães.

Diferenças na soroprevalência não vêm sendo associadas com raça ou sexo (BASSO et al., 2001; PATITUCCI et al., 2001; SOUZA et al., 2002; CAÑÓN-FRANCO et al., 2003) sugerindo que todas as raças e ambos os sexos podem ser igualmente infectados, entretanto casos clínicos têm sido mais descritos em cães das raças labrador retrievers, boxer, greyhound, golden retriever e basset hound (DUBEY, 2003).

Estudos demonstram que a presença de anticorpos anti-*N. caninum* é mais freqüente em cães soropositivos para *Leishmania* spp (TARANTINO et al., 2001; CRINGOLI et al., 2002; GENNARI et al., 2006; COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2008). Quatro casos de neosporose cutânea foram verificados, incluindo infecção mista com *Leishmania* sp em um cão (TARANTINO et al., 2001; PERLÉ et al., 2001; ORDEIX et al., 2002). Porém, outros estudos não observaram esta associação (ANDREOTTI et al., 2006; PARADIES et al., 2007).

Casos severos de neosporose podem ocorrer em filhotes jovens e congenitamente infectados. Estes desenvolvem paresia de membros posteriores que resulta numa paralisia progressiva. Sinais neurológicos são dependentes do local

parasitado. Os membros posteriores são mais severamente afetados do que os anteriores e geralmente estão em hiper-extensão rígida. Outras disfunções podem estar presentes como dificuldade para engolir, paralisia da mandíbula, flacidez muscular, atrofia muscular e até mesmo falência cardíaca. Cães com paralisia de membros podem estar alertas e sobreviver por meses (DUBEY, 2003).

A neosporose pode ser localizada ou generalizada e muitos órgãos podem estar envolvidos, incluindo a pele. Infecções clínicas foram relatadas por Dubey e Lindsay (1996, 2000), Boydell e Brogan (2000), Cantile e Arispici (2002) em cães.

O diagnóstico pelo exame das fezes nem sempre é simples; primeiro pelo fato dos cães eliminarem poucos oocistos e por um curto período de tempo e segundo pela semelhança destes com oocistos de *Hammondia heydorni*.

Para a detecção direta do agente em tecidos e nas fezes também pode ser utilizado o isolamento do parasita em cultivo celular. Para a realização desse procedimento o material deve chegar em condições adequadas de conservação. Algumas linhagens celulares vêm sendo utilizadas para esse fim, como células VERO, Monócito Bovino e CV-1, e o parasita tem um crescimento em tempo variado. Porém, o isolamento do *N. caninum* em cultivo de célula é limitado pela necessidade de material não contaminado com outros patógenos, e há indícios de que nem todos os isolados conseguem crescer em cultivo de célula (VIANNA et al., 2005).

Os dois tipos mais empregados de diagnóstico sorológico de *N. caninum* são a RIFI-reação de imunofluorescência indireta (DUBEY et al., 1996) e o ELISA (BASZLER et al., 1996; BJORKMAN; HOLMDAHL; UGGLA, 1997; JENKINS; WOUDA; DUBEY, 1997; PARÉ; HIETALA; THURMOND, 1995).

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

Através de métodos moleculares, como a PCR e a *nested* PCR, *N. caninum* pode ser distinguido de *H. heydorni* baseado em seqüências gênicas do ITS-1 e do 28S DNA ribossomal (ELLIS et al., 1999; MUGRIDGE et al., 1999; SCHARES et al., 2001). A técnica molecular da PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length*

Polymorphism) pode ser considerada uma ferramenta alternativa para o diagnóstico molecular na diferenciação de oocistos de *H. heydorni* e *N. caninum* (MONTEIRO et al., 2008).

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- 1) Avaliar a ocorrência da transmissão transplacentária de *N. caninum* em cadelas em diferentes fases da gestação;
- 2) Avaliar a infecção de cães jovens e adultos com diferentes tecidos de bovinos naturalmente infectados pelo *N. caninum*.

Para tanto, foram conduzidos dois experimentos distintos:

Experimento I: “Avaliação da transmissão transplacentária da infecção pelo *N. caninum* em cadelas em diferentes fases da gestação”

Experimento II: “Avaliação de diferentes tecidos como meio de transmissão de *N. caninum* e da idade dos cães na eliminação de oocistos de *N. caninum*”

Para melhor compreensão os experimentos serão apresentados separadamente.

3 EXPERIMENTO I

Experimento I: “Avaliação da transmissão transplacentária da infecção pelo *N. caninum* em cadelas em diferentes fases da gestação”.

3.1 Material e métodos

3.1.1 Delineamento experimental

Seis cadelas foram inoculadas com 10^8 taquizoítos de *N. caninum* (cepa Nc-1) por via sub-cutânea (sc) sendo três delas inoculadas na 3ª semana de gestação (GI), três na 6ª semana de gestação (GII) e uma cadela foi mantida como controle sem infecção (GIII), conforme Quadro 1.

Quadro 1- Delineamento experimental da infecção por *N. caninum* (10^8 taquizoítos via s.c) em cadelas em diferentes períodos da gestação.

Grupo	Nº de cadelas	Identificação da cadela	Infecção por <i>N. caninum</i>
I	3	3, 6, 7	3ª semana de gestação
II	3	2, 4, 5	6ª semana de gestação
III	1	1	Controle, sem infecção

3.1.2 Cães

Cadelas adultas, clinicamente sadias e sorologicamente negativas para anticorpos anti-*N. caninum*, *Toxoplasma gondii* e *Brucella abortus*, foram

selecionadas. Todas as cadelas foram previamente tratadas com anti-helmíntico oral de largo espectro de ação e receberam, antes do início do experimento, vacinas contra as principais doenças infecto-contagiosas que acometem os cães: leptospirose, hepatite, cinomose, parvovirose, corona vírus, adenovirus tipo 2 e parainfluenza (Duramune ® Max5CvK- Fort Dodge, Brasil).

Também foram selecionados dois machos, clinicamente sadios e negativos para anticorpos anti-*B. abortus*, os quais foram usados para a cobertura das fêmeas. Todas as fêmeas participantes do experimento passaram por uma avaliação ultrassonográfica pré-gestacional para avaliar as condições do útero, ovário, linfonodos regionais e confirmação da ausência de problemas reprodutivos. Nos machos, através do espermograma, avaliou-se motilidade e concentração espermáticas, integridade da membrana e acrossomas.

Tanto as fêmeas quanto os machos foram mantidos em baias individuais de concreto ao longo do experimento, exceto durante a época de acasalamento e receberam apenas ração comercial e água *ad libitum*.

A confirmação da prenhez foi realizada por exame ultrassonográfico ao redor do 21º dia após a cobertura. Posteriormente, para cada uma das fêmeas, mais duas ultrassonografias de acompanhamento gestacional foram realizadas, uma ao 50º dia e outra ao 55º dia de gestação.

No exame ultrassonográfico de acompanhamento gestacional foram determinados aspectos morfológicos do embrião (feto). Para tal, avaliou-se o desenvolvimento, através de medidas de comprimento do embrião, distância biparietal, espaço intercostal, diâmetro abdominal, diâmetro estomacal, diferenciação pulmonar e aspecto do fígado fetal. Para a avaliação da viabilidade fetal, foram considerados os seguintes aspectos: ecogenicidade, quantidade de líquidos fetais, aparência das membranas fetais, definição e pulsação em cordão umbilical, movimentos fetais, frequência do batimento cardíaco fetal, além de uma avaliação morfológica da placenta. Também foi possível, através do exame ultrassonográfico, avaliar o número de fetos. Essas avaliações foram realizadas no Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP.

Os filhotes nascidos foram clinicamente avaliados quanto à sua condição física e neurológica e sacrificados ao 35º dia pós-nascimento, para a pesquisa de *N. caninum* em amostras de Sistema Nervoso Central (SNC), linfonodos poplíteos,

musculatura esquelética (coxa), cérebro, pulmões, coração e fígado. Todas as amostras foram analisadas para pesquisa de DNA do parasita por *nested* PCR e PCR-RFLP, além de pesquisa do parasita e lesões por imunoistoquímica (IHQ) e histopatologia (HE). As fêmeas foram sacrificadas juntamente com a ninhada para a pesquisa de *N. caninum* nos mesmos tecidos e, quando possível, a placenta também foi coletada. Para o sacrifício, esses animais 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).

3.1.3 Coleta de soro e pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum*

Amostras de soro foram colhidas: a) quando da chegada dos animais ao canil; b) até três dias antes do início do experimento; c) até três dias antes da infecção com taquizoítos de *N. caninum* e, d) quando do sacrifício dos animais ou morte natural dos filhotes (nas ocasiões em que foi possível a colheita de material). As amostras de soro foram armazenadas a -20 °C até a determinação da presença de anticorpos anti-*N. caninum*.

Anticorpos anti-*N. caninum* foram detectados pela RIFI seguindo a metodologia descrita por Dubey et al. (1988b). O ponto de corte utilizado foi de 50. Os soros e os controles (positivo e negativo) foram diluídos em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) pH 7,2 estéril (0,0084M Na₂HPO₄, 0,0018M NaH₂PO₄, 0,147M NaCl) acrescentados de soro albumina bovina 1% (p/v) em placas de 96 poços na diluição inicial de 1:50. Estes soros foram então distribuídos em lâminas para RIFI contendo o antígeno 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 (IgG de coelho anti-IgG canino, SIGMA F-7884, USA) 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, USA), e foram consideradas positivas as amostras apresentando títulos ≥ 50 e fluorescência em toda a superfície do taquizoíto. A ausência de fluorescência ou presença de reação apical foi considerada negativa. As amostras positivas foram diluídas na base dois até a titulação final.

3.1.4 Extração de DNA de amostras de tecidos

Cada amostra de tecido foi homogeneizada com TE (Tris HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0) na proporção de 20 partes de tecido para 80 partes de TE (peso/volume), sendo realizada homogenização com o vórtex.

As amostras dos tecidos (cérebro, musculatura, pulmão, linfonodo, fígado e coração) tiveram o DNA extraído pelo protocolo descrito por SAMBROOK et al. (1989). O protocolo para extração de DNA é detalhado a seguir:

- Suspender o tecido em 500 μ L de tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA pH 8,0; 100 mM NaCl; 1% SDS).
- Adicionar 20 μ L de proteinase K (20mg/ml).
- Incubar em banho-seco a 56 °C por 2 horas ou à 37 °C overnight.
- Adicionar 500 μ L de fenol-clorofórmio (1:1) e homogeneizar.
- Centrifugar a 12.000 g por 10 minutos.
- Transferir a fase aquosa para outro tubo (aproximadamente 400 μ L).
- Adicionar o mesmo volume de isopropanol absoluto.
- Precipitar por 2 horas ou *overnight*.
- Centrifugar a 12.000 g por 30 minutos.

- Desprezar o sobrenadante por inversão de tubos.
- Ressuspender o sedimento em 1,0 ml de etanol 70% gelado.
- Centrifugar a 12.000 g por 10 minutos.
- Desprezar o sobrenadante por inversão de tubos.
- Deixar secar em temperatura ambiente.
- Ressuspender o sedimento em 30 µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) e homogeneizar.
- Incubar a 56 °C por 10 minutos.
- Centrifugar e armazenar a -20 °C.

3.1.5 PCR

As seqüências de DNA- alvo foram primeiramente amplificadas pela PCR com o uso de *primers* externos JS4 (SLAPETA et al., 2002) e CT2c (MURADIAN, 2009) seguido de *nested* PCR com *primers* internos CT2b (MONTEIRO et al., 2007) e JS4b (MURADIAN, 2009). Os *primers* senso empregados neste ensaio hibridizam contra a região 3' terminal do gene codificador do RNA da menor unidade ribossômica (18S), enquanto os *primers* anti-senso hibridizam contra a região 5' terminal do gene codificador da fração 5.8S do RNA ribossômico.

A *nested* PCR amplifica, portanto, a região completa referente ao espaçador interno transcrito 1 (internal transcribed spacer-1) de todos os organismos pertencentes à sub-família Toxoplasmatinae. Os diferentes organismos pertencentes à esta sub-família possuem seqüências de nucleotídeos diferentes na região codificadora do espaçador interno transcrito 1 (ITS-1), de forma que a análise deste locus permite distinguir estes organismos. A *nested* PCR empregada neste estudo foi nomeada PCR ITS-1. As seqüências dos *primers* utilizados encontram-se no Quadro 2, a seguir:

Quadro 2- Sequências dos *primers* usados nas reações de PCR e *nested* PCR ITS-1 para identificação de *N. caninum*.

Primers	Seqüência
JS4b	AGT CGT AAC AAG GTT TCC GTA GG
JS4	CGA AAT GGG AAG TTT TGT GAA C
CT2b	TTG CGC GAG CCA AGA CAT C
CT2c	CTG CAA TTC ACA TTG CGT TTC GC

A seguinte mistura de reagentes foi utilizada na PCR para uma reação de 50,0 µL (controle e amostras):

- 31,2 µL de água ultrapura autoclavada
- 5,0 µL de tampão de reação 10x (KCL 50mM: Tris-HCL 10 mM, pH 9,0, Invitrogen®, USA)
- 1,0 µL da mistura de dNTPs (10mM de cada nucleotídeo: dATP, dTTP, dCTP, dGTP, Invitrogen®, USA)
- 3,0 µL da solução de *primers* externos senso (10 µM)
- 3,0 µL da solução de *primers* externos anti-senso (10 µM)
- 1,5 µL de MgCl₂ (50mM)
- 0,3 µL de *Taq* DNA polimerase platinum Invitrogen® (5U/ µL)
- 5,0 µL da amostra de DNA

Para a *nested* PCR foram utilizadas as mesmas quantidades e reagentes substituindo-se somente os *primers* externos pelos internos e amostra de DNA pela mesma quantidade de produto amplificado na primeira reação de PCR.

O ciclo empregado na PCR foi:

1. Desnaturação Inicial	94°C por 3 minutos
2. Desnaturação	94°C por 45 segundos
3. Hibridização	56°C por 30 segundos
4. Extensão	72°C por 30 segundos
Ciclos (etapas 2 a 4)	35 ciclos

Os produtos originados pela *nested* PCR ITS-1 foram dispostos em um gel de agarose a 2% em cuba horizontal com solução tampão TBE pH 8,0 (Tris-borato 0,045 M: EDTA 0,001 M) juntamente com um marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases e, em seguida, submetidos à eletroforese. Foram analisadas alíquotas de 20 µL de cada amostra. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com banho de solução de brometo de etídeo (solução a 0,5 µg/mL) por 30 minutos e documentado sob transiluminação com luz ultravioleta para visualização das bandas.

As amostras que geraram bandas únicas foram diretamente submetidas à restrição enzimática. Nas amostras que geraram bandas múltiplas, a banda de interesse foi cortada diretamente do gel e purificada com o kit comercial illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, UK), seguindo as instruções do fabricante, porém, aumentando os tempos de centrifugações para um minuto. Os produtos purificados foram então submetidos à restrição enzimática. A cada corrida foi incluído um controle positivo de *N. caninum* e pelo menos dois controles negativos (água pura autoclavada).

3.1.6 Restrição enzimática

A fim de investigar o padrão de restrição enzimática dos produtos da *nested* PCR ITS-1 de cada amostra, 5 µL do produto da *nested* PCR ITS-1 foram misturados a 22,4 µL de reação de digestão contendo 2,0 µL tampão NEB 10 vezes concentrado (fornecido pelo fabricante), 0,2 µL de BSA 100 vezes concentrada (fornecido pelo fabricante), 0,2 µL da enzima de restrição e 20 µL de água DEPC.

As enzimas de restrição utilizadas foram RsaI e TaqI (Fabricante: Fermentas). Essas enzimas foram escolhidas com o auxílio do software BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9.0 Copyright 1997-2007 Tom Hall (HALL, 1999) de acordo com os sítios de clivagem das mesmas nas seqüências de *T. gondii*, *N. caninum*, *H. hammondi* e *H. heydorni* (todas obtidas com os *primers* JS4b e CT2b). A enzima RsaI cliva seqüência de *N. caninum* em dois sítios de restrição, sendo produzidas três bandas de 129, 132 e 239 pares de bases (pb), mas não cliva seqüência de *T. gondii*, *H. hammondi* e *H. heydorni*. Já a enzima TaqI não cliva seqüência de *N. caninum*, mas cliva a seqüência de *T. gondii* em dois sítios de restrição produzindo três fragmentos de 75, 152 e 245 pb. A TaqI também cliva seqüências de *H. hammondi* e *H. heydorni*, mas produzindo diferentes fragmentos em quantidade e tamanho: dois fragmentos de 225 e 248 pb para *H. hammondi* e quatro fragmentos 56, 96, 156 e 174 pb para *H. heydorni*. A cada corrida foi incluído um controle positivo de *N. caninum* e pelo menos dois controles negativos (água pura autoclavada). Os produtos da *nested* PCR ITS-1 foram diferenciados pelas enzimas de restrição RsaI e TaqI, conforme ilustrado no Quadro 3.

Quadro 3 - Representação esquemática da atividade das enzimas de restrição RsaI e TaqI para diferenciar os produtos das reações da *nested* PCR ITS-1.

Enzima	Tgo	Hhe	Hha	Nca
RsaI	472	479	473	239 132 129
	245	174	•	

TaqI	152	156	248	500
	75	96	225	
		53		

As amostras foram incubadas na temperatura indicada pelo fabricante como ideal para cada enzima.

Após a incubação, as amostras foram submetidas à análise em gel de agarose a 2,0%, contendo 0,5 µg de brometo de etídeo, em cuba horizontal com solução tampão TBE, pH 8,0, e visualizadas sob luz ultravioleta, utilizando-se um analisador de imagem ULTRA LUM (Ultra Lum Inc., Claremont, CA, USA).

Foram consideradas como positivas as amostras clivadas que produziram bandas compatíveis ao esperado para o agente *N. caninum*.

A Figura 1 ilustra como foi realizada a identificação das amostras de tecidos pela PCR-RFLP das amostras de tecidos, mostrando os padrões eletroforéticos dos fragmentos gerados pela PCR-ITS1 após a restrição enzimática, ou seja, após clivagem com as enzimas RsaI e TaqI.

Figura 1- Resultado da *Hemi-nested* PCR(*hn* PCR-Nc5) direcionada ao gene Nc5 para detecção de *N. caninum* em oocistos eliminados por cães experimentalmente infectados com diferentes tecidos bovinos. Gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídio.

3.1.7 Imunoistoquímica e histopatologia

Fragmentos de tecidos (cérebro, linfonodos, musculatura esquelética, pulmões, coração e fígado), quando possível de serem coletados, foram preservados em solução de formol a 10% e preparados para exames histopatológicos e IHQ (BUXTON et al., 1997). Os filhotes que vieram a óbito após o nascimento, antes da data prevista para a necrópsia, também tiveram fragmentos preservados e preparados para exames histopatológicos e IHQ. Parte dos tecidos foi preservada em freezer a -20 °C para a PCR- RFLP.

Quando da eutanásia ou morte dos animais, fragmentos de tecidos (cérebro, linfonodos, musculatura esquelética da coxa, pulmões, coração e fígado), foram

coletados e preservados em solução de formol a 10% e enviados ao Departamento de Patologia da FMVZ-USP para exames histopatológicos (coloração pela hematoxilina e eosina- HE) e IHQ (BUXTON et al., 1997).

Para a técnica de IHQ foi seguido o protocolo modificado de Pescador (2005). Os tecidos emblocados em parafina foram cortados em micrótomo com espessura de 5 μ m e fixados em lâminas de vidro, previamente tratadas com APTS (3,3-aminopropyltriethoxysilane- SIGMA catálogo, USA). As lâminas foram colocadas em estufa por 1 hora em temperatura entre 55 e 60 °C. Subseqüentemente, os cortes foram diafanizados em dois banhos de xilol de 10 e 5 minutos cada, posteriormente hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico, passando uma vez em álcool absoluto (1 minuto), uma vez em álcool 96% (1 minuto), uma vez em álcool 80% (1 minuto) e uma vez em álcool 70% (1 minuto).

Realizou-se recuperação antigênica por meio da irradiação em forno microondas de uso doméstico (800 watts) por 9 minutos. Durante essa etapa, as lâminas ficaram submersas em 100 mL de tampão citrato pH 6.0 e logo após o esfriamento do material por 20 minutos foi realizada uma lavagem de 5 minutos em água corrente.

O bloqueio da peroxidase endógena foi feito por incubação do material em solução a 3% de peróxido de hidrogênio 30 vol., álcool metílico e PBS, durante 20 minutos, em temperatura ambiente (18 a 22 °C). Posteriormente, a lâmina foi lavada em água corrente por 1 minuto.

Para redução da inespecificidade da reação foi colocada nas lâminas uma solução de leite em pó desnatado a 10% em água destilada por 20 minutos. Após esta etapa foi utilizado o anticorpo primário anti-*Neospora caninum* (VRMD, USA) diluído a 1:1000 e incubado por 2 horas em câmara úmida à temperatura ambiente. Na seqüência realizaram-se três lavagens com PBS (5 minutos cada) e as lâminas foram incubadas por 30 minutos com anticorpo secundário biotilado a uma diluição de 1:200 (VECTOR-PK-6101-VECTASTAIN® Elite ABC Kit - *Rabbit IgG*, USA), em câmara úmida à temperatura ambiente, com mais três lavagens de 5 minutos cada, em PBS.

Em seguida os cortes foram incubados por 30 minutos em câmara úmida com o complexo estreptavidina-biotina a uma diluição de 1:200 (VECTOR, Burlingame, USA) finalizando-se o processo com mais três lavagens de 5 minutos cada em PBS.

Para a visualização e revelação da reação utilizou-se o cromógeno DAB (Data Sheet – Liquid DAB Substrate Pack, Concentrated – BIOGENEX, USA) por 5 minutos, observando a coloração conforme a instrução do fabricante. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e prosseguiu-se com a contracoloração em hematoxilina por 2 minutos, lavagem em água corrente e desidratação. Esta última etapa consistiu em uma passagem em álcool etílico 70% (5 minutos), álcool etílico 96% (5 minutos), álcool etílico absoluto I e II (5 minutos cada), xilol + álcool (10 minutos), xilol I e II (10 minutos cada). As lâminas foram cobertas com resina sintética (ENTELLAN – MERCK, USA) e lamínulas histológicas.

3.2 Resultados

Não se registrou em nenhuma avaliação ultrassonográfica, realizada durante o acompanhamento gestacional, desvio significativo dos valores normais. Porém, verificou-se a ocorrência de óbito de alguns filhotes em até 10 dias após o nascimento. O número de cães nascidos saudáveis e aqueles com morte peri-natal (em até 10 dias após o nascimento) das cadelas do experimento, estão apresentados na Tabela 1

Tabela 1- Observações reprodutivas das gestantes, controle e infectadas com 10^8 taquizoítos de *N. caninum* (sc), na 3^a e 6^a semana de gestação.

N° da Cadeira	Grupo	Semana de infecção	Total de fetos	Total de morte peri-natal	Gestantes* (RIFI ≥ 50)
3	I	3°	5	3	sim
6	I	3°	2	1	sim
7	I	3°	3	2	sim
2	II	6°	5	3	sim
4	II	6°	6	4	sim
5	II	6°	2	0	sim
1	III	controle	2	0	Não
TOTAL			25	13	

*Soro conversão

Todas as cadelas infectadas (GI e GII) apresentaram soroconversão a anticorpos anti-*N. caninum* pela RIFI (≥ 50). Nem todos os filhotes que vieram a óbito foram avaliados sorologicamente, pois não foi possível a coleta de sangue em alguns casos, devido ao intervalo entre a morte do animal e o encontro do feto. Alguns filhotes não foram avaliados por não terem sido encontrados, tendo-se concluído que as mães os ingeriram, fato comum em cadelas e filhotes fracos ou natimortos.

Os títulos de anticorpos anti-*N. caninum* das cadelas infectadas e na controle, sem infecção, e de suas respectivas crias estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Título de anticorpos anti-*N. caninum* em cadelas infectadas na 3ª semana de gestação (GI), na 6ª semana de gestação (GII) e controle sem infecção (GIII) e de suas respectivas crias pela RIFI no 35º dia pós-parto.

Grupo	Cadela No.	TÍTULO NA RIFI					
		Cadelas	Filhotes				
			1	2	3	4	5
I	3	3200	3200	1600	*	*	*
I	6	12800	800	*			
I	7	6400	800	*	*		
II	2	12800	12800	400	3200	800	*
II	4	6400	N	*	6400	12800	*
II	5	12800	400	N			
III	1	N	N	N			

* não foi possível obter o soro

N: negativo

Tanto as fêmeas infectadas na 3ª semana quanto as infectadas na 6ª semana de gestação apresentaram soroconversão a anticorpos anti-*N. caninum* pela RIFI. O menor título (3200) foi encontrado na cadela 3, infectada na 3ª semana de gestação, e o maior título (12800) foi verificado tanto em cadelas infectadas do GI (6) quanto do GII (2 e 5).

Em relação aos títulos de anticorpos observados nos filhotes das cadelas infectadas, os títulos variaram de 400 a 12800. Dos 13 filhotes das mães infectadas, das quais foi possível a obtenção de soro, apenas dois não apresentaram títulos de anticorpos contra o parasita. Entretanto, tanto a mãe como irmãos destes cães soronegativos foram positivos pela RIFI.

A cadela controle (1) bem como seus filhotes permaneceram negativos quanto à presença de anticorpos anti-*N. caninum* durante todo o período experimental.

Durante a gestação as fêmeas e seus filhotes mostraram-se saudáveis. Após o nascimento, nenhum deles apresentou sintomas neurológicos, nem suas mães.

Nas fêmeas infectadas na 3ª semana, de um total de 10 filhotes, seis (60%) resultaram em óbito em até 48 horas após o nascimento. Em relação às fêmeas infectadas na 6ª semana de gestação, de um total de 13 filhotes, sete (54%) vieram a óbito entre cinco e sete dias após o nascimento. Nenhum dos dois filhotes da fêmea controle veio a óbito.

Através da análise histopatológica (HE) e IHQ do material das necrópsias dos filhotes e das respectivas mães, observou-se presença de cisto de *N. caninum* no cérebro do filhote 1 da cadela 3 (GI) pela HE, sacrificado no 35º dia pós nascimento. Pela IHQ alterações não foram encontradas em nenhum cão.

Através da *nested* PCR ITS-1 e PCR-RFLP com as enzimas RsaI e TaqI, confirmou-se a presença de DNA de *N. caninum* em amostras de tecidos de linfonodo, cérebro, coração e fígado dos filhotes. Nos tecidos de nenhuma das mães a *nested* PCR ITS-1 detectou o agente. O filhote 1 da mãe 2 (GII) apresentou DNA de *N. caninum* em amostras de linfonodo e cérebro. No filhote 1, da mãe 3 (GI), verificou-se a presença do parasito no coração e no fígado. No filhote 1 da mãe 6 (GI), DNA de *N. caninum* foi encontrado em tecido de coração. A Tabela 3 apresenta o resultado da *nested* PCR ITS-1 e da coloração pela HE das crias das cadelas infectadas nas quais resultados positivos foram encontrados.

Tabela 3- Relação dos filhotes das cadelas infectadas durante a 3ª (GI) e a 6ª (GII) semana de gestação com *N. caninum*, nos quais se encontraram, em diferentes tecidos, DNA de *N. caninum* pela *nested* PCR ITS-1 e alterações pela hematoxilina-eosina (HE).

Grupo	Tecidos	Identificação dos animais positivos filhote (mãe)	
		<i>nested</i> PCR- RFLP	HE
I; II	cérebro	F1 (2)	F1 (3)
II	linfonodo	F1 (2)	N
I	coração	F1 (3); F1 (6)	N
I	fígado	F1 (3)	N

3.3 Discussão

São poucos os relatos de literatura acerca do perfil sorológico de cadelas gestantes infectadas experimentalmente por *N. caninum* e de suas crias. Até o momento, pouco se sabe, se nos cães, *N. caninum* atua de maneira semelhante ao observado em bovinos, isto é, se abortos ocorrem quando a cadela se infecta durante a gestação e se há uma fase de maior importância.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a transmissão transplacentária da infecção pelo *N. caninum* na 3ª e 6ª semana de gestação (1º e 2º termo) em cadelas, bem como a ocorrência de problemas reprodutivos.

Durante todo o período gestacional, as mães e seus filhotes apresentaram-se dentro dos valores considerados normais ao exame ultrassonográfico.

Do total de 23 fetos viáveis ao ultrassom, filhos de fêmeas infectadas com *N. caninum* 13 (56%) vieram a óbito em até 10 dias após o nascimento. Dos 10 filhotes, viáveis ao ultrassom de mães infectadas na 3ª semana de gestação (GI), seis (60%) apresentaram morte perinatal em até 48 horas após o nascimento. Nas mães infectadas na 6ª semana de gestação (GII), de um total de 13 filhotes viáveis ao ultrassom, 7 (53%) apresentaram morte perinatal entre 5 e 7 dias após o nascimento. Dubey e Lindsay (1989), ao infectarem uma cadela da raça beagle com $1,5 \times 10^6$ taquizoítos de *N. caninum* na 5ª semana de gestação (sc), verificaram óbito em dois filhotes (25%) dois dias após o nascimento.

Acredita-se que a utilização da técnica de Doppler em complementação à técnica de ultrassom na avaliação gestacional da mãe e dos filhotes, permita detectar desvios dos parâmetros fetais e maternos com maior precisão. O uso da técnica de Doppler é recente na área veterinária e permite a avaliação da pulsação do cordão-umbilical, irrigação da placenta, morfologia placentária, índices vasculares da artéria aorta abdominal do feto e avaliação da região hepática fetal, permitindo um exame de maior precisão de viabilidade fetal. Entretanto, neste estudo, a viabilidade fetal baseou-se em exames de ultrassom.

Dois filhotes da mãe 3 (GI) e um da mãe 7 (GI), observados no ultrassom, não foram avaliados por não terem sido encontrados, tendo-se concluído que as cadelas os ingeriram, ocorrência comum, em cadelas e filhotes fracos ou natimortos.

Após o nascimento, nenhum filhote viável apresentou sintomas neurológicos, bem como suas mães. Tal ocorrência está de acordo com dados da literatura, uma vez que sinais clínicos causados pela neosporose estão raramente presentes antes de cinco a sete semanas de vida (DUBEY, 1992; DUBEY; LINDSAY, 1996, DUBEY et al, 2007). Num estudo realizado por Cole et al. (1995), uma fêmea inoculada com taquizoítos de *N. caninum* na 3ª semana de gestação gerou dois filhotes que apresentaram déficit proprioceptivo, aumento do tônus muscular e espasticidade em ambos membros pélvicos antes da 4ª semana após o nascimento. Nesse mesmo estudo, uma das fêmeas inoculadas veio a óbito, fato não observado na presente investigação.

Neste estudo, os filhotes, que permaneceram vivos até o final do período de observações, não apresentaram problemas de sucção do leite materno. Dubey e Lindsay (1989) observaram esta deficiência em 37,6% (3/8) dos filhotes nascidos de uma fêmea infectada, ou seja, dificuldade quanto à ingestão de leite materno.

No presente estudo, nenhuma das cadelas infectadas apresentaram mumificação, maceração ou reabsorção fetal, discordando de Cole et al. (1995), que verificaram tal ocorrência em 83,5% (5/6) das cadelas infectadas com 5×10^6 taquizoítos de *N. caninum* na 3ª semana de gestação. Os autores também observaram o nascimento de filhotes viáveis em apenas duas cadelas de um total de seis.

Todas as cadelas do presente experimento deram à luz a pelo menos um filhote vivo, em discordância do trabalho de Cole et al. (1995). É importante ressaltar que a cepa de *N. caninum* utilizada na infecção de cadelas gestantes dos estudos de Dubey e Lindsay (1989) e de Cole et al. (1995) foi a Nc-1, sendo a mesma utilizada neste presente estudo, entretanto as doses foram $1,5 \times 10^6$ e 5×10^6 taquizoítos (sc), respectivamente.

O papel do *N. caninum* causando aborto, natimortalidade, reabsorção ou desenvolvimento de piometra em cão ainda é pouco conhecido (BARBER e TREES, 1989). Em 1997, Barber e Trees estimaram que as perdas de filhotes no parto, filhos de mães infectadas, seriam de 15 a 30% durante o parto, entretanto, trabalhos com infecção experimental têm observado valores de 4,6 a 83% (DUBEY e LINDSAY 1989, 1990; COLE et al, 1995; BARBER e TREES, 1997) e no presente estudo a ocorrência de morte perinatal variou de 53 a 60%, entretanto estes valores

altos só foram observados com infecção experimental com inoculação de taquizoítos..

Todas as cadelas infectadas e pelo menos um de seus filhotes apresentaram soroconversão a anticorpos anti-*N. caninum* pela RIFI (≥ 50), confirmando a ocorrência da infecção, em concordância com o verificado por outros autores (DUBEY e LINDSAY, 1989; COLE et al., 1995).

Neste estudo, o menor título de anticorpos anti-*N. caninum* (3200) foi encontrado em uma cadela infectada na 3ª semana de gestação e o maior título (12800) foi verificado em cadela infectada tanto na 3ª quanto na 6ª semana de gestação. O título obtido por Dubey e Lindsay (1989) numa cadela infectada na 5ª semana de gestação foi inferior (800) ao encontrado neste presente experimento, entretanto o volume do inóculo ($1,5 \times 10^6$ taquizoítos) também foi inferior ao utilizados no presente estudo.

Nos filhotes das fêmeas deste estudo, os títulos variaram de 400 a 12800. Dos 13 filhotes das mães infectadas, das quais foi possível a obtenção de soro para a pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum*, apenas dois (15,4%) não apresentaram títulos de anticorpos, porém tanto as mães como os irmãos desses filhotes foram positivos pela RIFI. O número de filhotes soropositivos deste estudo foi superior ao encontrado por Barber e Trees (1998) em filhotes de mães naturalmente infectadas, das quais 20% (36/179) dos filhotes foram soropositivos (RIFI ≥ 50).

No presente estudo não foi possível a coleta de sangue dos filhotes antes da ingestão do colostro, sendo assim, não há como afirmar se os anticorpos observados eram próprios ou colostrais. Entretanto, em alguns desses filhotes soropositivos, o agente foi encontrado por outras técnicas de diagnóstico, confirmando a infecção transplacentária e, em nenhum dos cães negativos, foi possível a detecção do *N. caninum* por métodos moleculares ou histopatológicos.

A variação de título de anticorpos nos filhotes do presente estudo foi similar àquela verificada por Barber e Trees (1998), que observaram valores de títulos variando de 50 a 12800 e superiores aos encontrados por Dubey e Lindsay (1989) em filhotes de cadelas infectadas na 5ª semana de gestação.

Apesar de as mães terem se apresentado positivas na sorologia, não houve detecção do agente em nenhum tecido destas fêmeas pela PCR, HE e IHQ, em conformidade com o verificado por Dubey e Lindsay (1989). Cole et al (1995)

detectaram pela coloração por HE, presença de taquizoítos de *N. caninum* em cortes histológicos de cérebro, musculatura, pulmão, fígado, pâncreas, rim, adrenal, linfonodo mediastino e corpo lúteo numa cadela infectada com taquizoítos de *N. caninum* na 3ª semana de gestação e que veio a óbito no 54º dia gestacional.

A única maneira de precisar infecção pré-natal, transplacentária em filhotes vivos, supostamente infectados por *N. caninum*, é através da análise do soro pré-colostroal. Uma vez que a presença no momento do parto é difícil, muitos estudos utilizam a análise de anticorpos pós-natal. Há muitos fatores para considerar, como a especificidade e sensibilidade do teste, o efeito do anticorpo materno passivamente transferido pelo colostro, a possibilidade de tolerância, a duração da infecção e títulos de anticorpos e a possibilidade de infecção pós-natal. Assim sendo, o encontro de anticorpos em animais bastante jovens, quando estes ingeriram colostro, nem sempre indica infecção.

Em relação à RIFI, estudos em larga escala não têm sido realizados para estabelecerem um ponto de corte, e resultados de testes em cães experimentalmente infectados têm mostrado que títulos pré-infecção são sempre < 50 e pós-infecção excedem esse valor. Anticorpos para *N. caninum* maternos transferidos passivamente tendem a cair para títulos < 50 em cães, até 17 dias após o nascimento (BARBER e TREES, 1997).

O encontro de anticorpos séricos pela RIFI e de DNA pela *nested* PCR ITS-1 e técnica de PCR-RFLP dos tecidos de coração, fígado, cérebro e linfonodo confirmou a viabilidade e a quantidade de taquizoítos de *N. caninum* (10^8) usada na inoculação das fêmeas gestantes, tanto na 3ª quanto na 6ª semana de gestação. A *nested* PCR ITS-1 e PCR-RFLP mostraram-se úteis com resultados iguais, sendo ambas as técnicas mais sensíveis que os outros métodos utilizados (IHQ e HE).

Neste estudo, pela coloração da HE, foi verificada a presença de cisto de *N. caninum* em cérebro de apenas um filhote, cuja mãe havia sido infectada na 3ª semana de gestação. Dubey e Lindsay (1989) verificaram a presença de *N. caninum* em secções histológicas, não de cérebro, mas de coração, em um filhote cuja mãe havia sido experimentalmente infectada. Dubey e Lindsay (1990) verificaram a presença de taquizoítos de *N. caninum* em tecido de coração e fígado corados pela HE em filhotes imunossuprimidos. Cole et al (1995) e Dubey et al (1988) detectaram taquizoítos em placenta e coração de filhotes, respectivamente.

Apesar de não ter sido encontrada a presença de *N. caninum* em tecido de coração e fígado pela HE e IHQ nos filhotes deste presente estudo, este parasito foi detectado nesses órgãos pela *nested* PCR ITS-1 e técnica de PCR-RFLP. *N. caninum* estava presente em tecido de coração de dois filhotes, F1(3) e F1(6) de diferentes mães infectadas na 3ª semana de gestação e também no fígado do filhote F1(3) de mãe infectada na 3ª semana de gestação.

A presença do agente também foi verificada pela *nested* PCR ITS-1 e PCR-RFLP em tecido de cérebro e linfonodo, num único filhote F1(2), cuja mãe foi infectada na 6ª semana de gestação. Estudos mostram que os linfonodos não são freqüentemente infectados na neosporose (FRENKEL., 1973; BARBER et al., 1996), entretanto estes estavam positivos no presente estudo.

Uma explicação para o encontro de pouco cisto tecidual pode ser a quantidade de tecido examinada. Dubey (1988) infere que deva existir um cisto de *T. gondii* por 50g de tecido em grandes animais, porém para *N. caninum* esse dado ainda não foi determinado, podendo até ser menor, uma vez que cistos desse agente são pouco observados em órgãos que não o sistema nervoso central. Outro fato é em relação à cepa; sabe-se que com *T. gondii* a cepa pode levar a uma menor ou maior formação de cistos, e esse fato provavelmente possa ocorrer com *N. caninum*.

Não há lesões patognomônicas de neosporose. Embora o diagnóstico possa ser realizado através do exame de secções de cortes histológicos corados com HE, a IHQ é necessária devido ao baixo número de parasitos presentes nos tecidos e muitas vezes não visíveis no HE. Dificilmente há parasitos de *N. caninum* em número suficiente por corte histológico, sendo assim, a sensibilidade da técnica para detectar o parasito em tecidos é baixa (DUBEY, 1999). Cérebro, coração, fígado, placenta e sangue são os melhores tecidos para a detecção de *N. caninum* e a chance aumenta quando vários tecidos são examinados em conjunto (DUBEY, 2003).

Em resumo, no presente estudo não se observou diferença entre o número de natimortos das mães infectadas com *N. caninum* na 3ª ou na 6ª semana de gestação, bem como o agente foi detectado em dois filhotes de mães do GI e em um filhote de mãe do GII. Lesões histopatológicas (HE) somente foram observadas em um filhote de mãe do GI. A sorologia (RIFI ≥ 50) apresentou títulos mais altos nos cães filhos de mães do GII, provavelmente por terem sido desafiados mais

tardiamente. A infecção transplacentária ocorre em cadelas prenhes e a fase da gestação parece ter pouca importância.

4 EXPERIMENTO II

Experimento II: “Avaliação de diferentes tecidos como meio de transmissão de *N. caninum* e da idade dos cães na eliminação de oocistos de *N. caninum*”

4.1 Material e métodos

O experimento II constou de dois estudos semelhantes, sendo somente a idade e o número de cães examinados a variável entre o 1º e o 2º estudo. No primeiro a idade dos cães foi de aproximadamente 60 dias e no segundo estudo de um ano.

4.1.1 Delineamento experimental

Foram selecionados 20 cães jovens com idades aproximadas de 60 dias para o estudo 1. Para o estudo 2, 13 cães jovens foram criados desde o nascimento, no canil do VPS, FMVZ, USP, no campus administrativo da USP em Pirassununga e o experimento teve início quando estes completaram um ano de idade. Isto foi realizado para se certificar do estado livre de infecção por *N. caninum* desses animais, quando do início do estudo.

Todos os cães, de ambos estudos, apresentavam-se clinicamente sadios, sorologicamente negativos para anticorpos anti-*N. caninum* e negativos para oocistos similares aos de *N. caninum* ao exame coproparasitológico. Antes do início dos estudos, os cães foram previamente tratados com anti-helmíntico oral de largo espectro de ação e receberam vacinas contra as principais doenças infecto-contagiosas que acometem os cães: leptospirose, hepatite, cinomose, parvovirose, corona vírus, adenovirus tipo 2 e parainfluenza (Duramune® Max5CvK- Fort Dodge, Brasil).

Os cães dos diferentes grupos receberam tecidos de bovinos naturalmente infectados por *N. caninum*. A partir do 5º dia, após a administração dos tecidos, o total de fezes eliminado diariamente, por cada um dos cães, foi examinado para a pesquisa de oocistos tipo *Neospora-Hammondia*. Os oocistos encontrados tiveram a confirmação do gênero por métodos moleculares e os cães foram acompanhados por 30 dias.

O quadro 4 ilustra o delineamento experimental dos estudos 1 e 2.

Quadro 4- Número de cães alimentados com diferentes órgãos de bovinos naturalmente infectados com *N. caninum* e número de cães controle, não infectados, nos estudos 1 e 2.

Estudo	Idade dos cães	Masseter	Cérebro	Coração	Fígado	Controle
1	60 dias	5	4	5	3	3
2	12 meses	3	3	3	3	1

Cada cão jovem ingeriu aproximadamente 400g de coração, 300g de cérebro, 350g de masseter e 300 g de fígado. Os cães adultos ingeriram cerca de 800g de coração, 400g de cérebro, 700g de fígado e 800g de masseter cada.

4.1.2 Bovinos doadores

Como doadores para a infecção dos cães foram utilizados bovinos naturalmente infectados por *N. caninum* com títulos de anticorpos pela RiFI ≥ 400 . Esses animais foram obtidos no Estado de São Paulo, de frigoríficos dos municípios de Taquaritinga, Sertãozinho e Pirassununga.

Após a necrópsia, os diferentes tecidos foram removidos e mantidos refrigerados, e estes foram oferecidos aos cães no dia do abate ou no dia seguinte ao abate. Os cães receberam os diferentes tecidos duas vezes ao dia e por no máximo dois dias. Os tecidos dos bovinos doadores, oferecidos aos cães do presente experimento, foram submetidos ao estudo molecular (conforme descrito no Experimento I) para a verificação quanto à presença do *N. caninum*.

4.1.3 Exame coproparasitológico

Diariamente foram recolhidas as fezes totais dos cães experimentais e avaliou-se a quantidade de oocistos eliminados. O material fecal total eliminado a cada 24 horas foi homogeneizado e oocistos tipo *Neospora-Hammondia* foram pesquisados

em aliquotas de 1 grama por meio da técnica de centrífugo-flutuação em solução de sacarose (OGASSAWARA e BENASSI, 1980).

Os oocistos encontrados foram devidamente coletados e armazenados em tubos cônicos de plásticos, estéreis para a realização da contagem parcial (para cada dia de eliminação) e total de oocistos eliminados conforme Gondim et al (2005). Estes oocistos foram posteriormente diagnosticados por métodos moleculares para diferenciação entre *N. caninum* e *H. heydorni*.

Para a contagem de oocistos separou-se 1 grama (em triplicata) de cada amostra positiva a oocistos do tipo *Neospora-Hammondia*. A amostra foi então homogeneizada em 50 mL de água destilada e depois coada duas vezes com gaze. Posteriormente, realizou-se centrifugação em tubos cônicos de 50 mL a 2500rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi então descartado e adicionaram-se 12 mL de solução de sacarose e a amostra foi passada para tubo de 15 mL e centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos. A leitura direta da amostra foi realizada em microscópio óptico composto, com aumento de 100 vezes. A leitura finalizou quando da ausência de oocistos após duas leituras consecutivas. O valor obtido foi então multiplicado pelo peso total das fezes eliminadas pelo cão em 24 horas do dia em questão, obtendo-se o número total de oocistos eliminados por cada cão e por cada dia do experimento.

4.1.4 Colheita de sangue

Foi realizada colheita de sangue dos cães no dia 0, 15 e 30 do experimento para pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* pela RIFI, conforme descrito no item 3.3 do Experimento I.

4.1.5 Diagnóstico molecular

As amostras positivas para oocistos tipo *N. caninum* foram submetidas à centrifugação para concentração de oocistos e o sedimento final foi submetido à extração do DNA, seguido de PCR e seqüenciamento para confirmação da presença do agente. Os oocistos foram lavados em solução salina tamponada estéril e submetidos ao processo de extração de DNA. A reação de PCR foi realizada

utilizando *primers* específicos conforme descrito em Holmdahl e Mattsson (1996). O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose e corado em brometo de etídio para posterior visualização da banda sob iluminação ultravioleta.

4.1.5.1 Recuperação de oocistos nas amostras de fezes

As amostras positivas para oocistos tipo *N. caninum* foram submetidas a uma centrifugação para concentração de oocistos. Dissolveu-se cerca de 1 grama de fezes em 11 mL de solução de sacarose ($d=1,203\text{g/cm}^3$). O material foi transferido para tubos cônicos e centrifugado a 1.500 g por 10 minutos. Os oocistos presentes na superfície da suspensão foram recuperados com o auxílio de uma alça de platina e depositados em lâmina coberta por uma lamínula para visualização ao microscópio óptico a fim de se avaliar a morfologia e estimar a quantidade de oocistos. A recuperação dos oocistos foi realizada com a lavagem da lâmina e lamínula com 1,5 mL de tampão TE (10mM Tris HCL pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) em placa de Petri. O lavado foi transferido para microtubos de 1,5 mL e centrifugado a 12.000 g por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e foi repetido o mesmo processo. O sedimento contendo oocistos foi submetido à extração do DNA.

4.1.5.2 Extração de DNA dos oocistos

Adicionou-se ao sedimento de oocistos um tampão de extração (Tris-HCl 10 mM; NaCl 100 mM; EDTA 25mM; SDS 1%) até a obtenção de um volume final de 590 μL . Realizou-se o congelamento e descongelamento das amostras três vezes consecutivas para melhor rompimento dos oocistos. O descongelamento foi realizado em banho Maria a 37 °C e o congelamento em nitrogênio líquido. Adicionaram-se 5 μL de proteinase K (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e procedeu-se uma incubação em banho-seco por 4 horas à 37 °C ou 2 horas a 56 °C. Após esse período, realizaram-se três novos congelamentos e descongelamentos e adicionaram-se mais 5 μL de proteinase K (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). As amostras foram novamente incubadas em banho-seco por 2 horas a 56 °C ou overnight a 37°C. O volume final obtido foi de 600 μL .

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

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

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

4.1.5.3 PCR

A metodologia empregada para a detecção de *N. caninum* em tecidos dos bovinos foi a mesma utilizada no Experimento I.

Para a detecção e identificação molecular dos oocistos, duas PCRs foram empregadas.

A primeira PCR foi realizada usando os *primers* JS4 e CT2c, descritos anteriormente (item 3.1.5) e direcionados para amplificação da região ITS-1, discriminatória para os diversos membros da sub-família toxoplasmatinae.

A segunda PCR foi realizada em forma de *hemi-nested* empregando-se *primers* direcionados ao *locus* Nc-5, específico de *N. caninum* (*hn* PCR-Nc5). Os *primers* dirigidos a este *locus* estão descritos no Quadro 5.

Quadro 5- Seqüência dos *primers* usados nas reações de *hemi-nested*

<i>Primers</i>	Seqüência (5'-3')	Região do pNc-5 (nucleotídeos)
Np4	CCTCCCAATGCGAACGAAA	806-824
Np6	CAGTCAACCTACGTCTTCT	758-776
Np7	GGGTGAACCGAGGGAGTTG	550-568

O protocolo a seguir foi adotado para a amplificação das amostras com os *primers* JS4 e CT2b:

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

O ciclo empregado nas PCRs empregando-se os *primers* JS4 e CT2b foi o seguinte:

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

O protocolo a seguir adotado para a amplificação das amostras com a *hn*-PCR-Nc5 para uma mistura de reagentes em 50 µL foi o seguinte:

- 30,6 µL de água ultra pura (milli-Q®) autoclavada
- 5 µL de tampão de reação 10x (500 mM KCL, 100 mM Tris-HCL, pH 9,0)
- 8 µL da mistura de dNTPs (200 µM de cada nucleotídeo: dCTP, dATP, dGTP, dTTP)
- 2 µL de MgCl₂ (50 mM)
- 1 µL do *primer* Np6 (10 pmol/µL)
- 1 µL do *primer* Np7 (10 pmol/µL)
- 0,4 µL de taq DNA polimerase
- 2 µL do DNA amplificado da PCR

O ciclo empregado na *hn* PCR-Nc-5 foi o seguinte:

- Desnaturação: 95 °C por 30 segundos
- Anelamento: 56 °C por 30 segundos
- Extensão: 72 °C por 60 segundos

Um total de 35 ciclos foi realizado. A cada corrida foi incluído um controle positivo de *N. caninum* e pelo menos dois controles negativos (água pura autoclavada).

4.1.5.4 Detecção do produto amplificado

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

foram depositados 10 µL de cada amostra misturado a 2,0 µL de corante de amostra (30% de glicerol; 0,25% de azul de bromofenol).

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

4.1.5.5 Seqüenciamento

a) Purificação dos produtos amplificados

Os produtos da PCR empregando-se os *primers* JS4 e CT2b foram recortados do gel de agarose a 1,5% com lâmina de bisturi. Esses fragmentos foram eluídos do gel e a purificação do DNA foi realizada com o *kit* GFX™ (Amersham Biosciences, Brasil), conforme instruções do fabricante.

b) Quantificação dos produtos de PCR purificados

Após o Ciclo da Reação em Cadeia de Polimerase, a detecção do produto amplificado e alíquotas dos produtos de PCR purificados (5µL) foram quantificadas com o auxílio do marcador de peso molecular Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder (MBI Fermentas) em gel de agarose 1,5% imerso em Tampão TBE, pH 8,0 (Tris-borato 0,045M; EDTA 0,001M). As intensidades luminosas das bandas adquiridas após purificação do DNA foram visualmente comparadas com as do marcador. A concentração em nanogramas de DNA das amostras foi determinada seguindo a tabela fornecida pelo fabricante do marcador de peso molecular.

c) Reação de seqüenciamento

Para a reação de seqüenciamento utilizou-se o *kit* ABI PRISM™ Big Dye Terminator™ (Applied Biosystems, Brasil). Misturaram-se 6ng de DNA purificado, 2,0 µL de Big Dye™, 1,0 µL de Tampão SaveMoney 5x (Tris-HCl 400mM; MgCl₂ 10mM, pH 9,0), 2pmol de cada um dos primers (senso ou anti senso) e água q.s.p. 10 µL.

As seqüências do cromatograma foram editadas usando o programa Sequencher 4.1 (Genocodes Corp, EUA).

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

➤ Desnaturação inicial; 96 °C por 1 minuto

➤ Desnaturação: 96 °C por 15 segundos

Rampa: 1,0 °C/ s

➤ Hibridização: 50 °C por 15 segundos

Rampa: 1,0 °C/ s

➤ Extensão: 60 °C por 4 minutos

Rampa: 1,0 °C/ s

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

d) Precipitação do DNA

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

O sobrenadante foi descartado com o auxílio de pipeta e em seguida adicionaram-se 300 µL de etanol a 60% (v/v em água). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 14.000 g por 10 minutos. O etanol foi removido com a pipeta e as amostras foram colocadas em banho seco a 80 °C por cerca de 2 minutos até a secagem completa dos microtubos.

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

e) Eletroforese de seqüenciamento

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

4.2 Resultados

4.2.1 Estudo 1

Nenhum dos cães inoculados soroconverteu no período de 30 dias. Houve eliminação de oocistos de *N. caninum*, confirmados pela PCR e seqüenciamento, em cães que ingeriram masseter (2 cães, 40%), coração (2 cães, 40%), fígado (1 cão, 33%) e cérebro (3 cães, 75%). A média de oocistos eliminados de *N. caninum* foi de 1152, 2704, 317 e 959 através da ingestão de masseter, coração, fígado e cérebro, respectivamente.

DNA de *H. heydorni* foi verificado em dois cães que ingeriram coração e em dois cães que ingeriram masseter, entretanto co-infecção por *N. caninum* e *H. heydorni* não foi observada. Através das técnicas moleculares realizadas, não foi verificada a presença do *N. caninum* nos tecidos dos bovinos doadores.

A Tabela 4 apresenta a relação dos tecidos e a quantidade ingerida por cada cão que eliminou oocistos de *N. caninum*. A Tabela 4 apresenta a relação dos tecidos e a quantidade ingerida por cada cão que eliminou oocistos de *N. caninum*. A Tabela 5 apresenta os resultados de isolamento de *N. caninum* e *H. heydorni* em cães jovens alimentados com diferentes tecidos de bovinos soropositivos a *N. caninum*. A Tabela 6 demonstra os resultados de eliminação de oocistos de *N. caninum* pelos cães dos diferentes grupos experimentais bem como a quantidade de cães que eliminaram oocistos de *N. caninum* por tecido ingerido. A Figura 2 ilustra a identificação dos oocistos pela *hemi-nested* PCR Nc5 e a Figura 3 a identificação dos oocistos pela PCR com os primers JS4 e CT2b.

Tabela 4- Quantidade de tecido ingerido por órgão oferecido aos cães que eliminaram oocistos de *N. caninum*.

Cão Nº	Órgão	Quantidade ingerida(g)
5	coração	600
20	coração	250
6	cérebro	300
11	cérebro	300
18	cérebro	300
16	masseter	350
17	masseter	350
22	fígado	320

Tabela 5- Isolamento de *N. caninum* e *H. heydorni* em cães alimentados com diferentes tecidos de bovinos soropositivos a *N. caninum*

Identificação do bovino	Identificação do cão	Órgão Ingerido	Eliminação oocistos (dpi)	PCR	DNA Sequenciado
B1	2	cérebro	N	NR	NR
B2	6	cérebro	8	8	<i>N. caninum</i>
B3	11	cérebro	10, 11	10, 11	<i>N. caninum</i>
B4	18	cérebro	7, 8, 9	8, 9	<i>N. caninum</i>
B1	1	masseter	N	NR	NR
B2 + B3	7	masseter	8, 9, 10, 12	N	<i>H. heydorni</i>
B2 + B3	12	masseter	6, 9, 10, 11, 12	N	<i>H. heydorni</i>
B4	16	masseter	9, 10, 14	9, 10, 14	<i>N. caninum</i>
B4	17	masseter	8, 9, 10	8, 9, 10	<i>N. caninum</i>
B1	3	fígado	N	NR	NR
B4	21	fígado	N	NR	NR
B4	22	fígado	14	14	<i>N. caninum</i>
B1	5	coração	12, 13, 15, 16, 17	12, 13, 15, 16, 17	<i>N. caninum</i>
B2 + B3	9	coração	6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14	N	<i>H. heydorni</i>
B2 + B3	14	coração	N	NR	NR
B4	19	coração	8, 9, 12, 13, 14	N	<i>H. heydorni</i>
B4	20	coração	14	14	<i>N. caninum</i>
	4	Controle	N	NR	NR
	10	Controle	N	NR	NR
	15	Controle	N	NR	NR

N= negativo; NR = Não realizado; dpi = dias pós-ingestão; B2 + B3 = pool de tecidos dos bovinos 2 e 3

Tabela 6- Quantidade e dias de eliminação de oocistos de *N. caninum* pelos cães alimentados com diferentes tecidos bovinos.

Órgão	No. de Cães			Eliminação de oocistos (dias pós ingestão)	Cão No.	Total de oocistos eliminados
	Total	Positivo	%			
Coração	5	2	40	12, 13, 15, 16, 17	5	5100
				14	20	309
Cérebro	4	3	75	8	6	218
				10, 11	11	1495
				7, 8, 9	18	1165
Masseter	5	2	40	9, 10, 14	16	993
				8, 9, 10	17	1311
Fígado	3	1	33	14	22	317
Controle	3	0	0	--		--
Total	20	8	40			10.908

Figura 2- Resultado da *Hemi-nested* PCR(*hn* PCR-Nc5) direcionada ao gene Nc5 para detecção de *N. caninum* em oocistos eliminados por cães experimentalmente infectados com diferentes tecidos bovinos. Gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídio.

- 1- Marcador de peso molecular de 100 pares de bases
- 2- cão número 5; tecido ingerido: coração
- 3- cão número 6; tecido ingerido: cérebro
- 4 - cão número 22; tecido ingerido: fígado
- 5- controle positivo para *N. caninum*

Figura 3- Resultado da PCR direcionada ao locus ITS-1 para detecção de *N. caninum* em oocistos eliminados por cães experimentalmente infectados com diferentes tecidos bovinos. Gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídio.

- 1- Marcador de peso molecular de 100 pares de bases
- 2- oocistos obtidos do cão número 16 (tecido ingerido: masseter)
- 3- controle positivo para *N. caninum*

4.2.2 Estudo 2

Nenhum dos cães adultos eliminou oocistos de *N. caninum* durante os 30 dias de observação.

Amostras de sangue para a pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum*, obtidas no dia da ingestão dos tecidos e aos 15 e 30 dias do experimento, foram examinadas e anticorpos anti-*N. caninum* não foram encontrados.

Dois cães que receberam fígado e cérebro e que foram mantidos em baias, sem possibilidade de infecção por *N. caninum*, foram examinados quanto à presença de anticorpos anti-*N. caninum* no 6º mês pós-ingestão dos tecidos pela RIFi, e anticorpos não foram detectados.

4.3 Discussão

A importância do cão na epidemiologia da neosporose é indiscutível, entretanto ainda há falta de informações que possam explicar como um hospedeiro considerado pouco eficiente (LINDSAY et al., 2001; GONDIM et al., 2002), por eliminar oocistos de forma inconsistente e por um período curto de tempo, possa ter uma participação tão importante numa infecção que se encontra altamente disseminada nos rebanhos bovinos em todo o mundo.

Outra informação importante diz respeito às fontes de infecção por *N. caninum* nos bovinos. Sabe-se que placenta (DIJKSTRA et al., 2001) e tecidos do SNC (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999; GONDIM et al., 2004; RODRIGUES et al., 2004) de bovinos mostraram-se eficientes nas infecções experimentais de cães. O contato com restos placentários é bastante comum em cães do meio rural e podem ser um indicativo de maiores taxas de infecção em cães desses ambientes (DIJKSTRA et al., 2001; 2002; FERNANDES et al., 2004; CUNHA et al., 2008), entretanto a ingestão de tecidos do SNC por cães é mais complexa e nem sempre possível; assim o conhecimento da participação de outros órgãos na infecção desses animais é de grande importância epidemiológica.

O objetivo do presente trabalho foi estudar a participação de tecidos bovinos (coração, masseter e fígado), além do SNC, na infecção de cães jovens e adultos pelo *N. caninum*.

Em ambos os estudos todos os cães permaneceram clinicamente sadios por todo o período experimental e apenas os cães jovens eliminaram oocistos de *N. caninum*. Nenhum dos cães com um ano de idade eliminou oocistos pelas fezes, nem soroconverteram na fase de observação de um mês. Dois desses cães adultos, mantidos livres da infecção em baias individuais e com alimentação comercial após a fase de observação e coletas experimentais, foram examinados seis meses depois da ingestão dos tecidos. Também nessa ocasião anticorpos não foram encontrados.

Cães adultos naturalmente infectados eliminando oocistos de *N. caninum* já foram observados por Slapeta et al. (2002), entretanto não há informações sobre o estado imune desse cão, nem detalhes da eliminação de oocistos.

Gondim et al. (2005) compararam a infecção de cães jovens e adultos e concluíram a idade ser um fator importante na infecção, com três dos cinco animais adultos e três dos cinco jovens se infectando e eliminando oocistos após a ingestão de um *pool* formado por tecido nervoso, coração, rim, língua, diafragma e outros músculos esqueléticos. Apesar de cães de ambas as faixas etárias terem se infectado, a quantidade de oocistos eliminados foi maior nos animais mais jovens (com média de 183.367) do que nos adultos (média de 4.867).

No presente estudo a quantidade de inóculo oferecida aos cães mais velhos foi 50% maior do que a oferecida aos animais mais jovens, uma vez que pelo fator idade, adultos teriam condições de ingerirem uma quantidade superior. Assim sendo, a quantidade do inóculo, que poderia ser um fato importante para a não infecção desses animais (BERGERON et al., 2001; CEDILLO et al., 2008), provavelmente não tenha sido responsável por esse resultado. Entretanto, como os cães receberam tecidos de bovinos naturalmente infectados, outros fatores podem estar envolvidos, como a quantidade de cistos presentes nos tecidos e mesmo amostras diferentes de *N. caninum*. Mesmo assim, os resultados sugerem que o fator idade dos cães tenha uma grande importância na infecção e eliminação de oocistos por estes animais.

No grupo dos cães jovens, oito dos 17 animais que receberam diferentes tecidos bovinos, eliminaram oocistos de *N. caninum*. PCR espécie-específica realizada com os oocistos desses animais confirmou a presença de DNA de *N. caninum* e esta foi validada por seqüenciamento do ITS-1 rDNA. Entretanto, a importância do SNC, já descrita na literatura (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999; LINDSAY et al., 2001; RODRIGUES et al., 2004; DUBEY et al., 2007), foi confirmada, com 75% dos cães que se alimentaram com cérebro eliminando oocistos, seguido pelo coração e masseter com 40% e pelo fígado com 33% de cães se infectando.

De todos os bovinos utilizados como inóculo (B1 a B4), cães positivos foram observados, indicando que a seleção, baseada em sorologia (RIFI) com títulos ≥ 400 , correspondeu a animais em fase crônica da infecção, tendo sido eficazes como fonte de cistos teciduais viáveis para os cães do experimento. Como os cães receberam tecidos de diferentes bovinos e por estes terem adquirido a infecção naturalmente, a quantidade de cães que se infectaram com cada um dos tecidos deve ser avaliada com cautela, pois já é conhecido que diferentes isolados podem possuir diferentes virulências para cães (KING et al., 2010).

O baixo número de oocistos observados em fezes de cão pode ser afetado pelo número de cistos ingeridos, tipo e quantidade de inóculo oferecido aos cães, entretanto a exata dose de inóculo não é possível de ser determinada quando se utilizam tecidos de animais (McALLISTER., 1999; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; CEDILLO et al., 2008).

Estudos anteriores haviam utilizado *pool* de órgãos (cérebro, coluna vertebral, coração, rim, língua, diafragma, músculo esquelético e placenta) de bovinos para avaliar a produção de oocistos por cães (SCHARES et al., 2001; DIJKSTRA et al., 2001; GONDIM et al., 2002; GONDIM et al., 2004); também o uso de tecidos bovinos foi comparado com tecidos de roedores como fonte de infecção (GONDIM et al., 2002). Nos primeiros estudos observou-se que *pool* de órgãos infectava cães; entretanto, nesses pools o cérebro estava presente e deixava dúvida quanto à participação dos diferentes tecidos. No estudo com tecidos de diferentes espécies

animais, observou-se serem os tecidos bovinos mais apropriados como fonte de infecção de *N. caninum* para os cães.

São escassas as informações acerca da eliminação de oocistos por cães infectados natural e experimentalmente, entretanto a baixa eliminação de oocistos nas fezes é fato comum em cães infectados (BASSO et al., 2001; SLAPETA et al., 2002; McGARRY et al., 2003; RODRIGUES et al., 2004; SCHARES et al., 2005; McINNES et al., 2006; PENA et al., 2007).

É muito ampla a quantidade de informações sobre a soroprevalência da infecção por *N. caninum* em cães (DIJKSTRA et al., 2001; GONDIM et al., 2002; FERNANDES et al., 2004; GENNARI et al., 2004; GONDIM et al., 2005; SCHARES et al., 2005; CEDILLO et al., 2008; CUNHA et al., 2008; FRIDLUND-PLUGGE et al., 2008). Nesses estudos de soroprevalência, o fato de cães rurais serem mais prevalentes do que cães urbanos (BASSO et al., 2001; PATITUCCI et al., 2001; FERNANDES et al., 2004; CUNHA et al., 2008) e que animais que se alimentam de carne crua ou comida caseiras também apresentarem ocorrências mais altas de anticorpos anti-*N. caninum* do que os que se alimentam de ração comercial (CAÑÓN-FRANCO et al., 2003; FERNANDES et al., 2004; BRESCIANI et al., 2006) reforçam a importância da ingestão de tecidos por cães e a infecção por *N. caninum*.

Os cães do presente estudo apresentaram uma eliminação de oocistos baixa (média = 1.363 oocistos no período de 30 dias do experimento) e bastante variável, com média de 959 oocistos nos animais que receberam o cérebro, 2704 nos que receberam coração, 1152 oocistos nos cães do grupo do masseter e 317 nos que se alimentaram com fígado. A média geral obtida no presente estudo foi inferior à encontrada por Gondim et al. (2002) que alimentaram cães com *pool* de órgãos; entretanto, os autores utilizaram 3kg de pool de órgãos por cão. Nesse mesmo estudo, cães que consumiram o mesmo *pool* de tecidos bovinos produziram quantidades diferentes, com um cão eliminando 5.700 oocistos em três dias e outro eliminando 345.900 oocistos em 14 dias.

Rodrigues et al. (2004), com cães alimentados com tecidos de búfalos naturalmente infectados, também observaram que alguns cães eliminaram quantidades superiores às observadas no presente estudo, porém esses animais eram

bastante jovens e com o estado geral mais debilitado do que os cães do presente estudo (informação pessoal).

No primeiro isolamento de *N. caninum* em fezes de um cão da raça Rootweiler de 45 dias de idade naturalmente infectado, Basso et al. (2001) também encontraram, um baixo número de oocistos de *N. caninum*. Contudo, não se sabe qual tecido foi ingerido por esse cão, mas apenas que esse animal tinha o hábito de consumir, freqüentemente, carne bovina mal cozida.

Oito dos 17 cães jovens do presente estudo que receberam tecidos bovinos, não eliminaram oocistos de *N. caninum* e nem soro converteram a anticorpos anti-*N. caninum*, em concordância com Bergeron et al. (2001) e Cedillo (2008), que infectaram cães com *pool* de tecidos de fetos bovinos naturalmente infectados, e não houve infecção patente por este coccídio nem soro conversão a anticorpos anti- *N. caninum*. King et al. (2010) infectaram três dingos e três cães com um pool de tecidos bovinos experimentalmente infectados com um isolado australiano de *N. caninum*. Somente um dingo eliminou oocistos e os outros dois dingos apresentaram DNA do parasito no sangue; entretanto os cães não se infectaram. Estes estudos fornecem evidências de que, mesmo utilizando o mesmo isolado do coccídio, alguns animais podem não se infectar dependendo muito da presença de cistos no inóculo de cada um dos animais infectados.

Na Alemanha, Schares et al. (2005) verificaram alta quantidade de eliminação de oocistos em um cão que havia sido esplenectomizado, podendo indicar que a intensidade da eliminação pode também ser influenciada por fatores imunológicos. Lindsay et al. (1999) obtiveram boa infecção por *N. caninum* em cães após imunossupressão química, aumentando a evidência da importância de fatores imunológicos.

Não se sabe quais os tecidos de predileção para cistos teciduais de *H. heydorni* (Mohammed et al., 2003), mas, nesse estudo, DNA desse coccídio foi encontrado em dois cães que ingeriram coração e em dois cães que receberam masseter, indicando predileção por tecido muscular. Soares et al. (2009) infectaram cachorros do mato (*Cordocyon thous*) com tecido cerebral e masseter de bovinos naturalmente infectados

por *N. caninum*, entretanto somente observaram a eliminação de oocistos de *H. Heydorni*.

Não houve infecção mista em nenhum dos cães participantes deste experimento. Schares et al. (2005) também observaram alguns cães eliminando oocistos de *H. heydorni* mas não de *N. caninum* concomitantemente.

Os cães deste estudo só puderam ser acompanhados por sorologia até o primeiro mês pós-infecção e nesse período nenhum dos animais soroconverteu.

Dijkstra et al. (2001) observaram pequena eliminação de oocistos de *N. caninum* por cães jovens infectados com tecido de placenta de bovinos naturalmente infectados e, apesar de eliminarem oocistos, anticorpos anti-*N. caninum* não foram observados, como ocorreu no presente estudo.

Em infecções semelhantes, outros autores também não observaram soroconversão (Mc ALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999; DIJKSTRA et al., 2001; SCHARES et al., 2001; SCHARES et al., 2005), confirmando que a ausência de anticorpos não significa que o cão esteja livre da infecção. Este é um fato que deve ser bem avaliado em estudos epidemiológicos, uma vez que cães sorologicamente negativos podem ter eliminado ou estarem eliminando oocistos de *N. caninum*. Entretanto, esta não é uma observação constante. Gondim et al. (2001, 2002, 2005) verificaram que cães jovens apresentavam títulos a anticorpos anti-*N. caninum* no 25º dpi e cães adultos e jovens soroconverteram no 30º dpi. Entretanto, em alguns desses estudos, o inóculo era constituído por cerca de 3kg de tecidos bovinos.

Bandini (2009) não conseguiu infectar cães com oocistos de *N. caninum* (10^3 a 10^4), mas os cães que receberam os inóculos maiores soroconverteram 30 dias após a ingestão de oocistos, indicando que os oocistos não conseguiram causar infecção com eliminação de oocistos, mas que altas doses de oocistos podem levar à formação de anticorpos.

No presente experimento, o período pré-patente variou de sete (cérebro) a 17 (coração) dias. O período pré-patente de sete dias, está em concordância com a maioria dos trabalhos de infecção experimental em cães (GONDIM et al., 2002; McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999; RODRIGUES et al., 2004) com tecidos nervosos de bovinos ou búfalos.

Dijkstra et al. (2001) verificaram eliminação de oocistos de *N. caninum* no 18º dpi em cão alimentado com placenta, semelhante ao observado em um dos animais que ingeriu tecido cardíaco no presente estudo. McAllister et al. (1998) observaram período de pré-patência de 13 dias num cão experimentalmente infectado com tecido de camundongo com cistos de *N. caninum*. Pena et al. (2007), utilizando cérebro de ovelha naturalmente infectada por *N. caninum*, observaram período de pré-patência de 16 dias, em cães alimentados com tecido nervoso dessa ovelha. Estas observações confirmam que os intervalos obtidos no presente estudo estão dentro dos anteriormente encontrados e que as diferenças observadas nos períodos de pré-patência podem ser devido à quantidade variável de parasitas ingeridos em cada estudo, à virulência da amostra de *N. caninum* que induziu a infecção nos bovinos ou a uma combinação desses e de outros fatores (KING et al., 2010).

A eliminação de oocistos durou de um a cinco dias e foi variável por órgão ingerido. A maior quantidade de oocistos eliminados foi verificada no cão que ingeriu coração e oocistos foram eliminados por cinco dias. O menor período de eliminação, um único dia, também ocorreu em um cão que recebeu o coração. Gondim et al. (2002), após administrar *pool* de órgãos a cães jovens, obtiveram eliminação de oocistos do 5º ao 28º dpi, fato também observado em outros estudos semelhantes (McALLISTER., 1998; DIJKSTRA et al., 2001; RODRIGUES et al., 2004; PENA et al., 2007).

A PCR na região ITS-1 associada ao uso de primer específico para detecção do *N. caninum* com o gene Nc-5 e seqüenciamento automático de ácidos nucléicos utilizados nesse estudo mostraram-se eficientes para a diferenciação de organismos membros da sub-família Toxoplasmatinae, cujas características morfológicas são indistinguíveis. *N. caninum* apresentou-se distinto do *H. heydorni* e de outros protozoários da família Toxoplasmatidae, conforme verificado em outros estudos (ELLIS et al., 1999; MUGRIDGE et al., 1999., SHARES et al., 2001, MONTEIRO et al., 2008; KING et al., 2010).

O encontro de oocistos de *N. caninum* em fezes de cães jovens que ingeriram cérebro, coração, masseter e fígado, confirmados pela PCR e pelo seqüenciamento

permitem concluir que estes tecidos podem ser possíveis fontes de infecção de *N. caninum* para cães jovens.

5 CONCLUSÕES

- A idade gestacional na qual as cadelas se infectaram pelo *N. caninum* não interferiu na transmissão transplacentária do coccídio.
- Morte perinatal foi observada nas cadelas infectadas pelo *N. caninum* na 3^a e 6^a semana de gestação.
- Cães jovens, após a ingestão de coração, fígado, masseter e cérebro infectaram-se pelo *N. caninum* com eliminação de oocistos do parasito.
- Cães adultos parecem ser resistentes à infecção pelo *N. caninum*.

REFERÊNCIAS*

ALMERIA, S.; ARAUJO, R.; TUO, W.; GATIUS-LÓPEZ, F.; J. P. DUBEY.; GASBARRE, L. R. Fetal death in cows experimentally infected with *Neospora caninum* at 110 days of gestation. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 304-311, 2010.

ALVES NETO, A. F. **Avaliação da viabilidade de oocistos esporulados de *Neospora caninum* a diferentes condições de temperatura e ação de desinfetantes**. 68f. Dissertação (mestrado em 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 of the American Veterinary Association**, v. 198, p. 241–244, 1991.

ANDERSON, M. L.; REYNOLDS, J. P.; ROWE, J. D.; SVERLOW, K. W.; PACKHAM, A. E.; BARR, B. C.; CONRAD, P. A. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. infection in dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Association**, v. 210, p. 1169–1172, 1997.

ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, G.; CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 417-443, 2000.

ANDREOTTI, R.; OLIVEIRA, J. M.; SILVA, E. A.; OSHIRO, L. M.; MATOS, M. F. C. Occurrence of *Neospora caninum* in dogs and its correlation with visceral leishmaniasis in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 375-379, 2006.

* De acordo com:

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

ATKINSON, R.; HARPER, P. A.; RYCE, C.; MORRISON, D. A.; ELLIS, J. T. Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 118, p. 363-370, 1999.

AZEVEDO, S. S.; BATISTA, C. S. A.; VASCONCELLOS, S. A.; AGUIAR, D. M.; RAGOZO, A. M. A.; RODRIGUES, A. A. R.; ALVES, C. J.; GENNARI, S. M. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. **Research In Veterinary Science**, v. 79, p. 51-56, 2005.

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

BARBER, J. S.; VAN HAM, L.; POLIS, I.; TREES, A. J. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in Belgian dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 38, p. 15-16, 1997.

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

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

BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M. C. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 906-907, 2001a.

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

BASZLER, T. V.; GAY, L. J. C.; LONG, M. T.; MATHISON, B. A. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 4059-4064, 1999.

BENETTI, A. H.; SCHEIN, F. B.; SANTOS, T. R.; TONIOLLO, G. H.; COSTA, A. J.; MINEO, J. R.; LOBATO, J.; SILVA, D. A. O.; GENNARI, M. G. Pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais da região Sudoeste do Estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 29-33, 2008.

BERGERON, N.; FECTEAU, G.; VILLENEUVE, A.; GIRARD, C.; PARÉ, J. Failure of dogs to shed oocysts after being fed bovine fetuses naturally infected by *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 97, p. 145-152, 2001.

BJERKAS, 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.; HOLDMDAHI, O. J. M.; UGGLA, A. An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 68, p. 251-256, 1997.

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

BOYDELL, P.; BROGAN, N. Horner's syndrome associated with *Neospora* infection. **Journal of Small Animal Practice**, v. 41, p. 571-572, 2000.

BRESCIANI, K. D. S.; NUNES, C. M.; MOURA, A. B.; SERRANO, A. C. M.; STOBBE, N.; PERRI, S. H. V.; GENNARI, S. M.; COSTA, A. J. Ocorrência de anticorpos contra *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em cães de região urbana de Araçatuba, SP. **Parasitology Research**, 2006.

BRESCIANI, K. D. S.; GENNARI, S. M.; SERRANO, A. C. M.; RODRIGUES, A. A. R.; UENO, T.; FRANCO, L. G.; PERRI, S. H. V.; AMARANTE, A. F. T. Antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Brazil. **Parasitology Research**, v. 100, p. 281-285, 2007.

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

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

CANTILE, C.; ARISPICI, M. Necrotizing cerebellitis due to *Neospora caninum* infection in an old dog. *Journal Veterinary Medicine*, v. 49, p. 47-50, 2002.

CARDOSO, J. M. S.; NISHI, S. M.; FUNADA, M. R.; AMAKU, M.; GUIMARÃES-JUNIOR, J. S.; GENNARI, S. M. Antibody dynamics during gestation in cows naturally infected with *Neospora caninum* from four dairy herds in Brazil. **Bras. J. Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, p. 395-399, 2009.

CEDILLO, C. J. R.; MARTÍNEZ, M. I. J.; SANTACRUZ, A. M.; BANDA, R. V. M.; MORALES, S. E. Models for experimental infection of dogs fed with tissue from fetuses and neonatal cattle naturally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 154, p. 151-155, 2008.

CHEAH, T. S.; MATTSSON, J. G.; ZAINI, M.; SANI, R. A.; JAKUBEB, E. B.; UGGLA, A.; Chandrawathani, P. Isolation of *Neospora caninum* from a calf in Malaysia. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 263-269, 2004.

CHI, J.; VANLEEUEWEN, J.A.; WEERSINK, A.; KEEFE, G.P. Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and *Neospora caninum*. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 55, p. 137-153, 2002.

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

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

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.

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

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.

DAMRIYASA, I. M.; BAUER, C.; EDELHOFER, R.; FAILING, K.; LIND, P.; PETERSEN, E.; SCHARES, G.; TENTER, A. M.; VOLMER, R.; ZAHNER, H. Cross-sectional survey in pig breeding farms in Hesse, Germany: seroprevalence and risk factors of infections with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocysts* spp. And *Neospora caninum* in sows. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 271-186, 2004.

DAVISON, H. C.; GUY, C. S.; McGARRY, J. W.; GUY, F.; WILLIAMS, D. J. L.; KELLY, D. F.; TREES, A. J. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. **Research Veterinary Science**, v. 70, p. 163-168, 2001.

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

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

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

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary 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 of the American Veterinary 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- 1581, 1989.

DUBEY, J. P. A review of *Neospora caninum* and *Neospora*-like infections in animals. **Journal of Protozoology Research**, v. 2, p. 40-52, 1990.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; LIPSCOMB, T. P. Neosporosis in cats. **Veterinary Pathology**, v. 27, p. 335-339, 1990a.

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. 127–30, 1990b.

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.; LINDSAY, D. S.; ADAMS, D. S.; GAY, J.; BASZLER, T. V.; BLAGBURN, B. L.; THULLIEZ, P. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. **American Journal Veterinary Research**, v. 57, p. 329-326, 1996.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FIORETTI, D. P.; ROSIGNOLI, L.; RICCI, G.; MORETTI, A.; PASQUALI, P.; POLIDORO, G. A. *Neospora caninum* infection in a clinically healthy calf: parasitological study and serological follow-up. **Journal of Veterinary Medicine**, v.47, p. 47-53, 2000.

FRIDLUND-PLUGGE, N.; MONTIANI-FERREIRA, F.; RICHARTZ, R. R.; DALPIZZO, J.; MACHADO, P. C.; PATRÍCIO, L. F.; ROSINELLI, A. S.; LOCATELLI-DITTRICH, R. I. Frequency of antibodies against *Neospora caninum* in stray and domiciled dogs from urban, periurban and rural areas from Paraná State, **Southern Brazil. Rev. Bras. Parasitol Vet**, v. 17, p. 222-226, 2008.

FRÖSSLING, J.; UGGLA, A.; BJÖRKMAN, C. Prevalence and transmission of *Neospora caninum* within infected Swedish dairy herds. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 209–218, 2005.

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.

GARCIA-VAZQUEZ, Z. ; CRUZ-VÁSQUEZ, C.; MEDINA-ESPINOSA, L.; GARCIA-TAPIA, D.; CHAVARRIA-MARTINEZ, B. Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, Mexico. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p. 115-120, 2002.

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

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

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

GENNARI, S. M.; CAÑON-FRANCO, W. A.; FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LIMA, V. M. F.; AMAKU, M. Presence of anti-*Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs with visceral leishmaniosis from the region of Araçatuba, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 613-619, 2006.

GIBNEY, E. H.; KIPAR, A.; ROSBOTTOM, A.; GUY, C. S.; SMITH, R. F.; HETZEL, U.; TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 579-588, 2008.

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

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

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

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

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

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

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HASLER, B.; REGULA, G.; STARK, K.D.C.; SAGER, H.; GOTTSTEIN, B.; REIST, M. Financial analysis of various strategies for the control of *Neospora caninum* in dairy Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 77, p. 230-253, 2006a.

HASLER, B.; STARK, K.D.C.; SAGER, H.; GOTTSTEIN, B.; REIST, M. Simulating the impact of four control strategies on the population dynamics of *Neospora caninum* infection in Swiss dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 77, p. 254-283, 2006b.

HÄSSIG, M.; H. SAGER.; REITT, K.; ZIEGLER, D.; STRABEL, D.; GTTSTEIN, B. *Neospora caninum* in sheep: a herd case report. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 213–220, 2003.

HELMICK, B.; OTTER, A.; McGARRY, J.; BUXTON, D. Serological investigation of aborted sheep and pigs for infection by *Neospora caninum*. **Research in Veterinary Science**, v. 73, p. 187-189, 2002.

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

HOLMDAHL, O. J. M.; MATTSON, J. G. Rapid and sensitive identification of *Neospora caninum* by in vitro amplification of the internal transcribed spacer 1. **Parasitology**, v. 112, p. 177-182, 1996.

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

INNES, E. A.; WRIGHT, S. E.; MALEY, S.; RAE, A.; SCHOCK, A.; KIRVAR, E.; BARTKEY, P.; HAMILTON, C.; CAREY, I. M.; BUXTON, D. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 1523-1534, 2001.

INNES, E. A.; WRIGHT, S. E.; BARTLEY, P.; MALEY, S.; MACALDOWIE, C.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, p. 108, v. 29-36, 2005.

JENKINS, M. C.; WOUDA, W.; DUBEY, J. P. Serological response over time to recombinant *Neospora caninum* antigens in cattle after neosporosis-induced abortion. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, 270-274, 1997.

JENKINS, M. C.; BAZLER, T.; BJÖRKMAN, C.; SCHARES, G.; WILLIAMS, D. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 631–636, 2002.

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

LINDSAY, D.S. Question: What is the economic impact of the disease? **Veterinary Exchange**, v. 20, n. 11, p. 13, 1998.

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

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

LINDSAY, D. S.; RITTER, D. M.; BRAKE, D. Oocyst excretion in dogs fed mouse brains containing tissue cysts of a cloned line of *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 909–911, 2001.

LINDSAY, D. S.; LENZ, S. D.; COLE, R. A.; DUBEY, J. P.; BLAGBURN, B. L. Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. **Journal of Parasitology**, v. 81, p. 313–315, 2005.

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

LOBATO, J.; SILVA, D. A. O.; GENNARI, S. M. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais da região Sudoeste do Estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 29-33, 2009.

QUINN, H. E.; ELLIS, J. T.; SMITH, N. C. *Neospora caninum*: a cause of immune failure of pregnancy? **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 391-94, 2002.

MACALDOWIE, C.; MALEY, S. W.; WRIGHT, S.; BARTLEY, P.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D.; INNES, E. A. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. **Journal of Comparative Pathology**, v. 131, p. 142-156, 2001.

MACALDOWIE, C.; MALEY, S. W.; WRIGHT, S.; BARTLEY, P.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D.; INNES, E. A. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. **Journal of Comparative Pathology**, v. 131, p. 142-156, 2004.

MALEY, S. W.; BUXTON, D.; RAE, A. G.; WRIGHT, S. E.; SCHOCK, A.; BARTLEY, P. M.; ESTEBAN-REDONDO, I.; SWALES, C.; HAMILTON, C. M.; SALES, J.; INNES, E. A. The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation. **Journal of Comparative Pathology**, v. 129, p. 186-195, 2003.

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

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

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

McALLISTER, M. M. Uncovering the biology and epidemiology of *Neospora caninum* oocysts. **Parasitology Today**, v. 15, p. 216-217, 1999.

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

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

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**, p. 84–89, 2006.

MOHAMMED, O.; DAVIES, A.J.; HUSSEIN, H.S.; DASZAK, P.; ELLIS, J.T. *Hammondia heydorni* from the arabian mountain gazelle and red fox in Saudi Arabia. **The Journal of Parasitology**, v.89, n.3, p.535-539, 2003.

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

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

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

MOSKWA, B.; PASTUSIAK, K.; BIEN, J.; CABAJ, W. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. **Parasitology Research**, v. 100, p. 633–636, 2007.

MUGRIDGE, N. B.; MORRISON, D. A.; HECKEROTH, A. R.; JOHNSON, A. M.; TENTER, A. M. Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1545-1556, 1999.

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

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.

OOI, H. K.; HUANG, C. C.; YANG, C. H.; LEE, S. H. Serological survey and first finding of *Neospora caninum* in Taiwan, and the detection of its antibodies in various body fluids of cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 90, p. 47–55, 2000.

ORDEIX, L.; LLORET, A.; FONDEVILA, D.; DUBEY, J. P.; FERRER, L.; FONDATI, A. Cutaneous neosporosis during treatment of pemphigus foliaceus in a dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 38, p. 415-419, 2002.

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

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

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

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

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

PERLÉ, K. M. D.; DEL PIERO, F.; CARR, R. F.; HARRIS, C.; STROMBERG, P. C. Cutaneous neosporosis in two adult dogs on chronic immunosuppressive therapy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, p. 252-255, 2001.

PETERS, 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.

PIPANO, E.; SHKAP, V.; FISH, L.; SAVITSKY, I.; PERL, S.; ORGARD, U. Susceptibility of *Psammomys obesus* and *Meriones tristami* to tachyzoites of *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, v. 88, p. 314-319, 2002.

REICHEL, M.P. *Neospora caninum* infectious in Australia and New Zealand. **Australian Veterinary Journal**, v. 78, p. 258-261, 2000.

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.

ROJO-MONTEJO, S.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; BLANCO-MURCIA, J.; RODRIGUEZ-BERTOS, A.; RISCO-CASTILLO, V.; ORTEGA-MORA, L.M. Experimental infection with a low virulence isolate of *Neospora caninum* at 70 days gestation in cattle did not result in foetopathy. **Veterinary Research**, p. 40-49, 2009.

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

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

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

SCHARES, G.; HEYDORN, A. O.; CUPPERS, A.; CONRATHS, F. J.; MEHLHORN, H. *Hammondia heydorni*-like oocysts shed by a naturally infected dog and *Neospora caninum* NC-1 cannot be distinguished. **Parasitology Research**, v. 87, p. 808-816, 2001a.

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

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

ŠLAPETA, J. R.; MODRÝA, D.; KYSELOYÁ, 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.

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

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

TARANTINO, C.; ROSSI, G.; KRAMER, L. H.; PERRUCI, S.; CRINGOLI, G.; MACCHIONI, G. *Leishmania infatum* and *Neospora caninum* simultaneous skin infection in a young dog in Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 102, p. 77-83, 2001.

THULLIEZ, P. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. **American Journal Veterinary Research**, v. 57, p. 329-326, 1996.

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

TIEMANN, J. C. H.; SOUZA, S. L. P.; RODRIGUES, A. A. R.; DUARTE, J. M. B.; GENNARI, S. M. Environmental effect on the occurrence of anti-*Neospora caninum*

antibodies in pampas-deer (*Ozotoceros bezoarticus*). **Veterinary Parasitology**, v. 134, p. 73-76, 2005.

TRANAS, J.; HEINZEN, R.A.; WEISS, L. M.; Mc ALLISTER, 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, J.; WILLIAMS, D. J. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 558-561, 2005.

THURMOND, M.C.; HIETALA, S.K.. Culling associated with *Neospora caninum* in dairy cows. **American Journal of Veterinary Research**, v.57, p. 1559-1562, 1996.

VÁCLAVEK, P.; SEDLÁK, K.; HŮRKOVÁ, L.; VODRÁKA, P.; SEBESTA, R.; KOUDELA, B. Serological survey of *Neospora caninum* in dogs in the Czech Republic and a long-term study of dynamics of antibodies. **Veterinary Parasitology**, v. 143, p. 35–41, 2007.

VIANNA, M. C. B.; SREEKUMAR, C.; MISKA, K. B.; HILL, D. E.; DUBEY, J. P. Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected white- tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Veterinary Parasitology**, v. 129, p. 253-257, 2005.

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

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

VOGEL, F. S. F.; ARENHAR, S.; BAUERMANN, F. V. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e Bubalinos no Estado do Rio Grandedo Sul. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1948–1951, 2006.

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

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